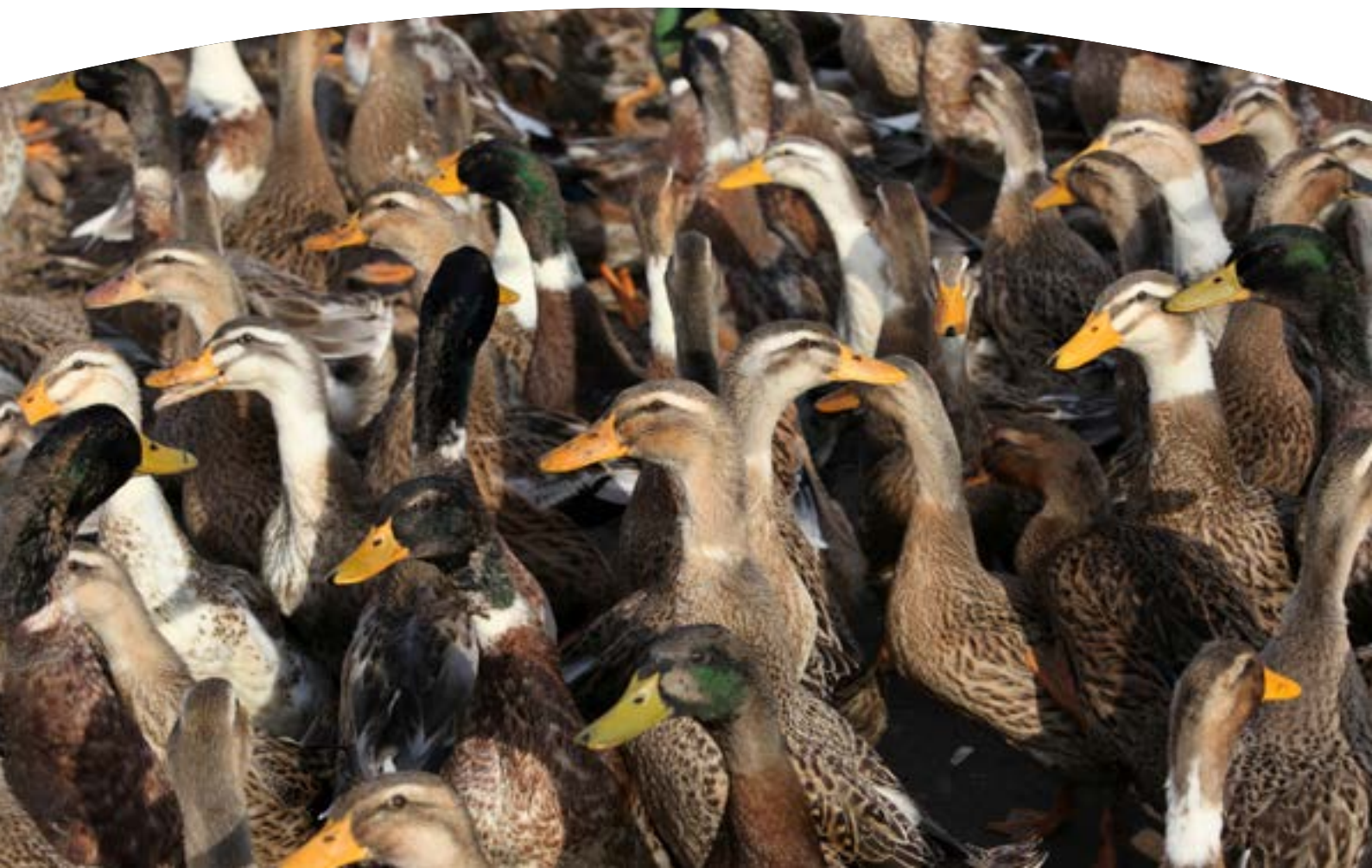


Clostridium botulinum
**Produits et sous-produits
animaux dans la filière avicole,
lors de suspicion et de confir-
mation de cas**

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective
Février 2022



Le directeur général

Maisons-Alfort, le **01 FEV. 2022**

AVIS **de l'Agence nationale de sécurité sanitaire** **de l'alimentation, de l'environnement et du travail**

relatif à l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 25 juin 2019 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par des bactéries du genre *Clostridium* et qui se manifeste par des paralysies flasques pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Il existe neuf types connus de toxines botuliques.

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et d'élevage) et les bovins. Chez les oiseaux, les types toxiques en cause sont dénommés C, D, mosaïques C/D et D/C et exceptionnellement le type E. Au niveau national, l'incidence est d'environ 25 foyers par an (volailles¹ et avifaune confondues), avec cependant des variations annuelles parfois notables, comme par exemple en volailles en 2007 (121 foyers décelés) et 2008 (102 foyers). Bien qu'il s'agisse d'une

¹ Le terme « volailles » regroupe les espèces d'oiseaux domestiques et captives.

maladie animale de première catégorie², il n'y a pas à l'heure actuelle de mesures de police sanitaire établies par la réglementation, lors de la confirmation d'un foyer de botulisme animal, ce qui conduit à une gestion au cas par cas par les directions départementales de la protection des populations (DDPP³) et la mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL. Ces services peuvent s'appuyer sur deux documents émis par l'Afssa : le rapport sur le botulisme animal établi en 2002 et l'avis rendu en janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. Les rapports et avis cités étant relativement anciens, la DGAL a saisi l'Anses via 4 saisines (saisines n°2019-SA-0112 à 2019-SA-0115), dont l'objet est une demande d'actualisation des connaissances et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.

L'expertise a été réalisée en deux étapes :

1. une mise à jour des connaissances sur *Clostridium botulinum* (types C, D, mosaïques C/D et D/C et E) effectuée par le groupe de travail (GT) « Groupe socle botulisme », portant sur les caractéristiques microbiologiques, les maladies humaine et animales (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types dans l'environnement, le danger dans les denrées alimentaires d'origine animale ainsi que l'efficacité des méthodes et procédés d'inactivation ;
2. le traitement des questions d'évaluation des risques par des GT spécifiques (« Botulisme bovin-aviaire » ; « Décontamination » ; « Faune sauvage et environnement »).

La première étape a fait l'objet d'un rapport de l'Anses du 30 juin 2021 (Anses 2021a)⁴. La présente expertise porte sur l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme. Les questions posées dans la saisine sont les suivantes :

« Cette évaluation concerne le botulisme aviaire de type C, D, mosaïques C/D et D/C ou E et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière (...) »

1. Quel est le risque pour l'Homme lié à la consommation de produits à base d'œufs et de viande selon le procédé de transformation et les formes de conditionnement ? L'évaluation intégrera notamment la consommation des abats (foie, gésiers) provenant des animaux issus de lots atteints ou en période d'incubation. Comment l'état de santé des animaux (phase d'incubation, phase clinique ...) influence-t-il le risque pour le consommateur final ?
2. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques, présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
3. Quels processus de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande peuvent être considérés comme assainissants ?
4. Quels seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?
5. Dans le cas où un traitement serait nécessaire, quelles seraient les mesures à prévoir pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères, etc.) ? ».

² Le statut du botulisme animal est susceptible d'évoluer suite à l'entrée en vigueur de la Loi de Santé Animale (cf. section 2.2.1 du rapport).

³ Dans les départements de moins de 400 000 habitants, les DDPP sont regroupées dans les directions départementales de l'emploi, du travail, des solidarités et de la protection des populations (DDETSPP) (anciennement directions départementales de la cohésion sociale et de la protection des populations, DDCSPP).

⁴ <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0112Ra.pdf>

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisés « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK, pilote) et « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA).

L'Anses a confié au GT « Botulisme bovin - aviaire », rattaché aux CES BIORISK et SABA, l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du GT ont été soumis régulièrement aux CES BIORISK (12 octobre, 16 novembre 2021) et SABA (12 octobre, 9 novembre et 14 décembre 2021) tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques. Ils ont été adoptés par le CES BIORISK réuni le 16 décembre 2021. Le rapport produit par le GT tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Les travaux du GT « Botulisme bovin – aviaire » s'appuient essentiellement sur la mise à jour des connaissances sur les types C, D, mosaïques C/D et D/C et E de *Clostridium botulinum* effectuée par le GT « Groupe socle botulisme » complétée par d'autres sources documentaires listées dans la bibliographie.

Compte tenu de l'analyse du contexte sanitaire et décisionnel, des données scientifiques recueillies dans le cadre du rapport socle, le GT propose de fournir le résultat de l'expertise sous la forme d'un profil de risque sanitaire. Le profil de risque tel que défini par la Commission du *Codex Alimentarius* (CAC 2007) comporte notamment une description du danger et des aliments impliqués, des informations sur les lieux et moyens d'entrée du danger dans la chaîne de production alimentaire, la prévalence et concentration du danger dans les aliments considérés et l'efficacité des options de gestion des risques (Guillier 2017). Cette approche permet de fournir des informations susceptibles d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision.

Aussi, pour structurer sa réflexion et répondre aux questions de la saisine, le GT les a abordées de la façon suivante :

1. Dans le cas d'un foyer de botulisme aviaire, les produits issus d'animaux (viande, abats, œufs) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives, spores et toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?
2. Dans la filière avicole, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits à base d'œufs et de viande ?
 - Quels seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?
 - Quels sont les impacts sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande ?
3. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
4. Quel est l'impact sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés appliqués pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères, etc.) ?

Dans ce cadre, le rapport d'expertise associé au présent avis rassemble :

1. des éléments d'informations sur le danger, issus du rapport du GT socle :
 - caractéristiques microbiologiques des *C. botulinum* ;
 - caractéristiques de la maladie humaine et animale et les données épidémiologiques associées ;
 - la maîtrise des *C. botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale (DAOA).
2. la détermination et l'évaluation des mesures de maîtrise applicables tout au long de la filière avicole lors de détection d'un foyer de botulisme. L'expertise s'est focalisée principalement sur les types C, C/D, D, D/C. Le type E a été pris en considération pour l'évaluation de l'impact des procédés de transformation.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. SYNTHÈSE ET CONCLUSIONS DES CES ET DU GROUPE DE TRAVAIL

3.1. Éléments d'information sur le danger

3.1.1. Caractéristiques de *Clostridium botulinum* et des toxines botuliques

C. botulinum, est constitué d'un ensemble de souches bactériennes dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine botulique, dont le mécanisme d'action est l'inhibition de la libération synaptique de l'acétylcholine, ce qui entraîne des paralysies pouvant conduire à la mort. Neuf types de toxines botuliques ont été identifiés (A, B, C, D, E, F, G, H et X). Les toxines botuliques se distinguent entre elles par des différences immunogéniques, de spécificité d'hôte, de cibles moléculaires et de toxicité. Il existe pour les types C et D des neurotoxines hybrides dites mosaïques C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012).

Les souches de *Clostridium* productrices de toxine botulique sont classées aujourd'hui en six groupes (groupes I à VI) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques. La classification basée sur le type de toxine produite est actuellement la plus employée. Ce sont des bactéries sporulées telluriques et anaérobies strictes. La forme sporulée permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales deviennent défavorables à la forme végétative. Elle confère également une résistance aux procédés physiques ou chimiques mis en œuvre par exemple lors d'un traitement thermique ou d'une désinfection. La synthèse des toxines botuliques est possible dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la multiplication des cellules et *in fine* la production des spores.

La classification et les principales caractéristiques physiologiques des souches de *Clostridium* productrices de toxine botulique sont présentées dans le tableau 1 du rapport.

3.1.2. Maladie humaine

Le botulisme humain est une maladie rare pouvant être létale (de 1 à 10 % de décès selon les formes cliniques). Il existe plusieurs formes de botulisme selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine :

- Le botulisme alimentaire résulte d'une intoxication par voie digestive due à la présence de la toxine préformée dans un aliment.
- Le botulisme intestinal est une toxi-infection due à l'ingestion de spores de *Clostridium botulinum*, suivie d'une germination, multiplication des cellules végétatives dans l'intestin et production de

toxine *in situ*. Le botulisme par toxi-infection peut être observé (i) chez les nourrissons de moins de 12 mois en raison de leur flore intestinale incomplètement constituée ou incomplètement fonctionnelle (botulisme infantile) et (ii) chez des adultes présentant un déséquilibre du microbiote (p. ex. à la suite d'une chirurgie digestive, d'une dépression immunitaire, d'une antibiothérapie prolongée) (botulisme infectieux de l'adulte).

- Le botulisme par blessure (ou d'inoculation) est une toxi-infection dont le mécanisme est identique à celui du tétanos. Les spores de *C. botulinum* peuvent contaminer les plaies, et en situation d'anaérobiose (cas d'une blessure profonde), la bactérie peut s'y développer et y produire de la toxine.
- Le botulisme par inhalation des toxines (forme très rare).

Le botulisme alimentaire et le botulisme infantile sont les deux formes les plus rencontrées chez l'être humain. Les signes cliniques associés aux différentes formes de botulisme, le diagnostic différentiel ainsi que le traitement sont présentés en détail dans le rapport socle (Anses 2021a). La gravité des signes cliniques dépend de la quantité de toxine botulique absorbée et du type de toxine. Le botulisme de type A est considéré comme le plus sévère pour l'être humain.

Entre 2008 et 2018, l'incidence du botulisme humain en France a été en moyenne de 7,5 foyers/an et de 14,5 cas/an. Le botulisme d'origine alimentaire est la forme très majoritairement observée (82 % des foyers sur la période). Les types de toxines botuliques en cause sont les types A et B puis E, occasionnellement F. Aucun foyer/cas de botulisme humain de type C, D ou mosaïques C/D et D/C n'a été recensé pendant la période. Les aliments les plus souvent impliqués sont des conserves et des produits de fabrication familiale ou artisanale. Les deux principales sources alimentaires sont le jambon cru et les conserves de légumes.

Les produits avicoles ont rarement été identifiés comme source de botulisme humain. En France, la consommation de poulet a été suspectée pour deux foyers de botulisme de type C dont un confirmé, en 1972 et 2006 (Maupas *et al.* 1976; Martrenchar *et al.* 2019). Plus récemment en 2015, du pâté de faisan de préparation familiale a été à l'origine d'un foyer de botulisme, mais de type A (trois cas).

Au regard d'une question de la saisine, une demande a été faite par le GT auprès des autorités de santé de plusieurs pays, concernant l'existence de cas de botulisme de plaie ou par inhalation chez des travailleurs en abattoir. Aucun des 19 pays⁵ qui ont répondu n'avait recensé de tels cas.

3.1.3. Caractère zoonotique des types C, D et mosaïques C/D et D/C

Le caractère zoonotique des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques a été évalué par le GT socle sur la base de l'examen des données épidémiologiques internationales (cas de botulisme humain liés à ces toxines) et des résultats d'essais *in vitro* et *in vivo* sur l'effet des toxines sur l'être humain.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers confirmés dont l'un d'origine aviaire rapportés par la littérature internationale). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire (deux cas ; Tchad, 1958) a été identifié dans le monde sur la période étudiée, pour lequel l'exposition à la toxine botulique de type D était suspectée.

Les cas de botulisme humain C et D sont donc rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la quasi absence de cas humains liés aux types C, D, C/D, D/C : faible sensibilité de l'hôte, faible exposition humaine, défaut de surveillance. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques est l'hypothèse privilégiée. Les essais *in vivo* réalisés par injection intradermique montrant l'efficacité de la toxine (particulièrement la C), la faible sensibilité correspondrait à une faible absorption intestinale des toxines.

⁵ Pays ayant répondu : Allemagne, Angleterre, Argentine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Danemark, Écosse, États-Unis, Finlande, Estonie, Irlande, Italie, Lettonie, Luxembourg, Monaco, Pologne, Suède, Suisse.

3.1.4. Maladie animale (botulisme aviaire)

Le botulisme aviaire se manifeste par une paralysie flasque ascendante qui progresse des pattes vers le cou et les paupières. Il est souvent associé à une détresse respiratoire, provoquée par la paralysie de la musculature thoracique. La pathogenèse du botulisme aviaire n'est pas encore clairement élucidée mais l'hypothèse retenue par plusieurs auteurs est celle d'une toxi-infection c'est-à-dire de la production *in situ* de la toxine botulique.

Les souches de *C. botulinum* impliquées dans les foyers de botulisme chez les oiseaux sont celles produisant les toxines C, D ou leurs mosaïques C/D et D/C, la toxine E et, beaucoup plus rarement, la toxine A. En France, ce sont en moyenne une trentaine de foyers de botulisme qui sont confirmés chaque année dans les élevages avicoles. Ces foyers impliquent principalement le type C/D dans les élevages de poulets de chair et de dindes majoritairement, mais également le type D ou D/C uniquement dans les élevages de dindes. Le type E est rarement à l'origine de cas en élevage (seulement cinq foyers recensés en France dans des élevages de poulets de chair entre 1997 et 2000).

Les foyers de botulisme sont principalement associés à la présence d'oiseaux porteurs de *C. botulinum* et à tout animal extérieur à l'élevage s'y introduisant et qui contaminerait l'aliment et/ou la litière *via* ses fèces ou son cadavre (rongeurs, oiseaux sauvages et autres). La gestion des épisodes en élevage repose sur la mise en place d'un traitement antibiotique (β -lactamines) qui permet de limiter la mortalité dans les lots atteints. L'arrêt du traitement (avant envoi à l'abattoir pour respecter le temps d'attente, par exemple) se traduit par une reprise rapide des signes cliniques et de la mortalité.

Les données disponibles sur la présence de *C. botulinum* dans les tissus de volailles sont issues, dans leur majorité, des diagnostics portant sur des animaux présentant des signes cliniques. L'analyse par PCR en temps réel d'échantillons de foies est la méthode recommandée pour confirmer le diagnostic. Ces résultats ne renseignent pas, dans la majorité des cas, sur la quantité de bactéries ou de toxine présentes dans le tube digestif et les différents tissus. D'après les éléments disponibles dans la littérature, *C. botulinum* peut être détecté dans différents organes et fluides biologiques chez les animaux présentant des signes cliniques : foie, rate, rein, jabot, contenu intestinal, contenu caecal, bile, gésier, estomac et cloaque (Pigatto *et al.* 2007; Masters et Palmer 2021). D'autres études rapportent un portage asymptomatique chez les animaux issus d'élevages atteints (Dohms *et al.*, 1982, Roberts and Aitken, 1974). Dans le lot, après disparition des signes cliniques, la détection de *C. botulinum* dans le foie peut atteindre 60 à 100% des volailles testées (Communication LNR Botulisme animal). Un portage asymptomatique a été mis en évidence dans différents élevages de poulets de chair notamment lors d'enquêtes épidémiologiques induites par la découverte de foyers bovins dus au type D/C auquel les volailles, *Gallus gallus* en particulier, s'avèrent peu ou pas sensibles (Le Maréchal *et al.* 2021; Souillard *et al.* 2021).

S'agissant des œufs, il est admis qu'il n'existe pas de contamination verticale. Aucune analyse jusqu'à ce jour n'a permis de détecter la bactérie ou la toxine dans le contenu (jaune ou blanc) des œufs. La ponte est interrompue chez les femelles atteintes de botulisme. En revanche, la coquille d'œuf peut être contaminée par *C. botulinum* lorsque l'œuf est souillé par des fientes contaminées ou, après collecte, lorsqu'il est placé en contact avec des surfaces contaminées (p. ex. tapis de ponte).

3.1.5. *C. botulinum* et denrées alimentaires d'origine animale (DAOA)

La bibliographie concernant la prévalence et la maîtrise des *C. botulinum* du groupe III (types C, D et mosaïques C/D, D/C) dans les DAOA est très peu abondante. La majorité des travaux ont porté sur les souches des groupes I (protéolytiques types A et B) et II (non protéolytiques types B et E) qui sont majoritairement impliqués dans les cas humains. Dans l'ensemble des données publiées jusqu'en 1993, la mention du type C a concerné la volaille (Greenberg *et al.* 1966) et le porc (Roberts et Smart 1977), cette détection apparaissant sporadique comparativement à celle des types A et B, dans un corpus de références où les études sont rares et décrivent des prévalences faibles.

La maîtrise des *C. botulinum* dans les DAOA est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures d'hygiène et de facteurs : traitement thermique, diminution de l'activité de l'eau (a_w) (ajout de sel ou séchage), ajout de nitrites ou d'autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie (Lund et Peck 2013). L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause la conclusion de Roberts et Gibson (1979) selon laquelle les mesures de maîtrise appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de types A et B seront efficaces pour les types C et D. Ceci semble pouvoir être affirmé pour les traitements thermiques des cellules végétatives et les spores. Les spores du groupe I sont souvent considérées comme une référence de « résistance ». Leur maîtrise par un procédé thermique permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier des souches du groupe III. Les toxines botuliques des types C et D semblent plus thermorésistantes que celles des types A, B, E. Cependant, des traitements thermiques supérieurs à 90 °C/2 min permettent l'inactivation totale de ces toxines. Le type E semble légèrement plus sensible que le type A permettant de tenir le même raisonnement pour les traitements thermiques (spores et toxines).

La température, le pH ou l' a_w contrôlant la croissance des souches du groupe I (protéolytiques type A et B) permettront très vraisemblablement également le contrôle des souches du groupe III (Roberts et Gibson 1979), ces dernières présentant de moindres capacités à se développer à basse température, bas pH ou faible a_w . Les souches du groupe II sont dites psychrotrophes (type E) en raison de leurs capacités à se multiplier dès 3°C. L'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF) au Royaume-Uni présente des lignes directrices pour le contrôle de *C. botulinum* non-protéolytique dans les aliments. Elles sont basées sur le maintien des denrées alimentaires à une température inférieure à 3°C, à un pH inférieur à 5,0, à une teneur en sel supérieure à 3,5 % et/ou à une a_w inférieure à 0,97. Ces lignes directrices considèrent également les effets combinés de traitements thermiques et de facteurs de maîtrise, établissant solidement grâce à des tests d'épreuve microbiologique ou des modèles prévisionnels, l'absence de croissance et de production de neurotoxine botulique (ACMSF 2020).

3.2. Maîtrise des *C. botulinum* type C/D et mosaïque et E en filière avicole

Les mesures de gestion à appliquer dans un élevage de volailles en cas d'épisode de botulisme ne sont actuellement pas définies réglementairement. Une gestion au cas par cas est appliquée par les DDPP en fonction des espèces et de l'atteinte des lots. Les mesures sont, dans la majorité des cas, encadrées par arrêté préfectoral, d'abord de mise sous surveillance (APMS), puis de déclaration d'infection (APDI) lorsque le botulisme est confirmé. Après avis favorable de la DDPP, les animaux issus de lots ayant connu un épisode de botulisme et ne présentant pas de signe clinique sont envoyés à l'abattoir. Concernant le devenir des œufs dans les élevages de poules pondeuses, des mesures peuvent être mises en place au cas par cas, notamment le tri des œufs souillés (Le Bouquin *et al.* 2017).

Réglementairement⁶, l'envoi d'un lot de volailles malades à l'abattoir est interdit. Si ces dispositions sont appliquées, il est peu probable que des volailles atteintes de botulisme clinique se retrouvent sur la chaîne d'abattage. On peut néanmoins envisager la possibilité que des cas associés à des signes cliniques peu marqués surviennent dans le lot dans les heures précédant l'enlèvement des animaux. La situation la plus plausible est celle du risque éventuel lié aux volailles (ayant survécu ou non touchées par la maladie) issues d'un lot dans lequel la maladie a été diagnostiquée.

Les données scientifiques recueillies ne permettent pas de conduire une évaluation quantitative du risque lié aux produits animaux issus de lots en incubation ou atteints du botulisme. Afin d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision, les experts ont procédé à l'évaluation des mesures de maîtrise

⁶ Arrêté du 30 mai 2008 relatif aux conditions sanitaires auxquelles doivent satisfaire les lots de volailles et de lagomorphes en vue de leur abattage pour la consommation humaine pris en application du règlement (CE) n° 853/2004.

du danger applicables tout au long de la filière avicole (de l'élevage à la consommation) lors de la détection d'un foyer de botulisme en suivant les étapes suivantes :

- évaluation qualitative de la probabilité d'émission du danger dans les tissus de volailles et œufs (en fonction du statut clinique) ;
- identification des causes de contamination des animaux, des produits (viandes et œufs) ainsi que l'exposition des opérateurs ;
- évaluation des possibilités de contamination, de croissance et de toxinogenèse de *C. botulinum* de l'élevage à la consommation avec comme point de départ un foyer clinique ;
- évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise existantes vis-à-vis du danger (transformation des denrées alimentaires d'origine animale et des sous-produits animaux).

Bien que les volailles puissent être atteintes de botulisme E et A, la majorité des foyers de botulisme aviaire reconnus en France sont de type C/D et les poulets sont, contrairement à d'autres espèces comme les dindes, plus résistants cliniquement aux types D et D/C. L'expertise s'est focalisée principalement sur les types C, C/D, D, D/C. Le type E a été pris en considération pour l'évaluation de l'impact des procédés de transformation.

Aussi, les réponses aux questions telles que reformulées par le GT sont les suivantes :

1. Dans le cas d'un foyer de botulisme aviaire, les produits issus d'animaux (viande, abats, œufs) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives/spores/toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?

Les probabilités de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxines) dans les différents tissus de volailles et œufs ont été évaluées qualitativement (cf. tableaux 4 et 5 du rapport) selon deux contextes : celui d'un élevage cliniquement atteint de botulisme et celui d'un élevage apparemment indemne mais incriminé comme étant la source de contamination d'élevages de bovins dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

Dans le cas d'un élevage cliniquement atteint, trois catégories de volailles ont été considérées : (1) les volailles sans signes cliniques, (2) les volailles en fin de période d'incubation et (3) les volailles sans signes cliniques dans l'élevage après élimination des malades et traitement antibiotique.

Dans le cas des animaux en provenance d'un lot atteint de botulisme, le système digestif (y compris le foie) et les parties du corps en contact direct avec l'environnement extérieur (pattes, peau, plumes) ont été identifiés comme les plus à risque en termes de contamination par les cellules végétatives, spores ou toxines.

Le portage digestif persiste dans le lot atteint après disparition des signes cliniques. Le foie des volailles malades est l'organe dans lequel *C. botulinum* est le plus régulièrement détecté. Bien que non recherchée en routine dans le foie, la présence de toxine y est également rapportée. Dans un lot atteint de botulisme, après disparition des signes cliniques, la détection de *C. botulinum* dans le foie peut atteindre 60 à 100% des volailles testées.

Des infections inapparentes sont détectées dans des lots de poulets infectés par *C. botulinum* D/C, toutefois aucune donnée publiée ne fait référence à la détection de la bactérie (ou sa toxine) en dehors du contenu du tube digestif de ces animaux.

Pour ce qui concerne les œufs, le danger est surtout lié à la présence de spores sur la coquille, évaluée avec une probabilité « peu élevée ».

2. Dans la filière avicole, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits à base d'œufs et de viande ?

- Quelle seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?
- Quels sont les impacts sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande ?

Au stade de l'élevage, le respect des bonnes pratiques d'élevage et l'application rigoureuse des mesures de biosécurité prenant en compte les différentes sources et véhicules de contamination peuvent permettre de réduire le risque d'introduction et de persistance de *C. botulinum* dans les élevages avicoles. Une mesure importante repose en outre sur une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, avec l'enlèvement systématique des cadavres de volailles présents dans les bâtiments et les parcours, et leur stockage dans un équipement adapté permettant leur conservation, avant transfert dans un bac d'équarrissage.

Suite à un foyer de botulisme aviaire, pour prévenir les récurrences fréquentes dues à la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage, un chantier renforcé de nettoyage et désinfection doit être lancé pour décontaminer les bâtiments d'élevage, matériels, abords et parcours. Des mesures sont aussi nécessaires pour traiter les effluents et aliments contaminés.

La vaccination est également envisageable mais aucun vaccin botulique destiné aux volailles ne dispose néanmoins d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) en France.

Dans la filière « volailles de chair »

Du transport à l'abattage, toutes les étapes du processus (jusqu'à l'enlèvement du tube digestif) entraînant l'excrétion sont considérées comme des étapes clés au regard du transfert des *C. botulinum* vers la peau ou le muscle. Après l'étape d'éviscération, les contaminations sont généralement qualifiées d'indirectes, par contact entre carcasses et/ou contact de la carcasse avec une surface contaminée (équipement, matériel, opérateurs...). Bien que non spécifiques à *C. botulinum*, les mesures de biosécurité en élevages ainsi que les Bonnes Pratiques Hygiéniques (BPH) d'abattage sont de nature à limiter ce type de contaminations. En l'absence de CCP (*Critical Control Point*), toutes les démarches permettant d'attester de leur mise en place et de leur efficacité doivent être encouragées.

Lorsque le statut du lot est connu (*i. e.* élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué), la séquence transport-abattage doit être effectuée de manière logistique (*i. e.* préférentiellement en fin de journée et avant une opération de nettoyage et de désinfection renforcée utilisant un produit sporicide) afin de limiter les transferts de contamination entre lots et vers les surfaces. Le GT recommande d'exclure de la consommation humaine les foies et autres abats issus de ces lots.

Les possibilités de contamination, de croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* des types C, D, mosaïques, et E (non protéolytique) ont été évaluées au cours de la transformation de trois types de produits de deuxième et troisième transformation : produits crus à cuire (foies de volaille et escalope de poulet), produits cuits/appertisés (foies gras [cuit / mi-cuit]) et une salaison de volailles (ex : saucisson sec de poulet) (section 3.4.2 du rapport). Cette sélection a permis d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, traitement thermique, séchage, ajout de sel et de conservateurs.

La conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe sur la base de bonnes pratiques d'hygiène et de la démarche HACCP⁷ sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, croissance ainsi que la production de toxines.

⁷ Hazard Analysis Critical Control Point (analyse des dangers, points critiques pour leur maîtrise) ; Démarche qui identifie, évalue et maîtrise les dangers significatifs au regard de la sécurité des aliments (NF V01-002: 2008).

L'application rigoureuse de la chaîne du froid tout au long du processus de transformation puis lors de la conservation des viandes est un point clé de la maîtrise de la croissance et de la toxinogenèse de *C. botulinum*.

S'agissant de l'impact des traitements thermiques, les barèmes retenus pour les produits considérés permettent :

- l'inactivation totale des cellules végétatives et l'inactivation partielle des toxines (totale à partir 90°C/2min ou traitement équivalent) (foies frais, foie gras mi-cuit) ;
- l'inactivation des spores, des cellules et des toxines (foie gras cuit selon un barème minimal de 110°C / 20 min ou traitement équivalent).

Les conditions de température, de pH, d'activité de l'eau et de sel sont des facteurs clefs dans la maîtrise de *C. botulinum* lors de la fabrication des salaisons de volailles.

Dans la filière œufs et ovoproduits

Les points-clés de maîtrise vont reposer sur les bonnes pratiques (de production, d'hygiène, de biosécurité, de fabrication) limitant les transferts de contamination depuis la coquille jusqu'au jaune et au blanc. Toute démarche planifiée permettant d'attester de la mise en œuvre de ces Bonnes Pratiques doit être encouragée. Pour les ovoproduits, les traitements thermiques mis en œuvre ne sont pas suffisants pour inactiver les spores. Le point-clé de maîtrise sera alors la chaîne du froid qui doit intervenir rapidement lors de la transition post-traitement thermique.

3. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?

A chacune des étapes du processus d'abattage, le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition professionnelle au regard des principaux modes de transmission :

- inoculation suite à une blessure profonde par les becs, griffes, éperon, coupure avec des objets contaminés ;
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long de la séquence poulailler-abattoir concerne les éleveurs, les ramasseurs, les chauffeurs et les intervenants sur chaîne. Il convient de noter qu'au regard des modes de transmission considérés, les personnes les plus exposées sont les éleveurs et les ramasseurs.

Toutes les possibilités d'exposition professionnelle ont été présentées, même si leur survenue est hautement improbable. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir, contrairement à d'autres maladies (cas de la chlamydia aviaire). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et/ou que les bonnes pratiques d'hygiène et d'abattage sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.

Botulisme par inoculation

Il est très improbable que les blessures infligées par les animaux vigiles, souvent superficielles, soient suffisamment profondes pour créer des conditions d'anaérobiose permettant, après la germination de spores de *C. botulinum*, la production de toxine et la survenue d'un botulisme chez les ramasseurs et les accrocheurs qui doivent être équipés systématiquement d'un équipement de protection individuelle (EPI) et de gants épais notamment.

Toute manipulation d'objet coupant/piquant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation suite à une blessure ou une coupure avec un objet possiblement contaminé. L'utilisation d'outils individuels serait responsable de 15% des accidents à l'abattoir (Ministère du travail 2009). Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter le risque de botulisme

par coupure. Dans tous les cas, il convient d'attirer l'attention sur la nécessité de désinfecter très soigneusement toutes les blessures chez les travailleurs et recouvrir toute plaie non cicatrisée.

Botulisme par inhalation

Les personnes les plus exposées aux aérosols durant la séquence poulailler-abattoir sont les ramasseurs, les accrocheurs et les opérateurs en charge du nettoyage sous pression des équipements (p. ex. plumeuse). L'exposition de ces personnes sera également dépendante de la conception des locaux (poulaillers, salle d'accrochage).

La nécessité que la toxine soit présente en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores ne causera pas cette forme de botulisme. Les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont pas en place dans les voies respiratoires supérieure et inférieure. Suite à l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée par l'escalator mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme. Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.

Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque, de même que le port de gants (et leur changement fréquent) au poste de vérification de l'éviscération et lors de la manipulation des foies.

4. Quel est l'impact sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés appliqués pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux ? (plumes, sang, pattes, tête, viscères...)

Le règlement (CE) n°1069/2009 classe les sous-produits animaux en trois catégories sur la base de leur risque potentiel pour la santé humaine et animale et l'environnement (C1/C2/C3). Seules certaines matières de catégorie 3 peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux et ce après application d'un traitement approprié dans des installations de transformation agréées.

Les sous-produits de volailles valorisables en alimentation animale incluent : têtes de volailles, plumes, sang, pattes, œufs collectés au cours de l'éviscération, œufs déclassés, sous-produits de la filière ovoproduits.

Les matières de catégorie 3 issues de volailles doivent être transformées conformément à l'une des méthodes définies dans le règlement (CE) n°142/2011 (méthodes 1 à 5 cf. tableau 6 du rapport et méthode 7). Dans le cas de la méthode 7, il s'agit de tout autre procédé autorisé par l'autorité compétente, pour lequel l'exploitant a réalisé une analyse des dangers et démontré la capacité du procédé à les maîtriser.

L'application des procédés selon les méthodes 1 à 5 permettent une inactivation totale des spores de *C. botulinum*. La plupart des usines de transformation de catégorie 3 en France utilisent une méthode 7, et le GT n'a pas connaissance des procédés utilisés.

La valorisation en alimentation animale des sous-produits issus des lots qui ont été cliniquement atteints nécessiterait l'application d'un traitement physique permettant l'inactivation des spores de *C. botulinum*.

3.3. CONCLUSIONS

Lors de la survenue d'un foyer de botulisme en élevage de volailles, les produits issus d'animaux sont susceptibles de contenir des spores, des cellules végétatives et des toxines de *C. botulinum* avec une prévalence et un niveau de contamination qui dépend du statut clinique des animaux. Le portage digestif

et la contamination du foie ont pu être mis en évidence chez des volailles avec ou sans signes cliniques issus d'un lot diagnostiqué de botulisme.

Dans la filière avicole, la mise en œuvre effective des bonnes pratiques (mesures de biosécurité, bonnes pratiques d'abattage, bonnes pratiques d'hygiène) et des procédures fondées sur l'HACCP ainsi que l'application des différents procédés de transformation sont de nature à maîtriser les transferts des spores de *C. botulinum*, leur germination, croissance ainsi que la production de toxines dans les denrées alimentaires (viandes et œufs). L'application des mesures de protection des opérateurs (comme le port d'EPI) et des bonnes pratiques d'hygiène (lavage des mains en particulier) permet également de maîtriser l'exposition des opérateurs à *C. botulinum*. La mise en place de toute démarche planifiée et supervisée et qui permettrait d'attester de la mise en place et de l'efficacité de ces bonnes pratiques est recommandée.

Lorsque le statut du lot est connu (élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué), les experts recommandent de renforcer l'application de ces bonnes pratiques et de mettre en place les mesures suivantes :

- la séquence transport-abattage doit être effectuée de manière logistique (*i. e.* préférentiellement en fin de journée et avant une opération de nettoyage et de désinfection renforcée) afin de limiter les transferts de contamination entre lots et vers les surfaces ;
- l'exclusion de la consommation humaine des foies et autres abats issus de ces lots ;
- la valorisation en alimentation animale de tous les sous-produits issus des lots après l'application d'un traitement physique permettant l'inactivation des spores de *C. botulinum*.

Les principales sources d'incertitudes ainsi que les modalités de leur prise en compte par le groupe de travail sont présentées en annexe 3 du rapport. Le CES BIORISK émet des recommandations pour l'acquisition de données concernant plus particulièrement les points suivants :

- des recherches du danger dans les prélèvements autres que le foie, le sérum et le contenu du tube digestif en particulier pour des animaux sans signes cliniques ;
- l'effet des traitements physiques de conservation des aliments au regard des différentes formes de *C. botulinum* (à confirmer en matrices alimentaires).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions des CES BIORISK et SABA et du GT « Botulisme bovin - aviaire ».

L'Agence note que, en France, les produits avicoles ont très rarement été identifiés comme source de botulisme humain. La majorité des foyers de botulisme aviaire reconnus en France sont de type C/D, D, D/C et C, le type E n'ayant pas été mis en évidence en élevage de volailles depuis 2000. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques pourrait expliquer la quasi-absence de cas de botulisme humain associés. Des données recueillies lors de l'expertise, aucun cas de botulisme en milieu professionnel, tant en élevage qu'à l'abattoir, n'a été rapporté.

L'Agence souligne que les données scientifiques ne permettent pas de conduire une évaluation quantitative du risque lié aux produits animaux issus de lots de volailles en incubation ou atteints du botulisme de types C, D ou mosaïques C/D ou D/C. L'approche retenue a donc consisté à évaluer l'efficacité des mesures appliquées depuis l'élevage des animaux jusqu'à la consommation pour prévenir les contaminations et maîtriser le danger dans des produits potentiellement contaminés.

Tout au long de la chaîne alimentaire des produits avicoles (viandes et œufs), la mise en œuvre effective des mesures de biosécurité et des bonnes pratiques, notamment d'hygiène, ainsi que l'application des différents procédés de transformation et de traitement sont de nature à maîtriser le risque lié à la consommation de tels produits issus de volailles contaminées par *C. botulinum* de types C, D ou mosaïques C/D ou D/C. Pour les professionnels travaillant en abattoir, l'application effective des

mesures de protection et d'hygiène qui y sont prévues permet là aussi de maîtriser le risque lié à leur éventuelle contamination.

En cas de foyer clinique dans un élevage, et jusqu'à la maîtrise complète de celui-ci, grâce notamment aux opérations de décontamination qui y sont réalisées, la conduite à l'abattoir d'animaux sans signes cliniques issus de cet élevage gagnerait à être accompagnée de mesures renforcées permettant de réduire davantage le risque de contamination des produits en aval de la chaîne.

Toutefois, l'Agence souligne que les mesures de gestion à appliquer dans un élevage de volailles suspect ou atteint de botulisme ne sont actuellement pas définies réglementairement. Une telle réglementation serait de nature à donner un caractère obligatoire à la mise en œuvre de ces mesures, renforçant de ce fait la maîtrise du danger aussi bien au niveau de l'élevage que dans la chaîne alimentaire.

Enfin, l'Agence souligne l'importance de maintenir les enquêtes épidémiologiques lors de la détection de foyer de botulisme en France, avec pour objectif d'améliorer les connaissances sur le cycle épidémiologique de *C. botulinum* en élevage et de recueillir des données sur la prévalence et la concentration du danger dans les produits animaux.

A blue ink signature, appearing to be 'R. Genet', is written over a large, stylized blue oval shape.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

Botulisme ; *C. botulinum* du groupe III ; volailles ; viandes de volailles ; œufs ; ovoproduits ; sous-produits animaux.

Botulism; C. botulinum group III; poultry; poultry meats; eggs; egg products; animal by-products.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis relatif à l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation des cas de botulisme (saisine n°2019-SA-0114). Maisons-Alfort : Anses, 13 p. Cet avis est associé à un rapport d'expertise collective.

Évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation des cas de botulisme

**Saisine n°2019-SA-0114 (filiale avicole)
Saisines liées n°2019-SA-0112 à 0115 (Rapport socle Botulisme)**

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé « Évaluation des risques biologiques dans les aliments »

Comité d'experts spécialisé « Santé et bien-être des animaux »

Groupe de travail « Botulisme bovin-aviaire »

Décembre 2021

Citation suggérée

Anses. (2021). Évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation des cas de botulisme (saisine n°2019-SA-0114). Maisons-Alfort : Anses, Rapport d'expertise collective, 101 p.

Mots clés

Botulisme ; *C. botulinum* du groupe III ; volailles ; viandes de volailles ; œufs ; ovoproduits ; sous-produits animaux.

Botulism; C. botulinum group III; poultry; poultry meats; eggs; egg products; animal by-products

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Philippe FRAVALO – Professeur, CNAM - hygiène et microbiologie des produits avicoles et porcins, caractérisation moléculaire des dangers biologiques, analyse métagénomique des écosystèmes complexes (flores des contenus digestifs, flores en surface en industries agroalimentaires)

Membres

M. Michel FEDERIGHI – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - santé publique, aliments, hygiène, microbiologie, technologie, analyse des dangers, procédés d'inactivation

M. Jean-Pierre GANIÈRE - Retraité, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - microbiologie, biocides, maladies réglementées, évaluation des risques

M. Lionel GRISOT – Praticien Vétérinaire en Clinique vétérinaire - diagnostic, gestion en élevage, médecine vétérinaire

M. Didier HILAIRE - Adjoint au chef de la division Biologie, Centre d'études du Bouchet - DGA (Direction générale de l'armement) - types de *C. botulinum*, décontamination, aérobiocontamination

Mme Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU - Chef d'unité adjointe, unité Épidémiologie, Santé et Bien-être (EPISABE), Laboratoire Anses de Ploufragan-Plouzané-Niort - épidémiologie, analyse de données, santé travail

Mme Caroline LE MARÉCHAL-CONDY – Responsable du LNR botulisme aviaire, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - botulisme aviaire et bovin, diagnostic

M. François MEURENS – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - microbiologie, immunologie, médecine vétérinaire, vaccins

Mme Michèle TREMBLAY - Médecin conseil en maladies infectieuses et risques biologiques au travail, Direction de santé publique de Montréal - santé travail, risques professionnels, dangers, eaux usées

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

■ **CES « Évaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK)**

Président

M. Philippe FRAVALO – Conservatoire National des arts et métiers, Professeur. Hygiène et microbiologie des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire

Membres

Frédéric AUVRAY – École nationale vétérinaire de Toulouse, Ingénieur de recherche. Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie

M. Mickaël BONI (à partir de juin 2021) – Institut de recherche biomédicale des armées, vétérinaire en chef – Chef d'unité. Microbiologie, hygiène, salubrité et qualité des aliments, zoonose et infectiologie, sûreté sanitaire des aliments et de l'eau, inspection en sécurité sanitaire des aliments, traitement et contrôle sanitaire des EDCH

M. Frédéric CARLIN – INRAE, Directeur de recherche. Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort, Chef de service. Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech, Professeur. Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress (conservateurs, désinfectants)

M. Steven DURET – Irstea, Ingénieur de recherche. Modélisation, génie des procédés, transfert thermique

M. Michel FEDERIGHI – Oniris (École vétérinaire de Nantes) - Professeur. Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers

Mme Michèle GOURMELON (à partir de juin 2021) – IFREMER, Chargée de recherche. Bactériologie, biologie moléculaire, écologie microbienne – *Campylobacter*, bactéries du continuum terre-mer et bactéries marines.

M. Michel GAUTIER – Agrocampus Ouest, Professeur. Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés

M. Stéphane GUYOT – AgroSup Dijon, Maître de conférences. Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Santé publique France, Chargée de projet scientifique. Épidémiologie des maladies entériques et zoonoses

M. Renaud LAILLER – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chef de projet. Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments

M. Bertrand LOMBARD (à partir de juin 2021) – Anses, Direction de la Stratégie et des Programmes, Chef de projet. Analyse microbiologique des aliments, activités de référence, normalisation

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Chargée de projet scientifique. Virologie, méthodes de détection

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRAE, Ingénieur de recherche. Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées

M. Éric OSWALD – CHU Toulouse, Professeur des universités. Infectiologie clinique, écologie microbienne, *E. coli*

M. Pascal PIVETEAU (à partir de juin 2021) – INRAE. Écologie microbienne, Écologie des bactéries pathogènes dans les agroenvironnements

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier, Professeur des universités. Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie

Mme Nalini RAMA RAO – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal

Mme Régine TALON – INRAE, Directrice de recherche. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale

Mme Muriel THOMAS – INRAE, Directrice de recherche. Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims, Professeur des universités. Parasitologie, infectiologie

■ CES « Santé et Bien-être de animaux » (SABA)

Président

M. Gilles MEYER – Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

Membres

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, École nationale vétérinaire de Toulouse - virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRAE Clermont-Ferrand – Theix - bien-être animal

M. Henri-Jean BOULOUIS – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie

M. Éric COLLIN – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies vectorielles, maladies à prion, épidémiologie, maladies des ruminants

M. Jean-Claude DESFONTIS – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – physiologie animale, bien-être animal, médicament vétérinaire

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Vétérinaire épidémiologiste, SCIENSANO (B) – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire. SCIENSANO (B) - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées

M. Étienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRAE Toulouse – bactériologie, antibiorésistance, maladies des poissons

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire libéral - médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - infectiologie, maladies réglementées, zoonoses

Mme Viviane HENAU – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie et appui à la surveillance, Anses Lyon – épidémiologie quantitative, évaluation de risque

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRAE Clermont-Ferrand - Theix - zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques

Mme Sophie LE BOUQUIN - LENEVEU – Cheffe d'unité adjointe, Unité Épidémiologie, santé et bien-être, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - épidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire d'Alfort - virologie, immunologie, vaccinologie

Mme Élodie MONCHATRE-LEROY – Directrice du Laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses Nancy - virologie, épidémiologie, évaluation de risques, faune sauvage

Mme Monique L'HOSTIS – Retraitée, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Parasitologie, santé des abeilles

M. François MEURENS – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - virologie, immunologie, vaccinologie, pathologie porcine

Mme Virginie MICHEL – Coordinatrice nationale bien-être animal - Anses - bien-être animal, approche intégrée de la santé animale, épidémiologie, évaluation de risque

M. Pierre MORMEDE – Directeur de recherche émérite INRAE - bien-être animal, stress

M. Hervé MORVAN – Chef de service du laboratoire de bactériologie vétérinaire, Labocéa 22 - bactériologie, diagnostic de laboratoire

Mme Carine PARAUD – Chargée de projet de recherche en parasitologie, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – parasitologie, maladies des ruminants

Mme Ariane PAYNE – Chargée d'étude, ONCFS - épidémiologie, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques

M. Michel PEPIN – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – infectiologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants

Mme Carole PEREZ – Maître de conférences, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) - infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort - bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège - épidémiologie, évaluation de risque

Mme Gaëlle SIMON – Cheffe d'unité adjointe, Unité Virologie immunologie porcines, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort - virologie, immunologie, maladies des monogastriques

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal - épidémiologie, biosécurité, zoonose, évaluation de risque

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée de manière transversale par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) et l'Unité d'évaluation des risques liés à la santé, à l'alimentation et au bien-être des animaux (UERSABA) sous la direction de Nathalie ARNICH (adjointe au chef d'unité UERALIM) et de Mme Charlotte Dunoyer (Cheffe d'unité UERSABA).

Coordination et contribution scientifique

Mme Pauline KOOH – Cheffe de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

M. Laurent GUILLIER, Chef de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Direction générale de l'alimentation (DGAL)

Mme Khadija AYADI-AKROUT - Mission des urgences sanitaires

M. Frederic PRONNIER - Référent national abattoir

Mme Christèle MATHONIERE - Bureau de la prévention des risques sanitaires en élevage / sous-produits animaux

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations.....	10
Liste des tableaux	11
Liste des figures.....	12
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise	13
1.1 Contexte	13
1.2 Objet de la saisine	13
1.3 Modalités de traitement.....	14
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts	15
2 Éléments d'information sur le danger	16
2.1 Caractéristiques de <i>Clostridium botulinum</i> et des toxines botuliques	16
2.1.1 Classification des toxines botuliques et des souches productrices	16
2.1.2 Caractéristiques microbiologiques de <i>C. botulinum</i>	17
2.1.3 Caractéristiques des toxines botuliques	20
Maladie humaine	21
2.1.4 Généralités, signes cliniques et aspects épidémiologiques	21
2.1.5 Données de surveillance humaine.....	24
2.1.6 Évaluation du caractère zoonotique des <i>Clostridium botulinum</i> du groupe III (types C, D et mosaïques).....	26
2.2 Maladie animale (botulisme aviaire).....	29
2.2.1 Aspects réglementaires.....	29
2.2.2 Données de surveillance relatives au botulisme chez les volailles en France.....	29
2.2.3 Synthèse	35
2.2.4 Cycle épidémiologique de <i>Clostridium botulinum</i> en élevage de volailles.....	36
2.2.5 Pathogénèse et signes cliniques	38
2.2.6 Présence et concentration des différentes formes de <i>C. botulinum</i> dans les tissus chez les volailles	41
2.3 Denrées alimentaires d'origine animale (DAOA).....	44
2.3.1 Prévalence, croissance et toxinogénèse dans les DAOA (viandes et produits carnés, œufs et ovoproduits)	44
2.3.2 Impact des procédés de transformation/production en filière avicole.....	46
3 Maîtrise des <i>C. botulinum</i> type C, D et mosaïques en filière avicole	54
3.1 Introduction.....	54
3.2 Élevage	55
3.2.1 Gestion de foyers de botulisme en élevage de volailles	55

3.2.2	Mesures de réduction de risque en élevage	57
3.3	Parties du corps, tissus et œufs présentant un risque d'émission du danger représenté chez les volailles par <i>C. botulinum</i> et la neurotoxine botulique	57
3.3.1	Volailles appartenant à un lot cliniquement atteint de botulisme aviaire.....	58
3.3.2	Volailles appartenant à un lot infecté asymptomatique (élevage sans historique de botulisme).....	59
3.4	Filière volaille de chair	60
3.4.1	Transport et abattage : analyse des voies de contamination de la viande et d'exposition professionnelle	60
3.4.2	Transformation	68
3.5	Filière ponte.....	72
3.5.1	Introduction	72
3.5.2	Collecte-transport-conditionnement : analyse des voies de contamination des œufs	73
3.5.3	Transformation	73
3.6	Efficacité des procédés de traitement des sous-produits de volailles en vue de leur valorisation	76
3.6.1	Aspects réglementaires.....	76
3.6.2	Efficacité des procédés de traitement des sous-produits animaux.....	77
4	Conclusions du groupe de travail	79
5	Bibliographie.....	84
	Annexe 1 : Lettre de saisine	95
	Annexe 2 : Description et analyse des publications sur les cas humains de botulisme de type C associés à la consommation de volailles	97
	Annexe 3 : Analyse des incertitudes	100

Sigles et abréviations

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
APDI	Arrêté préfectoral de déclaration d'infection
APMS	Arrêté préfectoral de mise sous surveillance
ATU	Autorisation temporaire d'utilisation
BoNT	<i>Botulinum Neuro Toxin – Neurotoxine botulique</i>
CNR	Centre National de Référence
DDPP	Direction Départementale de la Protection des Populations
DGAL	Direction générale de l'Alimentation
DO	Déclaration Obligatoire (législation)
EPI	Equipement de protection individuelle
IAM	Inspection <i>ante mortem</i>
ICA	Information sur la chaîne alimentaire
IPM	Inspection <i>post mortem</i>
IU	<i>International Unit</i> (Unité internationale)
LNR	Laboratoire National de Référence
LSA	Loi de Santé Animale
MLD50	(<i>Mouse Lethal Dose</i>) Dose létale médiane chez la souris
MUS	Mission des Urgences Sanitaires
PAI	Produit Alimentaire Intermédiaire
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
RNOEA	Réseau National d'Observations Epidémiologiques en Aviculture
SI	Système international
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment Receptor</i>
TEC	Tonne équivalent carcasse
VS	Vétérinaire sanitaire

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification et caractéristiques physiologiques des <i>C. botulinum</i> et des espèces de <i>Clostridium</i> neurotoxigènes en conditions de laboratoire	19
Tableau 2 : Hiérarchisation par ordre d'importance décroissante des véhicules de contamination (colonne de gauche) de <i>C. botulinum</i> (formes sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volaille.	38
Tableau 3 : Impact des procédés d'inactivation microbienne applicables aux DAOA sur <i>C. botulinum</i>	53
Tableau 4 : Evaluation qualitative de la probabilité de présence de <i>C. botulinum</i> (cellules, spores, toxine) dans différents tissus et les œufs de volailles d'un lot atteint de botulisme (volailles avec ou sans signes cliniques) ou précédemment atteint de botulisme (après disparition des signes cliniques)	58
Tableau 5 : Evaluation qualitative de la probabilité de présence de <i>C. botulinum</i> (cellules, spores, toxine) dans différents tissus et les œufs de volailles d'un lot porteur asymptomatique (sans signe clinique)	59
Tableau 6 : Barèmes prévus par le règlement (CE) n°142/2011 pour les méthodes 1 à 5	77
Tableau 7 : Réduction logarithmique calculée pour les quatre méthodes normalisées de traitement des sous-produits définies dans le règlement (UE) n°142/2011	78

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure des toxines botuliques C, D, C/D et D/C (Woudstra <i>et al.</i> 2012).....	17
Figure 2 : Schéma du mode d'action des toxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma).....	21
Figure 3 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (n = 41) en France entre 2008 et 2018 en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique. D'après (Mazuet <i>et al.</i> 2011; Mazuet <i>et al.</i> 2018; Mazuet <i>et al.</i> 2014)	25
Figure 4 : Répartition des foyers de botulisme animal recensés de 2009 à 2019 par espèce (n = 592) (Source CNR/LNR).....	30
Figure 5 : Évolution des foyers de botulisme animal recensés par année de 2009 à 2019 par espèce (n = 592) (Source CNR/LNR)	30
Figure 6 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux d'élevage recensés de 2005 à 2019 (n=247) (Source CNR/LNR).....	31
Figure 7 : Répartition des types de botulisme pour les foyers d'oiseaux d'élevage recensés de 2010 à 2019 (n = 231) (Source CNR/LNR).....	31
Figure 8 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux d'élevage (n = 91) (Source LNR)	32
Figure 9: Répartition des foyers de botulisme recensés sur des oiseaux d'élevage de 2013 à 2019 (n = 77) (Source LNR)	33
Figure 10 : Répartition des types de <i>C. botulinum</i> recensés par espèce de volailles (n = 81 foyers) de 2013 à 2019 (Source LNR).....	34
Figure 11 : Répartition des foyers par catégorie d'animaux et par pays (n = 114) de 2016 à 2020 (Source ANIBOTNET)	35
Figure 12 : Véhicules d'introduction de <i>C. botulinum</i> (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles	37
Figure 13 : Pathogenèse du botulisme chez le poulet de chair	39
Figure 14 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D (minutes)	48
Figure 15: Représentation schématique simplifiée de la filière avicole	54
Figure 16 : Principales sources et voies de contamination de la viande (flèches noires) et d'exposition des opérateurs (flèches grises) par <i>C. botulinum</i> du transport à la fin de la chaîne d'abattage	65
Figure 17 : Schéma simplifié de l'organisation de la filière « œufs ».....	72
Figure 18 : Diagramme simplifié de transformation des ovoproduits.....	75

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par des bactéries du genre *Clostridium* et qui se manifeste par des paralysies flasques pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Il existe neuf types connus de toxines botuliques.

Le botulisme animal en France concerne essentiellement les oiseaux (sauvages et d'élevage) et les bovins. Chez les oiseaux, les types toxiques en cause sont C, D, mosaïques C/D et D/C et exceptionnellement le type E. Au niveau national, l'incidence est d'environ 25 foyers par an (volailles¹ et avifaune confondues), avec cependant des variations annuelles parfois notables, par exemple en volailles en 2007 (121 foyers décelés) et 2008 (102 foyers). Bien qu'il s'agisse d'une maladie animale de première catégorie², il n'y a pas à l'heure actuelle de mesures de police sanitaire établies par la réglementation, lors de la confirmation d'un foyer de botulisme animal, ce qui conduit à une gestion au cas par cas par les directions départementales de la protection des populations (DDPP) et la mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL. Ces services peuvent s'appuyer sur deux documents émis par l'Afssa : le rapport sur le botulisme animal établi en 2002 et l'avis rendu en janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire. Les rapports et avis cités étant relativement anciens, la DGAL a saisi l'Anses via 4 saisines (saisines n°2019-SA-0112 à 2019-SA-0115), dont l'objet est une demande d'actualisation des connaissances et des évaluations de risque pour la santé humaine et/ou animale.

1.2 Objet de la saisine

L'expertise a été réalisée en deux étapes :

1. Une mise à jour des connaissances sur *Clostridium botulinum* (types C, D, mosaïques C/D et D/C et E) effectuée par le groupe de travail (GT) « Groupe socle botulisme », portant sur les caractéristiques microbiologiques, les maladies humaine et animales (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types dans l'environnement, le danger dans les denrées alimentaires d'origine animale ainsi que l'efficacité des méthodes et procédés d'inactivation.
2. Le traitement des questions d'évaluation des risques par des groupes de travail spécifiques (« Botulisme bovin-aviaire » ; « Décontamination » ; « Faune sauvage et environnement »).

La présente saisine porte sur l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation des cas de botulisme. Les questions posées dans la saisine sont les suivantes :

« Cette évaluation concerne le botulisme aviaire de type C, D, mosaïques C/D et D/C ou E et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière (...) »

1. Quel est le risque pour l'Homme lié à la consommation de produits à base d'œufs et de viande selon le procédé de transformation et les formes de conditionnement ? L'évaluation intégrera notamment la consommation des abats (foie, gésiers) provenant des animaux issus de lots atteints ou en

¹ Le terme « volailles » regroupe les espèces d'oiseaux domestiques et captives.

² Le statut du botulisme animal est susceptible d'évoluer suite à l'entrée en vigueur de la Loi de Santé Animale (cf. section 2.2.1)

période d'incubation. Comment l'état de santé des animaux (phase d'incubation, phase clinique ...) influence-t-il le risque pour le consommateur final ?

2. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques, présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
3. Quels processus de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande peuvent être considérés comme assainissants ?
4. Quelle seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?
5. Dans le cas où un traitement serait nécessaire, quelles seraient les mesures à prévoir pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères...) ? »

1.3 Modalités de traitement

L'Anses a confié au groupe de travail « Botulisme bovin - aviaire » rattaché aux comités d'experts spécialisés « Evaluation des risques biologiques dans les aliments (CES BIORISK, pilote) et « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA), l'instruction de cette saisine.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été soumis régulièrement aux CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques). Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Les travaux du GT « Botulisme bovin – aviaire » s'appuient essentiellement sur la mise à jour des connaissances sur les types C, D, mosaïques C/D et D/C et E de *Clostridium botulinum* effectuée par le GT « Groupe socle botulisme » complétées par d'autres sources documentaires listées dans la bibliographie.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires.

Compte tenu de l'analyse du contexte sanitaire et décisionnel, des données scientifiques recueillies dans le cadre du rapport socle, le GT propose de fournir le résultat de l'expertise sous la forme d'un profil de risque sanitaire. Le profil de risque tel que défini par la Commission du *Codex Alimentarius* (CAC 2007) comporte notamment une description du danger et des aliments impliqués, des informations sur les lieux et moyens d'entrée du danger dans la chaîne de production alimentaire, la prévalence et concentration du danger dans les aliments considérés et l'efficacité des options de gestion des risques (Guillier 2017). Cette approche permet de fournir des informations susceptibles d'aider le gestionnaire dans sa prise de décision.

Aussi, les questions de la saisine ont été reformulées par le GT :

1. Dans le cas d'un foyer de botulisme aviaire, les produits issus d'animaux (viande, abats, œufs) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives/spores/toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?
2. Dans la filière avicole, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits à base d'œufs et de viande ?
 - Quels seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?
 - Quels sont les impacts sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande ?

3. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques, présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
4. Quel est l'impact sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés appliqués pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères...) ?

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) »

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

2 Éléments d'information sur le danger

2.1 Caractéristiques de *Clostridium botulinum* et des toxines botuliques

2.1.1 Classification des toxines botuliques et des souches productrices

Clostridium botulinum appartient au genre *Clostridium* qui est affilié à la famille des *Clostridiaceae*, ordre des *Clostridiales*, classe des *Clostridia* et division des *Firmicutes*. Le genre *Clostridium* est constitué d'environ 200 espèces dont une quinzaine synthétisent des toxines entraînant des maladies chez l'être humain et/ou l'animal (Poulain et Popoff 2019). Ainsi, *Clostridium botulinum* est constitué d'un ensemble de souches bactériennes du genre *Clostridium* dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine protéique appelée la toxine botulique. Les *Clostridium botulinum* sont classés en trois groupes (I, II, et III) en fonction de leurs propriétés biochimiques et plus particulièrement en fonction de leurs propriétés protéolytiques (cf. tableau 1 ; page 19). Pour ces trois groupes, il existe également des espèces de *Clostridium* qui correspondent à des bactéries biochimiquement très proches des *Clostridium botulinum* mais qui ne produisent pas de toxine botulique. Ces espèces sont rattachées à la classification par groupe des *Clostridium botulinum*. D'autres espèces du genre *Clostridium*, autres que *C. botulinum*, présentent des souches qui produisent aussi des toxines botuliques et constituent les groupes IV³, V et VI (cf. tableau 1) des *Clostridium* producteurs de toxine botulique.

Les *Clostridium* producteurs de toxine botulique sont aussi classés en fonction du type de toxine qu'ils produisent. Neuf types de toxines botuliques ont été identifiés (A, B, C, D, E, F, G, H et X) mais seuls sept types (A à G) sont pris en compte pour la classification des *Clostridium botulinum* car les toxines de type H et X sont produites avec un autre type de toxine qui est majoritaire. Le tableau 1 donne la correspondance entre les groupes et les types toxiques. De façon générale, la classification liée au type de toxine produite est la plus employée. Cette approche prend aussi en compte le fait que différentes souches de *Clostridium botulinum* sont capables de produire simultanément deux ou trois types de toxine, le plus souvent avec des taux de production différents selon les toxines. Le type de la toxine produite majoritairement est indiqué en lettre majuscule et le type de la toxine minoritairement produite est indiqué en minuscule. Sont ainsi classifiées des souches de *Clostridium botulinum* Ba, Bf, Ab, Af, Bx, Bh et autres. Ces souches appartiennent généralement au groupe I des *Clostridium botulinum* (Barash et Arnon 2014; Zhang *et al.* 2018; Poulain et Popoff 2019).

Il existe, au sein de certains types, différents sous-types qui se distinguent entre eux par leurs séquences primaires, fruits de mutations dans le gène codant. Les types A, B et F comptent 8 sous-types chacun, le type E 12 sous-types. Aucun sous-type n'a été mis en évidence pour les types C, D, G, H et X, mais il existe pour les types C et D des toxines hybrides dites mosaïques C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012). La toxine mosaïque C/D est ainsi constituée de la chaîne légère de la toxine de type C et de la chaîne lourde de la toxine de type D. La toxine mosaïque D/C est constituée pour sa part de la chaîne légère de la toxine de type D et de la chaîne lourde de la toxine de type C (cf. figure 1). Le tableau 1 indique les différents sous-types identifiés. Pour éviter une inflation dans la désignation de sous-types, à partir de 2015, la communauté scientifique a proposé qu'un nouveau sous-type ne soit validé que si sa séquence en acides aminés différait de plus de 2,6 % de celle des autres sous-types du même type (Peck *et al.* 2017).

³ L'espèce *C. argentinense* du groupe IV était initialement nommée *Clostridium botulinum*.

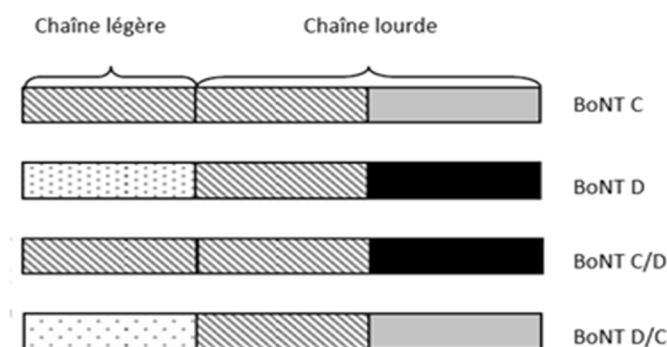


Figure 1 : Schéma de la structure des toxines botuliques C, D, C/D et D/C (Woudstra *et al.* 2012)

2.1.2 Caractéristiques microbiologiques de *C. botulinum*

2.1.2.1 Aspects microscopiques, macroscopiques et métaboliques

Les *Clostridium botulinum* sont des bacilles droits de grande taille pouvant aller jusqu'à 20 µm de long et 0,6 µm de large. Les bactéries sont positives à la coloration de Gram. Les *Clostridium botulinum* sont mobiles avec une ciliature péritriche. Ils ont la capacité de sporuler, ce qui permet aux souches de résister lorsque les conditions environnementales sont défavorables à la forme végétative. La forme sporulée peut être résistante à certaines opérations comme le traitement thermique ou la désinfection.

L'aspect macroscopique des colonies sur milieu gélosé est très hétérogène et il n'est pas possible de dégager des caractéristiques générales, d'autant que leurs caractères morphologiques évoluent souvent au cours de la culture. Certaines souches, par ailleurs, ne se développent qu'en milieu liquide.

Le métabolisme des *Clostridium botulinum* est de type chimio-organotrophe fermentaire, les produits terminaux du métabolisme sont des acides, généralement de type acétique, butyrique et propionique.

Le rôle physiologique des toxines botuliques n'est pas connu et leur présence n'est pas indispensable à la survie et à la croissance des souches qui les produisent (DasGupta 2006).

2.1.2.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse

■ Croissance

Les souches de *Clostridium botulinum* sont des anaérobies strictes, mais certaines souches peuvent néanmoins se développer lorsqu'un faible taux d'oxygène est présent. La viabilité des cellules végétatives diminue graduellement en présence d'oxygène, de manière variable selon les souches. Cependant les spores de *C. botulinum* peuvent survivre pendant de longues périodes à l'air et peuvent germer en présence d'oxygène (Lund et Peck 2013). Les autres conditions permettant la croissance, en particulier la température, varient en fonction des groupes de *Clostridium botulinum*. Le tableau 1 indique les températures de croissance pour les différents groupes de *Clostridium botulinum*. Ces températures de croissance sont assez similaires excepté pour le groupe II, dont la température optimale de croissance est plus basse de quelques degrés et dont les souches sont capables de se multiplier dans un environnement froid, *i.e.* à partir de 3 °C. La température de toxinogénèse est généralement similaire à celle de la croissance. Un pH inférieur à 5 inhibe généralement la croissance et la toxinogénèse. Une forte concentration en sel (au-dessus de 5 %) inhibe la croissance des *Clostridium botulinum* et la toxinogénèse.

■ Spore et sporulation

La formation de spores bactériennes est observée dans de nombreux environnements naturels ou anthropisés (Carlin 2011). La formation en zone humide des spores de *C. botulinum* de type C, D ou mosaïques ou E à partir des cadavres d'animaux en décomposition contribue probablement à leur survie et à leur dispersion (Espelund et Klaveness 2014). Les stades de développement et de dormance des bactéries sporulantes, incluant les clostridies, peuvent être représentés sous la forme d'un cycle biologique comprenant la germination d'une spore, sa multiplication sous forme de cellules végétatives dont certaines produisent à leur tour des spores (Dürre 2014). Lors du processus de sporulation, les cellules végétatives se différencient pour donner des (endo)spores. Ces spores possèdent des capacités de résistance à des agents physiques ou chimiques sans commune mesure avec celles des cellules végétatives dont elles sont issues. Les spores bactériennes peuvent rester en dormance et sans activité métabolique pendant de très longues périodes. La sporulation chez les *Clostridiaceae* est déclenchée par un appauvrissement du milieu environnant en nutriments et/ou par un signal de densité cellulaire (*quorum sensing*). Le déclenchement du processus de sporulation lui-même, ainsi que son rendement (*i.e.* le nombre et la proportion de cellules végétatives qui formeront une spore) sont variables selon les groupes et les souches, et sont sous la dépendance de nombreux facteurs nutritionnels et environnementaux (Gauvry *et al.* 2017). La germination des spores est déclenchée par des *stimuli* de natures diverses. Cependant, dans les environnements naturels, les inducteurs de germination les plus probables sont généralement des molécules de petite taille de type acides aminés, nucléosides, sucres, dont l'action peut être amplifiée par des co-facteurs (lactate, cations Na⁺ ou K⁺, ou anions) (Setlow, Wang et Li 2017). La germination se traduit par une perte des propriétés de résistance de la spore et un retour à la vie végétative lorsque les conditions favorables à la multiplication des cellules (certaines sont rassemblées dans le tableau 1) sont présentes.

■ Toxinogénèse

Les toxines botuliques sont produites uniquement par les cellules végétatives. Les quelques travaux relatifs à la régulation de leur synthèse ne peuvent donner une vision exhaustive des facteurs modulant la synthèse des différents types de neurotoxine (Connan *et al.* 2013). Néanmoins, ils permettent d'établir que :

- même si des facteurs physiques (tels que la température) ou nutritionnels modulent la synthèse des toxines botuliques, celle-ci est possible pour tous les types de *C. botulinum* dans une très large variété de conditions environnementales et est favorisée par les mêmes conditions que celles favorisant la production des spores ;
- la synthèse des toxines botuliques se produit préférentiellement en fin de phase exponentielle – début de phase stationnaire de la courbe de croissance des cellules végétatives et décline pendant la phase stationnaire ;
- même si la co-régulation de la synthèse des toxines botuliques avec les mécanismes de sporulation varie selon les types de *C. botulinum*, les toxines sont produites, que le processus de multiplication aboutisse ou non à la sporulation.

Tableau 1 : Classification et caractéristiques physiologiques des *C. botulinum* et des espèces de *Clostridium* neurotoxigènes en conditions de laboratoire
(adapté de Peng Chen *et al.* (2012), Lund et Peck (2013), Popoff (2017), Moore et Lacey (2019), Anses (2020))

Groupe	Groupe I <i>C. botulinum</i> Protéolytique	Groupe II <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe III <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe IV <i>C. argentinense</i> Protéolytique	Groupe V <i>C. butyricum</i> Non protéolytique	Groupe VI <i>C. baratii</i> Non protéolytique
Type de toxines	A, B, F	B, E, F	C, D	G	E	F
Sous-types de toxines	A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, bivalent B (Ba, Bf, Ab), F1, F2, F3, F4, F5, F8, X	E1, E2, E3, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, B4 ou non protéolytique B, F6 ou non protéolytique F	C, C/D, D, D/C	G	E4, E5	F7
Support des gènes codant les toxines	Chromosome/plasmide	Chromosome/plasmide	Phage	Plasmide	Plasmide	Plasmide
Bactéries apparentées non toxigènes	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. taeniosporum</i>	<i>C. novyi</i> <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C. schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Protéolyse	+	-	-	+	-	-
Saccharolyse	-	+	-	-	+	+
Croissance						
Température optimale (°C)	35-40	25-30	37-40	37	30 -37	30-45
Température minimale (°C)	10	2,5	15	/	12	10
pH minimum	4,6	5	5,1	4,6	4,8	3,7
a _w minimum	0,94	0,97	0,97	0,94	ND	ND
% NaCl inhibant la croissance	10	5	5	10	ND	8,5

Légende : « + » : présence ; « - » : absence ; ND : non déterminé

2.1.3 Caractéristiques des toxines botuliques

Les toxines botuliques constituent une famille de toxines protéiques qui ont une structure chimique et des propriétés toxicologiques similaires, mais qui se distinguent entre elles par leurs caractéristiques immunogéniques. Cette variabilité du pouvoir immunogène a été utilisée pour les classer en neuf types ou sérotypes (A à H et X). Au-delà de ces différences immunogéniques, les différents types de neurotoxines botuliques se distinguent aussi par des différences au niveau de :

- leur spécificité d'hôtes ;
- leurs cibles moléculaires ;
- leur toxicité.

En fonction des acides aminés touchés par les mutations observées dans la séquence codant ces protéines, des sous-types de toxines peuvent présenter des caractéristiques distinctes au niveau de leur toxicité (p.ex. fixation sur les récepteurs, entrée dans les cellules cibles), de leur mode d'action (p.ex. activité enzymatique de la chaîne légère), de leurs propriétés physico-chimiques (p.ex. stabilité), de leur antigénicité (p.ex. neutralisation par des anticorps à finalité thérapeutique) (Mazuet *et al.* 2016).

2.1.3.1 Structure des toxines botuliques

Les toxines botuliques sont synthétisées simultanément avec d'autres protéines sous la forme de complexes protéiques : la protéine Non Toxique Non Hémagglutinante (NTNH) retrouvée chez tous les types et les hémagglutinines (Ha70 ; Ha 33 et Ha17) retrouvées chez les types A, B, C, D et G.

Quels que soient les types, les toxines botuliques sont synthétisées sous la forme d'une chaîne polypeptidique monocaténaire qui est transformée post-traductionnellement en une molécule double chaîne d'un poids moléculaire de l'ordre de 150 kDa. Chaque toxine est constituée d'une chaîne dite légère (LC) de 448 acides aminés, d'un poids moléculaire de l'ordre de 50 kDa et d'une chaîne dite lourde de 100 kDa (HC) de 832 acides aminés. Les deux chaînes sont reliées entre elles par un pont disulfure. La chaîne légère est une enzyme endopeptidase de type métalloprotéase zinc dépendante et porte l'activité biologique de la neurotoxine. La chaîne lourde assure la liaison aux récepteurs neuronaux (ganglioside et protéine vésiculaire).

2.1.3.2 Mécanisme d'action

Le mode d'action des toxines botuliques se décline en quatre étapes (cf. figure 2) : fixation sur les récepteurs localisés sur la terminaison synaptique du neurone cible, internalisation dans la terminaison nerveuse sous la forme d'un complexe BoNT/récepteur via une vésicule d'endocytose, translocation de la chaîne légère du compartiment vésiculaire vers le cytosol après rupture du pont disulfure et action protéolytique de la chaîne légère sur sa protéine cible du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptor*). Chaque chaîne légère clive une protéine cible du complexe SNARE qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. La perte d'activité des protéines du complexe SNARE provoque l'inhibition de la libération de l'acétylcholine (Tehran et Pirazzini 2018; Lindström et Korkeala 2006). La diminution de la quantité d'acétylcholine libérée se traduit par une baisse de la contraction musculaire et l'apparition d'une paralysie dite flasque. Selon son type, chaque neurotoxine a comme substrat une protéine spécifique du complexe SNARE et un site de clivage propre. La diversité des sites de clivage selon les types de toxines pourrait expliquer les différences observées en termes de nature, de délai d'apparition et de durée des signes cliniques.

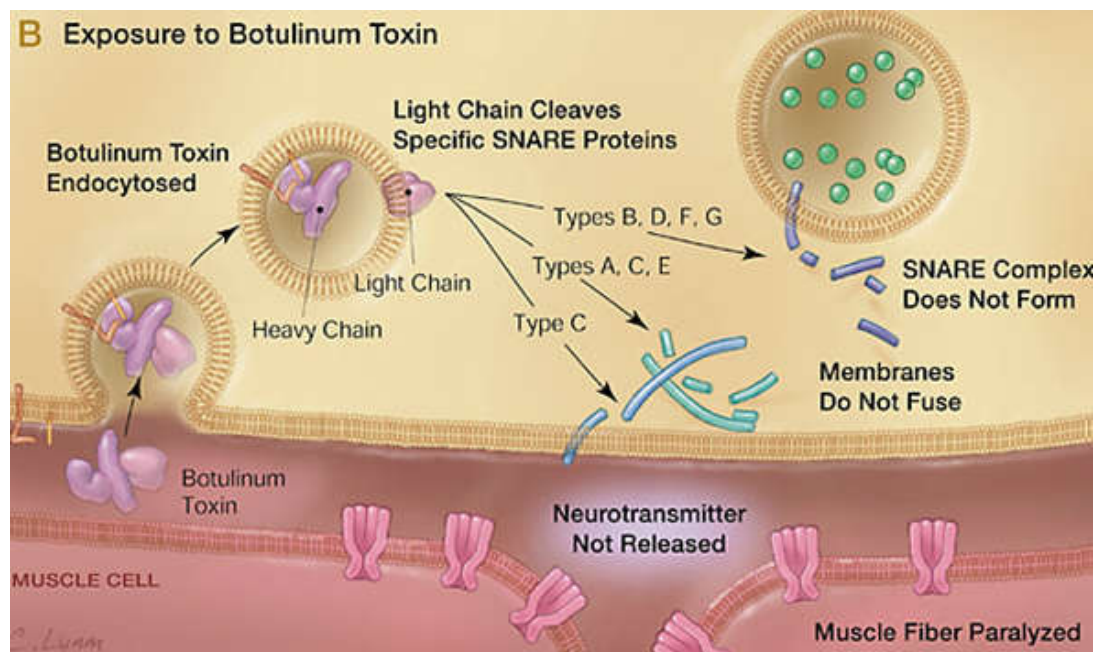


Figure 2 : Schéma du mode d'action des toxines botuliques dans les neurones (en jaune sur le schéma)

(Arnon *et al.* 2001)

2.1.3.3 Toxicité

Les toxines botuliques sont les agents causaux du botulisme, une maladie qui est retrouvée chez l'Homme sous cinq formes (cf. 2.1.4). Les toxines botuliques sont considérées comme les toxines les plus létales connues (Arnon *et al.* 2001). Le type A est considéré comme le plus létalet, et pour ce type, les doses létales chez l'Homme sont estimées à $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie digestive, 10 à 15 ng.kg^{-1} par voie inhalée et 1 à 2 ng.kg^{-1} par voie parentérale. Les toxines botuliques n'ont pas d'effet par la voie cutanée car la peau saine assure une barrière efficace. Les toxines botuliques de type A, B, E et plus rarement F sont les types les plus fréquemment retrouvés dans le botulisme humain (Snow *et al.* 2021).

Maladie humaine

En France, le botulisme humain est une maladie à déclaration obligatoire (DO). Dans ce cadre, toute suspicion de botulisme humain implique (article L3113-1 du Code de la santé publique) sa déclaration à l'Agence Régionale de Santé (ARS) et sa confirmation biologique par le Centre National de Référence (CNR) des bactéries anaérobies et du botulisme (Institut Pasteur de Paris).

2.1.4 Généralités, signes cliniques et aspects épidémiologiques

En matière de botulisme chez l'être humain, la suspicion clinique et le diagnostic présumé sont établis sur la base des signes cliniques et des informations épidémiologiques.

Le botulisme doit être suspecté chez un patient non fébrile, avec apparition aiguë de signes et symptômes d'une atteinte bilatérale des nerfs crâniens, suivie d'une paralysie flasque bilatérale descendante des muscles volontaires qui peut évoluer vers des troubles respiratoires critiques et même la mort.

Chez les nourrissons, le botulisme est suspecté s'il y a apparition aiguë d'une diminution de la succion, de l'apparition d'une ptose palpébrale⁴, d'inactivité et de constipation.

Les symptômes étant très caractéristiques, le diagnostic présomptif peut être établi sur la base des seules observations cliniques. La gravité des signes cliniques dépend de la quantité de toxine botulique absorbée et du type de toxine ; des formes frustes (troubles visuels et/ou troubles digestifs) peuvent survenir.

Cinq types de botulisme sont classiquement décrits, selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine : botulisme alimentaire (intoxication), botulisme intestinal (toxi-infection), botulisme par blessure, botulisme iatrogène et botulisme par inhalation. Le botulisme alimentaire et le botulisme intestinal du nourrisson sont les deux formes les plus rencontrées chez l'Homme. Les signes cliniques associés aux différentes formes de botulisme, le diagnostic différentiel ainsi que le traitement sont présentés en détail dans le rapport socle (Anses 2021a). Ci-dessous, quelques aspects épidémiologiques sont présentés pour chaque type de botulisme incluant, au regard d'une des questions de la saisine, une mise en perspective dans un contexte professionnel d'abattage de volailles. Le botulisme iatrogène, lié à un surdosage de toxine lors d'un traitement médical ou cosmétique, n'est pas abordé. Il n'est pas concerné par la saisine et aucun cas n'a été décrit en France jusqu'à présent.

2.1.4.1 Botulisme alimentaire (intoxication)

Le botulisme alimentaire est la principale cause de botulisme humain. Il résulte d'une intoxication par voie digestive due à la présence de la toxine préformée dans un aliment. Celui-ci est décrit sur tous les continents et est d'incidence variable. En Europe, ce sont surtout des conserves et des produits alimentaires de fabrication familiale ou artisanale qui sont concernés, essentiellement des salaisons, des charcuteries (le porc est souvent impliqué) ou encore des conserves de végétaux. Dans quelques cas, plus rares, des aliments du commerce ou des repas au restaurant ont été impliqués. Après ingestion, la toxine résiste à l'acidité gastrique et aux enzymes digestives et est absorbée principalement par le duodénum et le jéjunum. Elle passe ensuite dans la circulation sanguine. Les sérotypes A, B et E sont clairement associés au botulisme alimentaire.

Dans un contexte professionnel, particulièrement lors de l'abattage des volailles, la toxine pourrait se déposer sur les mains souillées d'un travailleur et être ingérée, par manque d'hygiène élémentaire.

2.1.4.2 Botulisme infantile (toxi-infection)

Cette toxi-infection survient lorsque des spores de *C. botulinum* sont ingérées. Ensuite, les spores germent, les bactéries se multiplient dans le tractus gastro-intestinal et libèrent la toxine. Ce botulisme survient chez l'enfant âgé de six jours à 12 mois, mais surtout chez des nourrissons de deux à huit mois. Une faible dose de 10 à 100 spores de *C. botulinum* suffit à induire la colonisation intestinale et la production de toxine. Le microbiote intestinal qui, normalement, a un effet inhibiteur sur la croissance de *C. botulinum* dans le tractus digestif, pourrait ne pas être suffisamment développé ou ne pas jouer son rôle inhibiteur chez les nourrissons de moins d'un an (Popoff 2018).

2.1.4.3 Botulisme infectieux de l'adulte (colonisation intestinale) (toxi-infection)

Cette forme rare et mal comprise est similaire au botulisme infantile, mais survient chez un adulte. Il n'existe pas de critères clairs pour distinguer les symptômes de ces cas de toxi-infection des autres cas de botulisme chez l'adulte. Elle implique généralement les toxines de type A, mais les toxines de type B et F ont quelquefois été incriminées. Chez ces patients, des spores, bactéries et toxines sont retrouvées dans les selles et des spores peuvent aussi être retrouvées dans les restes d'aliments consommés, mais aucune toxine préformée n'y est retrouvée. Le microbiote intestinal, normalement bien établi et pleinement fonctionnel après la petite enfance, prévient la colonisation du tube digestif par la bactérie. Il est possible qu'un déséquilibre du microbiote (dépression immunitaire, utilisation

⁴ Déroulement plus ou moins important de la paupière supérieure et impotence totale ou partielle du muscle releveur, qui provoque un abaissement plus ou moins marqué du bord inférieur de la paupière.

prolongée d'antibiotiques ou chirurgie intestinale) soit en cause. Cette dysbiose est suggérée mais en raison du manque de connaissances sur le microbiote intestinal, les causes exactes de l'altération de ce dernier restent inconnues. Lorsque la toxine F a été impliquée, la maladie a été causée par *C. baratii* (Birch et Bleck 2019).

Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont reconnues suffisamment graves et incompatibles avec un travail à l'abattoir pour que l'exposition professionnelle causant un botulisme infectieux ne soit pas considérée dans ce rapport.

2.1.4.4 Botulisme par blessure (inoculation)

Le botulisme par blessure est une toxi-infection dont le mécanisme est identique à celui du tétanos. Les spores de *C. botulinum* peuvent contaminer les plaies. En situation d'anaérobiose, la bactérie peut s'y développer et y produire la toxine (majoritairement de type A ou B). Cette forme de botulisme, beaucoup plus rare que le tétanos (Popoff 2018), est, depuis les années 1980, presque exclusivement liée à l'utilisation de drogues injectables, en particulier l'héroïne. Auparavant, les cas de botulisme de plaie (Austin, communication personnelle) survenaient à la suite de fractures ouvertes, de plaies traumatiques profondes ou de plaies punctiformes contaminées par des corps étrangers. Il est essentiel que la blessure contaminée par *C. botulinum* soit suffisamment profonde pour créer des conditions d'anaérobiose permettant, après la germination de spores de *C. botulinum*, la production de toxine. Wapen et Gutmann (1974) rapportent un cas de botulisme consécutif à une blessure de type « abrasion/lacération » (selon les termes utilisés par les auteurs). Cependant, la blessure a nécessité un débridement des tissus dévitalisés, confirmant la présence d'une plaie profonde, ayant créé un milieu anaérobie (Wapen et Gutmann 1974). Aussi, dans presque tous les cas de botulisme par plaies survenus en Italie, les patients étaient des ouvriers de chantier ou des ouvriers agricoles victimes de blessures traumatiques (Anniballi, communication personnelle).

Dans le contexte du travail en abattoir, toute manipulation de couteau sera considérée comme une exposition professionnelle possible (exposition par inoculation à la suite d'une blessure ou d'une coupure avec un objet possiblement contaminé par des spores, des cellules végétatives ou des toxines). Cependant, même s'ils confirment la possibilité théorique de botulisme par blessure chez des travailleurs, plusieurs auteurs (Austin, Chatham-Stephens, Jacobs Slifka, De Rosa, communications personnelles) n'ont, à leur connaissance, jamais vu par expérience ou dans la littérature scientifique de cas spécifiquement liés à des activités de travailleurs en abattoir.

2.1.4.5 Botulisme d'inhalation

Le botulisme par inhalation est très rare (Popoff 2018; Rao et Maslanka 2018). Quelques cas ont été signalés chez des employés de laboratoire (Holzer 1962), qui manipulaient une grande quantité de toxines, et chez quelques personnes, à la suite de l'utilisation intranasale de cocaïne contaminée (MacDonald *et al.* 1985; Kudrow *et al.* 1988), dont des cas en France au début des années 2000 (type B) (F. Roblot *et al.* 2006). La présence d'une sinusite à *C. botulinum* ou une absorption directe à travers la muqueuse nasale ont été suggérées comme hypothèses étiologiques.

Les conditions de travail et la nécessité que des toxines soient présentes en grande quantité au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rendent très improbables un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores, par un travailleur exposé en abattoir, ne causera pas de botulisme car au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination des spores et à la production de toxine ne sont pas présentes. En effet, tenant compte de la présence ubiquitaire de spores de *C. botulinum* dans l'environnement, elles sont sûrement souvent inhalées mais aucun cas de botulisme par inhalation n'est rapporté dans la population générale ni chez les travailleurs d'abattoir. À la suite d'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire de spores qui peuvent être ensuite dégluties. Seuls, le botulisme infantile et le botulisme infectieux de l'adulte pourraient être causés par ce mécanisme.

2.1.4.6 Évolution clinique

Le traitement est au début symptomatique (prévention d'une insuffisance respiratoire) et peut être complété le plus rapidement possible, par l'administration d'une antitoxine heptavalente (Pegram et Stone 2020; Rao et Maslanka 2018).

La majorité des patients, rapidement diagnostiqués et pris en charge, guérissent sans séquelle. Cependant, selon la gravité de l'atteinte, la guérison peut survenir après plusieurs mois. L'amélioration clinique est liée à l'apparition de nouvelles terminaisons nerveuses, c'est pourquoi la rémission complète peut ne survenir qu'un an après l'apparition des signes et symptômes.

Les patients ayant eu besoin d'une ventilation mécanique sont sevrés en moyenne après 58 jours (toxine de type A) et 26 jours (toxine de type B) (Hughes *et al.* 1981).

Actuellement, avec un diagnostic et des soins de support rapides, le taux de mortalité du botulisme est réduit, moins de 1 % pour le botulisme infantile et moins de 10 % pour les autres formes (Pegram et Stone 2020).

2.1.5 Données de surveillance humaine

Préalablement à l'analyse des données de surveillance, le GT souligne la différence de définition existant en santé humaine et en santé animale entre les termes « cas » et « foyer » de botulisme.

En santé humaine, le « cas de botulisme » désigne un seul individu, tandis que le « foyer de botulisme » désigne un ou plusieurs individus.

En santé animale, les termes « cas » et « foyers » désignent deux populations animales différentes, quel que soit le nombre d'animaux concernés : le terme « cas » est uniquement utilisé pour des infections en faune sauvage (et peut concerner un ou plusieurs animaux) alors que le terme « foyer » est utilisé pour des infections chez les espèces domestiques.

2.1.5.1 Surveillance des cas de botulisme humain en France

Ce bilan présente la situation du botulisme humain en France à partir des données épidémiologiques de Santé publique France et des investigations biologiques du CNR.

Parmi les 100 foyers de botulisme humain recensés sur la période 2008-2018, 82 foyers (89,8 % des cas) étaient d'origine alimentaire, 17 (9,6 % des cas) foyers correspondaient à du botulisme infantile et 1 foyer (0,6 % des cas) à du botulisme par blessure, observé en 2008 à la suite d'une fracture ouverte de la jambe chez un accidenté de la route. Le botulisme par inhalation est extrêmement rare en France : un unique foyer (deux cas) a été rapporté sur la période 1987-2019 par inhalation de cocaïne.

Le nombre annuel de cas et de foyers reste stable pour la période de 2008 à 2018. Au cours de ces dix années, trois à 13 foyers (incidence annuelle moyenne de 7,5 foyers/an) et quatre à 25 cas (incidence annuelle moyenne de 14,5 cas/an) de botulisme humain d'origine alimentaire sont observés annuellement en France. L'incidence du botulisme est probablement sous-estimée du fait de formes cliniques frustes, comme celles se limitant à des troubles visuels passagers et qui ne font pas l'objet d'examens complémentaires (Mazuet *et al.* 2018; P. Roblot *et al.* 1994).

■ Foyers de botulisme d'origine alimentaire

Entre 2008 et 2018, 82 foyers de botulisme humain d'origine alimentaire ont été recensés en France. Ils représentent un total de 159 cas (impliquant entre une et six personnes par foyer). Le type B est responsable de 53 foyers (et 106 cas) soit 64 % des foyers et 67 % des cas, le type A de 15 foyers (et 30 cas) soit 18 % des foyers et 19 % des cas. Les types E (deux foyers) et F (deux foyers) sont à l'origine de quatre et cinq cas respectivement. Enfin, pour 10 foyers (14 cas) il n'a pas été possible de déterminer le type toxique à l'origine des foyers ou des cas (prélèvements biologiques absents,

insuffisants ou trop tardifs, aliment non identifié ou indisponible). Faute de restes alimentaires disponibles pour analyse, l'aliment responsable n'a pu être identifié que dans 41 foyers (soit 50 %).

La figure 3 présente les caractéristiques des foyers de botulisme humain sur la période 2008-2018 pour lesquels la source alimentaire a été identifiée. Parmi les 41 foyers, 28 foyers ont pour origine des préparations familiales et 13 des préparations commerciales (King 2008) et/ou artisanales (Pingeon *et al.* 2011). Les deux sources principales d'aliment sont le jambon cru (17 foyers) ainsi que les conserves de légumes (12 foyers). D'autres produits de charcuterie sont impliqués (7 foyers). Enfin, trois aliments composites, un poisson fumé et salé (King *et al.* 2009) et de la viande hachée ont également été à l'origine de foyers de botulisme. Les types A et B restent largement majoritaires et aucun foyer/cas de botulisme humain de type C, D ou mosaïque C/D ou D/C n'a été recensé en France durant cette période.

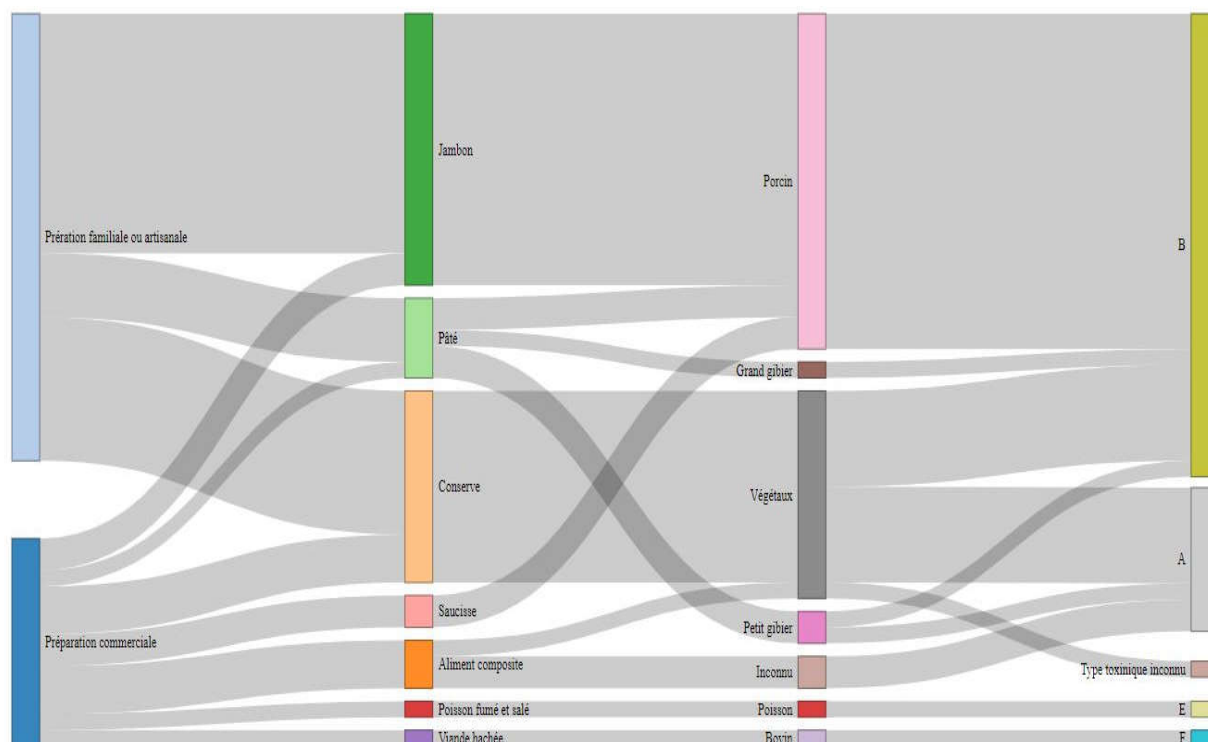


Figure 3 : Répartition des foyers de botulisme alimentaire avec identification de la source alimentaire (n = 41) en France entre 2008 et 2018 en fonction du type de préparation, de la nature de l'aliment, de l'origine des aliments et du type de toxine botulique. D'après (Mazuet *et al.* 2011; Mazuet *et al.* 2018; Mazuet *et al.* 2014)

■ Cas de botulisme infantile en France

Le premier cas de botulisme infantile a été identifié en France en 2004 (King *et al.* 2010). Au cours de la période 2004-2018, 19 cas de botulisme par colonisation intestinale ont été signalés chez des enfants (17 âgés de moins de 12 mois et deux cas à l'âge de 12 et 18 mois). Neuf étaient atteints de botulisme de type A et dix de type B. Tous les échantillons d'aliments éventuellement impliqués ont fourni un résultat négatif (y compris les six échantillons de miel). Une contamination environnementale a été suspectée dans deux cas (Bernardor *et al.* 2018). En conclusion, l'origine des cas de botulisme infantile en France sur la période 2004-2018 reste inexpiquée.

2.1.5.2 Situation dans d'autres pays

L'analyse des données de surveillance du botulisme humain dans le monde sur la période 1976-2018 réalisée par le GT socle indique que :

- la forme de botulisme la plus fréquente est le botulisme alimentaire (ingestion de toxine préformée). Le botulisme infantile est majoritaire parmi les autres formes de botulisme ;
- les types de toxines botuliques à l'origine des cas humains sont les types A et B puis E, occasionnellement F.

2.1.5.3 Foyers de botulisme alimentaire associés aux produits avicoles

Les produits avicoles ont rarement été identifiés comme source de botulisme humain. En France, la consommation de poulet a été suspectée pour deux foyers de botulisme de type C dont un confirmé en 1972 et 2006 (Maupas *et al.* 1976; Martrenchar *et al.* 2019) (cf. section 2.1.6).

Plus récemment en 2015, du pâté de faisan de préparation familiale été à l'origine d'un foyer de botulisme mais de type A (3 cas)⁵.

2.1.5.4 Cas de botulisme liés à une exposition professionnelle en abattoir

Une demande a été faite par le GT auprès des autorités de santé de plusieurs pays, concernant l'existence de cas de botulisme de plaie ou par inhalation chez des travailleurs en abattoir. Aucun des 19 pays⁶ qui ont répondu n'avait recensé de tels cas, la surveillance de botulisme humain couvrant une période variable selon les pays répondants mais cette analyse rétrospective allant parfois jusqu'en 2020.

2.1.6 Évaluation du caractère zoonotique des *Clostridium botulinum* du groupe III (types C, D et mosaïques)

Le caractère zoonotique des *Clostridium* du groupe III (objet de la présente saisine) a été évalué sur la base de l'examen des données épidémiologiques internationales (cas de botulisme humain liés à ces toxines dans un contexte de transmission par des denrées alimentaires d'origine animale) et des résultats d'essais *in vitro* et *in vivo* sur l'effet des toxines sur l'être humain.

2.1.6.1 Analyse des publications sur les cas humains

Dans la littérature scientifique, neuf publications ont pu être identifiées sur la base d'une revue récente (Rasetti-Escargueil, Lemichez et Popoff 2019). Elles ont été analysées, puis classées en foyers de botulisme alimentaire suspectés ou confirmés selon les critères de définition de cas actuellement utilisés par le CNR et Santé publique France (Anses 2021a). Deux publications portant sur des cas survenus chez des primates ont également été examinées. Une publication récente (Semenko *et al.* 2020) fait mention de foyers suspectés de botulisme alimentaire de type C, mais elle n'a pas fait l'objet d'une analyse par le GT du fait de l'absence de précisions sur la définition des cas.

L'analyse critique des publications sur les cas humains réalisée par le GT socle a conduit à identifier, au niveau international, entre 1950 et 2006 (Anses 2021a) :

- deux foyers de botulisme de type C confirmés (un de type botulisme alimentaire et le second de type botulisme infantile, cinq cas au total dont un décès ; France, Japon) ;
- quatre suspicions cliniques de botulisme de type C (sept cas dont deux décès ; USA, ex-URSS, France) ;
- un foyer de botulisme de type D suspecté (deux cas ; Tchad) ;
- six foyers sans confirmation du type (B ou C) (14 cas dont quatre décès ; ex-Rhodésie, Sénégal, France).

S'agissant des sources de contamination, la consommation de poulet a été suspectée pour trois foyers dont un confirmé (Rey *et al.* 1964; Maupas *et al.* 1976; Martrenchar *et al.* 2019). Par ailleurs, deux foyers de botulisme alimentaire de type C associés à la consommation de poulet ou de carcasses d'oiseaux ont été décrits chez des primates en captivité (Smart *et al.* 1980; Silva *et al.* 2018). La description des cas de botulisme de type C associés à la consommation de volailles figure en annexe 2 du rapport.

⁵ Hors période d'étude, en 2020, du foie gras d'oie mi-cuit de préparation familiale a été à l'origine d'un foyer de botulisme de type B (trois cas).

⁶ Pays ayant répondu : Allemagne, Angleterre, Argentine, Autriche, Belgique, Bulgarie, Danemark, Écosse, États-Unis, Finlande, Estonie, Irlande, Italie, Lettonie, Luxembourg, Monaco, Pologne, Suède, Suisse.

■ Incertitudes

Comme indiqué dans les paragraphes précédents, les cas de botulisme humains associés à des produits de volailles sont extrêmement rares. Au-delà, les principales sources d'incertitudes identifiées au cours de cette analyse sont liées à la méthode de diagnostic.

Avant 1970, le diagnostic de botulisme humain est essentiellement confirmé biologiquement par la mise en évidence d'une toxine préformée présente dans l'aliment suspect. Le diagnostic sur sérum du malade n'était pas réalisé en France avant 1970. L'hypothèse que des cas de botulisme C ou D aient ainsi pu échapper au diagnostic peut donc être raisonnablement émise.

La mise à disposition de méthodes performantes de typage des toxines sériques et de criblage des gènes chez *C. botulinum* est récente. Ces nouvelles méthodes sont cependant disponibles dans une période où l'incidence du botulisme est faible. Une analyse rétrospective sur des sérums de patients ou des isolats (plus nombreux car obtenus dans une période où l'incidence était plus élevée) permettrait peut-être, sous réserve de l'existence de telles collections de sérum, de révéler d'éventuels cas de botulisme D et de documenter l'origine zoonotique de plus nombreux cas de botulisme alimentaire de type C.

De manière générale, une certaine hétérogénéité quant aux méthodes de typage mises en œuvre en ce qui concerne plusieurs paramètres peut être constatée dans les différentes études disponibles. Le poids recommandé des souris, le volume injecté, le titrage de la toxine avant la séroneutralisation, les temps d'incubation, le titre des sérums anti-toxines varient selon les laboratoires et les études publiées, ce qui constitue également une source d'incertitude.

2.1.6.2 Effet des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain

Deux types d'essais ont été réalisés pour connaître l'action des toxines botuliques de type C et D sur l'être humain :

- des essais *in vitro* sur des cultures de cellules nerveuses ou sur des muscles squelettiques isolés ;
- des essais *in vivo* par injection dans des muscles squelettiques chez des volontaires.

L'effet *in vitro* sur préparation de muscle humain isolé est mesuré par la diminution de paramètres électrophysiologiques. L'effet sur un muscle de la paroi abdominale de la toxine de type C (10^{-8} M) est voisin de celui de la toxine de type A prise comme référence alors que la toxine de type D n'a aucun effet, même aux fortes doses (Coffield *et al.* 1997). Cependant, un effet de la toxine de type D peut être décrit sur d'autres préparations musculaires (muscle intercostal) (Anderson *et al.* 2009). L'examen de l'effet de la toxine de type D sur les cultures de cellules nerveuses (2 systèmes humains et 3 systèmes murins - rat et souris) d'explants primaires montre des différences importantes d'activité comparativement à la toxine de type A (Pellett *et al.* 2015). Une concentration efficace médiane (EC_{50}) de 50 UI est obtenue. Cette valeur d'efficacité est 150 fois inférieure à celle obtenue avec la toxine de type A1 (Pellett *et al.* 2015). Ces différences suggèrent des modes de pénétration dans les cellules cibles et des mécanismes d'action différents entre la toxine de type D et les toxines de type A ou E (Pellett *et al.* 2015).

Les essais *in vivo* chez l'être humain ont été réalisés soit sur des volontaires soit sur des patients.

L'effet des toxines de type C ou D a été comparé à celui de la toxine de type A sur les muscles des extenseurs de doigts de pieds de volontaires (Eleopra *et al.* 1997). L'effet de la toxine de type C est très voisin de celui obtenu avec la toxine de type A. Ce test sur 15 volontaires a été suivi par un test thérapeutique sur trois patients avec des résultats rapides et prolongés (12 semaines) (Eleopra *et al.* 1997). Au contraire, l'effet de la toxine de type D est nul à faible dose (3 UI) et très modéré à forte dose (10 UI) comparé aux effets du même type toxinique sur rat ou sur souris (Eleopra *et al.* 2013). Néanmoins, la toxine de type D a un effet inhibiteur sur les synapses cholinergiques autonomes. Cet effet est démontré par un test de sueur⁷ sur quatre volontaires. L'effet est proportionnel aux doses

⁷ Test de l'effet de la toxine injectée par voie intradermique sur la sécrétion de sueur

administrées pour les deux toxines A et D, mais est inférieur de moitié pour la toxine de type D comparé à celui obtenu avec la toxine de type A (Dressler *et al.* 2019).

En conclusion

L'analyse critique des publications sur les cas humains a conduit à identifier entre 1950 et 2006 au niveau mondial : deux foyers de botulisme de type C confirmés (cinq cas dont un décès ; France, Japon) et 11 foyers suspects (C, D ou indéterminé).

Les essais *in vitro* et *in vivo* réalisés pour évaluer les effets des toxines C et D montrent que :

- la toxine C présente un effet similaire à celui de la toxine A ;
- l'effet de la toxine de type D est nul à faible dose et très modéré à forte dose.

Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou *Clostridium botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme alimentaire humain (deux foyers confirmés). Néanmoins, les sources de contamination n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas.

S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée, pour lequel l'exposition alimentaire à la toxine botulique de type D n'a été que suspectée.

Les cas de botulisme humain de types C et D sont donc rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer la quasi-absence de cas liés aux types C, D, C/D, D/C : faible sensibilité de l'hôte, faible exposition humaine, défaut de surveillance.

- La faible sensibilité de l'hôte aux toxines est l'hypothèse privilégiée. Plus précisément, les essais *in vivo* réalisés par injection intradermique montrant l'efficacité de la toxine (particulièrement de type C), la faible sensibilité correspondrait à une faible absorption intestinale des toxines. Par ailleurs, les résultats d'essais sur la toxine de type D suggèrent des modes d'action différents de ceux de la toxine de type A.
- L'hypothèse d'une faible exposition aux types C et D est difficile à justifier d'après les données disponibles au niveau des élevages d'animaux de production. Ces données montrent la présence des spores dans les réservoirs. L'exposition aux spores de type C et D est donc possible et la question de sa fréquence se pose également pour le botulisme infantile. En revanche, les données relatives à l'écophysiologie des types C et D montrent qu'il est plus facile de contrôler la croissance et la toxinogenèse de ces types toxiques dans les aliments au moins par rapport aux types A et B (cf. section 2.3.2).
- La sensibilité du système de surveillance ne semble pas être en cause. Les méthodes de diagnostic permettent de détecter l'ensemble des toxines. Toutefois, la faible toxicité des types C et D pourrait être à l'origine de formes frustes qui ne seraient pas détectées par les systèmes de surveillance.

2.2 Maladie animale (botulisme aviaire)

2.2.1 Aspects réglementaires

Le botulisme animal est réglementé en France depuis 2006, année pour laquelle le botulisme chez les volailles, notamment en raison de l'émergence jugée préoccupante de foyers de type E, a été inclus dans la liste des maladies réputées contagieuses (décret 2006-178 du 17/02/2006 portant création d'une liste de maladies réputées contagieuses et modifiant le Code rural (art. D.223-21)). Cette disposition a été complétée par l'inscription du botulisme chez les oiseaux sauvages et du botulisme chez les bovins dans la liste des maladies animales à déclaration obligatoire (décret 2006-179 du 17/02/2006 portant création d'une liste de maladies à déclaration obligatoire et modifiant le Code rural (art. D.223-1)).

À la suite des États Généraux du Sanitaire et à la catégorisation des dangers sanitaires en santé animale en 2013, *Clostridium botulinum* a été classé comme danger sanitaire de 1^{ère} catégorie (article L201-1 du Code rural et de la pêche maritime) chez « toutes les espèces sensibles ». Toute suspicion implique un signalement à la direction départementale de la protection des populations (DDPP) et sa confirmation biologique par le Laboratoire National de Référence (LNR) et/ou le CNR. En revanche, en l'absence d'arrêté ministériel les imposant (aucune mesure de gestion n'a été définie à l'échelon national), les mesures appliquées dans les élevages suspects ou reconnus atteints restent, au titre de l'article L 223-1 du Code rural et de la pêche maritime, de la prérogative du préfet qui, en fonction de la situation locale et sur la base de conseils fournis par la DGAL, les prescrit par arrêté préfectoral portant mise sous surveillance (APMS) et/ou portant déclaration d'infection (APDI). Le statut du botulisme animal en tant que maladie réglementée est actuellement remis en question à la suite de la mise en conformité de la réglementation française (Ordonnance 2021-1370 du 20 octobre 2021) avec le Règlement (EU) 2016/429 du Parlement Européen et du Conseil du 9 mars 2016, dit « Loi santé animale » (LSA). La LSA a, en effet, désigné et réparti en cinq catégories (A à E) une liste des maladies transmissibles aux animaux ou aux êtres humains devant être soumises dans chaque État membre, selon leur niveau de catégorisation, aux mesures de prévention et de lutte fixées. Cependant, le botulisme ne figure pas dans cette liste.

Pour donner suite à l'entrée en vigueur de la LSA au 21 avril 2021, une nouvelle liste de maladies réglementées (remplaçant l'actuelle liste des dangers sanitaires et incluant la liste des maladies catégorisées dans l'UE) est attendue en France. La possibilité est toutefois donnée à chaque État membre d'établir une réglementation spécifique pour des maladies non catégorisées vis-à-vis desquelles, dans un but d'intérêt collectif, des mesures nationales de prévention, de surveillance ou de lutte sont estimées nécessaires. Le botulisme animal, s'il est estimé qu'il répond à ce critère, pourrait donc être introduit dans une liste complémentaire de maladies réglementées, à charge pour l'État de fixer les mesures de gestion applicables à l'échelon national.

2.2.2 Données de surveillance relatives au botulisme chez les volailles en France

Les cas de botulisme animal sont confirmés par le CNR et/ou le LNR. Historiquement, c'est le CNR qui établissait les diagnostics de botulisme, à la fois chez l'être humain et les animaux. En 2012, un LNR a été créé au laboratoire de l'Anses de Ploufragan dans l'unité Hygiène et Qualité des Produits Avicoles et Porcins (HQPAP), associant l'unité Épidémiologie Santé et Bien Être (EPISABE) ainsi que la Plateforme IdentityPath du Laboratoire de Sécurité des Aliments de l'Anses Maisons-Alfort. Depuis cette date, une partie des diagnostics animaux y sont effectués, sur les volailles dans un premier temps puis les oiseaux sauvages et depuis 2017 chez les bovins.

L'analyse suivante porte sur la période 2005-2019 à partir des données disponibles sur les cas animaux confirmés provenant à la fois du CNR (de 2005 à 2019) et du LNR (de 2013 à 2019). Une analyse complémentaire a pu être conduite à partir des données du LNR permettant de décrire plus finement les caractéristiques de la maladie et son évolution dans les élevages depuis 2013.

2.2.2.1 Répartition des foyers de botulisme par espèce

Pour la période de 2009 à 2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés par les deux laboratoires. Le botulisme est principalement présent chez les **oiseaux, qu'ils soient d'élevage** ($n = 247$), ou **sauvages** ($n = 212$) et les **bovins** ($n = 120$). À titre plus anecdotique, quelques foyers ont été identifiés chez d'autres espèces (chiens/chats ($n = 10$), poissons ($n = 1$), animaux sauvages et de zoos ($n = 2$) (Figure 4 et Figure 5).

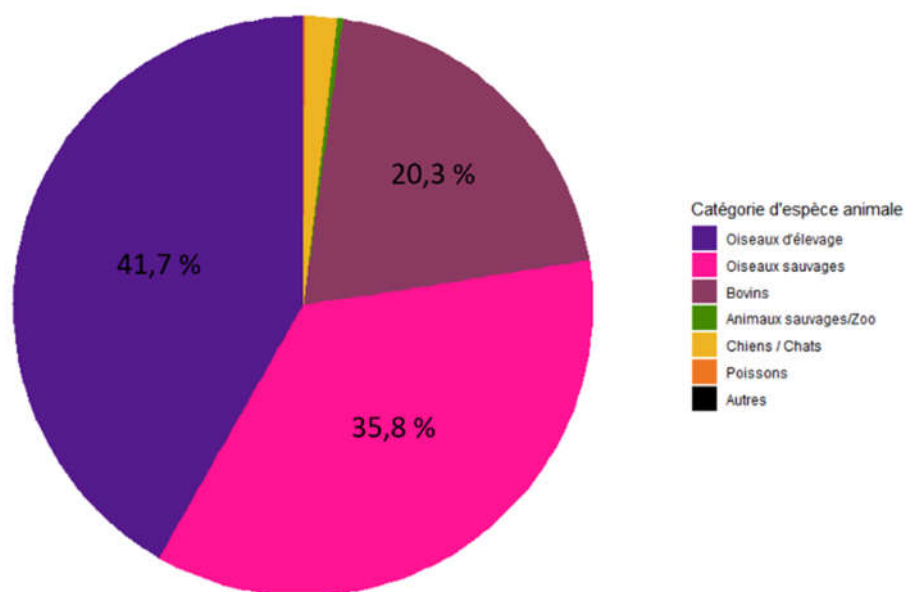


Figure 4 : Répartition des foyers de botulisme animal recensés de 2009 à 2019 par espèce ($n = 592$) (Source CNR/LNR)

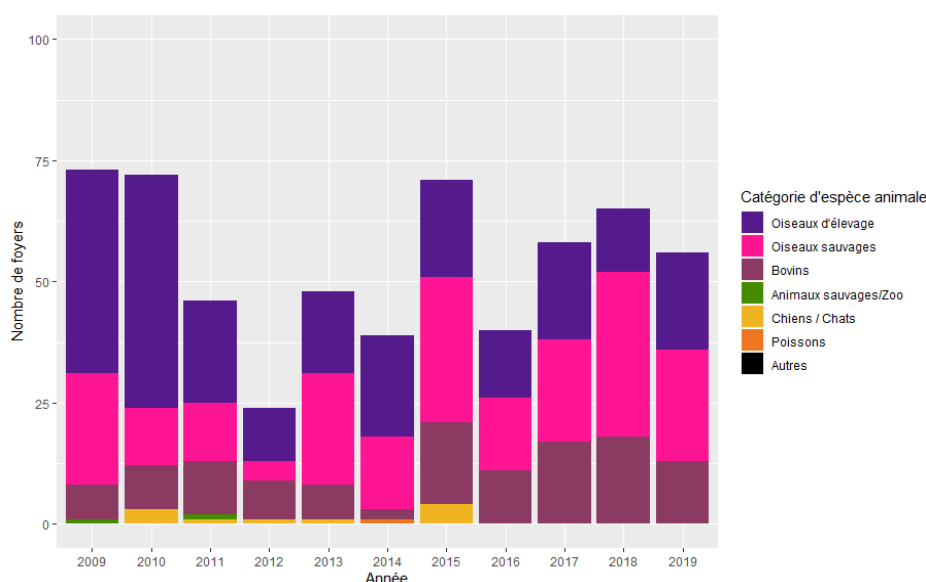


Figure 5 : Évolution des foyers de botulisme animal recensés par année de 2009 à 2019 par espèce ($n = 592$) (Source CNR/LNR)

La figure 6 représente le nombre de foyers identifiés en élevage de volailles, une trentaine en moyenne annuelle avec une notable variabilité interannuelle.

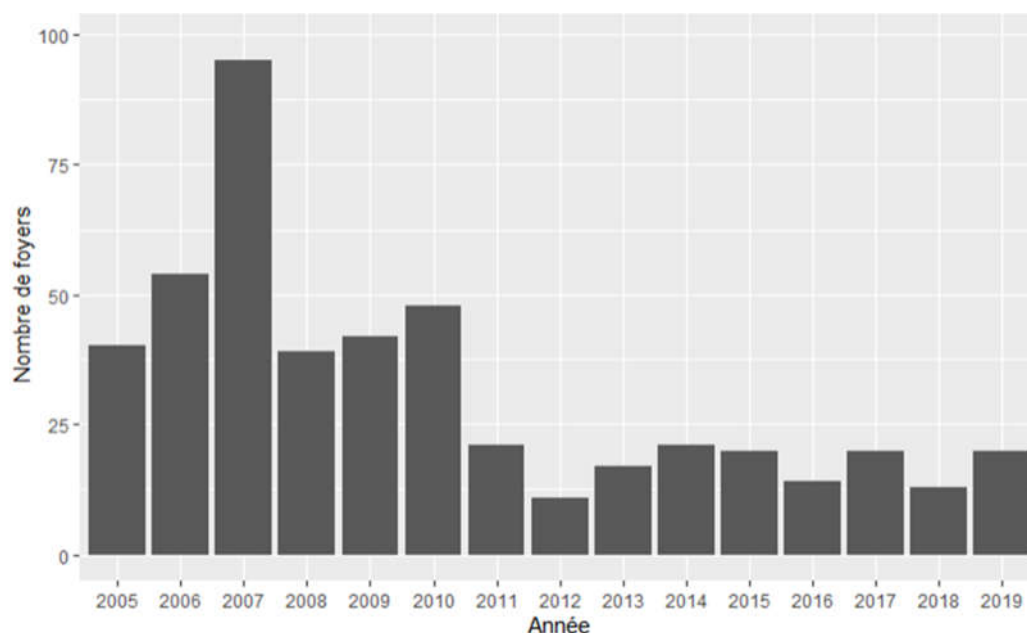


Figure 6 : Évolution du nombre de foyers de botulisme pour les oiseaux d'élevage recensés de 2005 à 2019 (n=247) (Source CNR/LNR)

2.2.2.2 Répartition des types de *C. botulinum*

Le type mosaïque C/D représente la forme dominante chez les oiseaux d'élevage (n = 112), suivi du type D (n = 45). Le type D/C (n = 27), forme dominante chez les bovins, est également parfois détecté chez les oiseaux d'élevage.

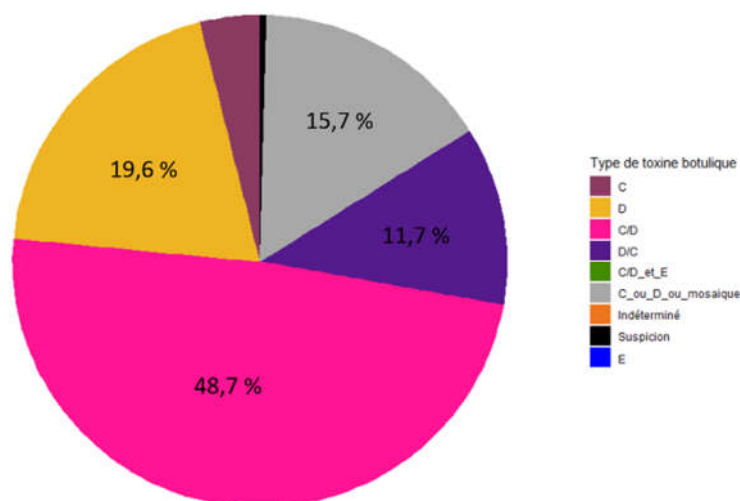


Figure 7 : Répartition des types de botulisme pour les foyers d'oiseaux d'élevage recensés de 2010 à 2019 (n = 231) (Source CNR/LNR)

Au cours du temps, les méthodes de diagnostic ont évolué. Avant 2010, le diagnostic biologique se faisait très majoritairement par détection du type de toxine sur sérum par la méthode de séroneutralisation qui ne permettait pas de faire la distinction avec les formes mosaïques. Depuis cette date et la mise en œuvre de techniques PCR qui ciblent la bactérie *Clostridium botulinum*, les formes mosaïques se révèlent majoritaires, aussi bien chez les oiseaux que chez les bovins. Le type D, très présent chez les volailles sur la période 2005-2010, apparaît très probablement surévalué : il a, depuis 2010, considérablement baissé au profit du type mosaïque C/D.

Par la suite, une analyse a été conduite spécifiquement à partir des données du LNR. Les données disponibles depuis 2013 étant plus détaillées et exhaustives, une analyse plus fine a été réalisée permettant d'étudier notamment la saisonnalité, les espèces touchées et les types de toxines associés.

2.2.2.3 Étude de la saisonnalité

La survenue des cas de botulisme suit un rythme saisonnier chez les oiseaux d'élevage avec une incidence significativement plus élevée au cours du troisième trimestre (test de Student) et dans une moindre mesure au cours du quatrième trimestre de chaque année (Figure 8). Ainsi 47 % des foyers recensés chez les oiseaux d'élevage ont lieu au cours du 3^e trimestre tandis que 26% des foyers recensés chez les oiseaux d'élevage sont observés durant le 4^e trimestre.

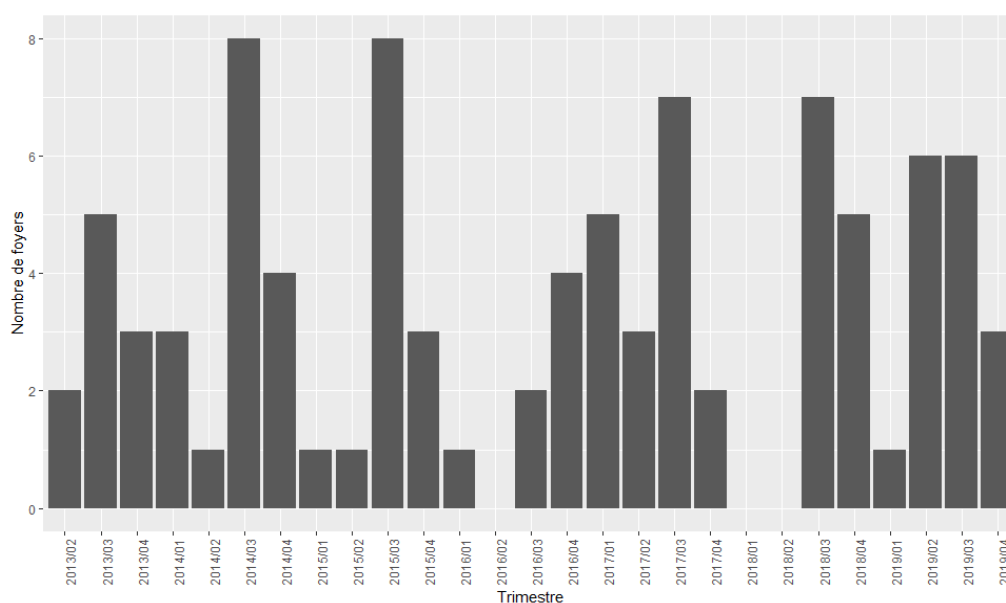


Figure 8 : Répartition par trimestre des foyers recensés sur des oiseaux d'élevage (n = 91) (Source LNR)

2.2.2.4 Répartition géographique

La majorité des foyers en élevages de volailles se développent dans le grand ouest de la France, notamment en Bretagne (42 % des foyers de volailles), région de forte production, mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions (Figure 9). Sur cette figure, la taille des cercles est proportionnelle au nombre de foyers observés (n = 1 à 3).

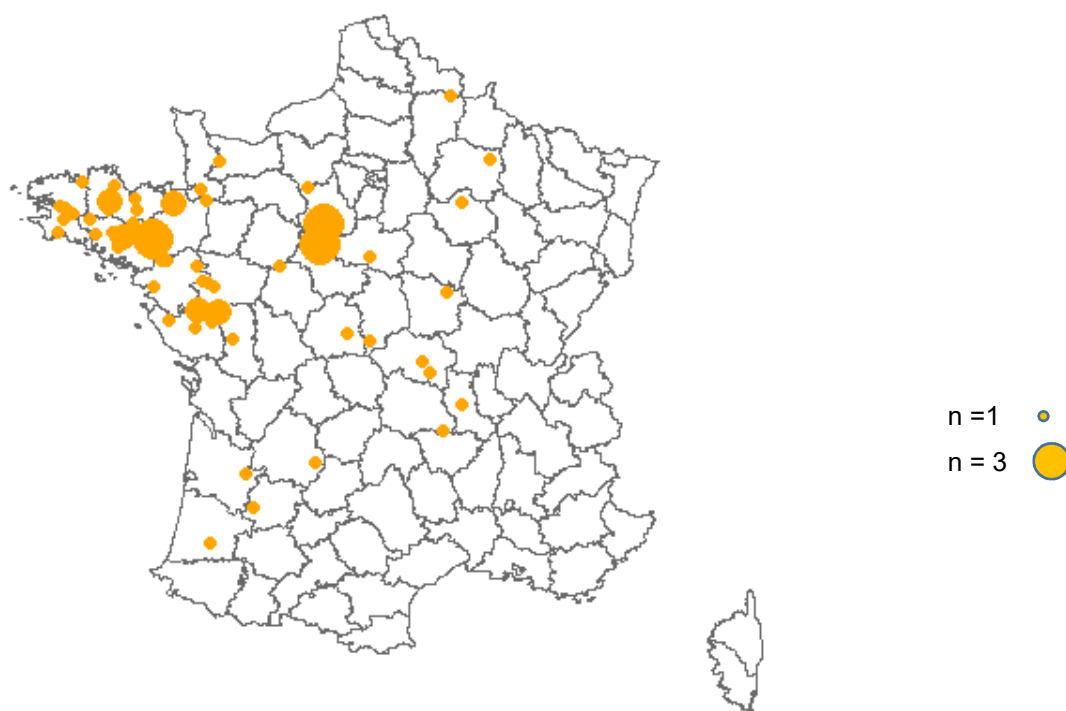


Figure 9 : Répartition des foyers de botulisme recensés sur des oiseaux d'élevage de 2013 à 2019 (n = 77)
(Source LNR)

Une recrudescence de cas est observée certaines années, sans pour autant que les enquêtes épidémiologiques aient permis d'en identifier les causes. Même si la Bretagne semble être la région la plus concernée par les cas de botulisme tant bovins qu'aviaires, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre les pics annuels de survenue dans ces deux filières.

2.2.2.5 Caractéristiques des élevages de volailles atteints

Parmi les 81 foyers identifiés chez les volailles depuis 2012, les espèces les plus touchées par le botulisme (Figure 10) sont les dindes (n = 41 foyers, 51 %) puis les poules pondeuses et poulets de chair (n = 28 foyers, 35 %). Pour les dindes, ce sont les types mosaïques C/D (n = 23 occurrences, 47%) et D/C (n = 15 occurrences, 31%) qui sont les plus fréquents, alors que la majorité des types identifiés chez les poules pondeuses et les poulets de chair sont de type mosaïque C/D (n = 28 occurrences, 85 %), comme chez les pintades. La forme C/D est donc majoritaire chez la plupart des espèces d'oiseaux, et la part de la forme D/C n'est pas négligeable chez les dindes.

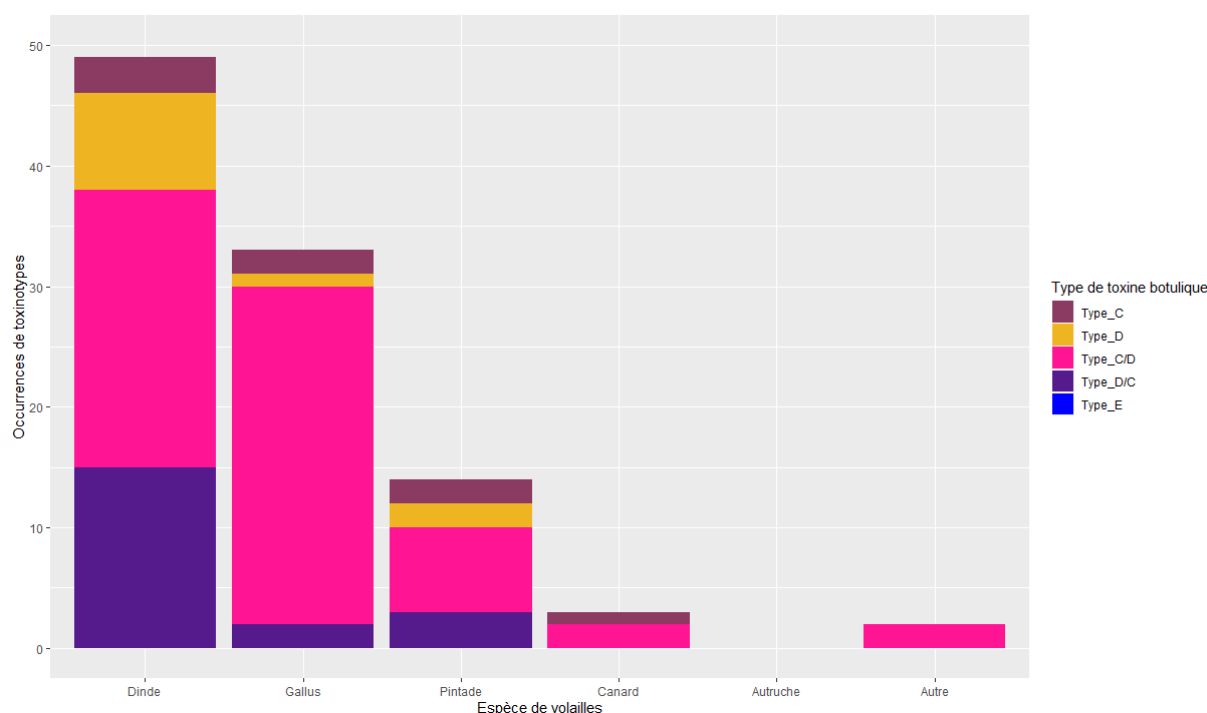


Figure 10 : Répartition des types de *C. botulinum* recensés par espèce de volailles (n = 81 foyers) de 2013 à 2019 (Source LNR)

L'âge à l'apparition des signes cliniques en élevage est très variable selon les espèces, mais il est à noter que les cas se développent le plus souvent en fin de période d'élevage :

- Pour les dindes (n = 37), la médiane est de 88 [Q1 = 72 et Q3 = 105] jours ;
- Pour les *gallus* (n = 19), la médiane est de 43 [Q1 = 33 et Q3 = 74] jours ;

Sur un très faible nombre de données,

- Pour les pintades (n = 6), la médiane est de 63,5 [Q1 = 47,25 et Q3 = 75,25] jours ;
- Pour les canards (n = 2), la médiane est de 73,5 [Q1 = 72,75 et Q3 = 74,25] jours.

2.2.2.6 Situation dans les autres pays européens

Les données de surveillance récoltées dans le cadre du projet européen ANIBOTNET dans six autres pays (Italie, Belgique, Pologne, Pays-Bas, Irlande et Espagne) sur la période 2016 à 2020 montrent les mêmes tendances entre ces six pays, et diffèrent substantiellement des données recueillies en France.

Au cours de cette période, 114 foyers de botulisme ont été recensés dans ces six pays, ce qui est faible en comparaison des 208 foyers recensés en France. Les raisons de ces différences, qui peuvent dépendre de multiples facteurs (incidence réelle, pression de surveillance, nombre et types d'élevages, espèces animales surveillées, système de surveillance...) n'ont pas été examinées. Les espèces les plus représentées sont les bovins, les volailles et les oiseaux sauvages. Cependant, des différences de répartition entre espèces sont observées selon les pays. La toxine majoritaire mise en évidence chez les oiseaux (d'élevages et sauvages) est le type C/D. Le type E n'a pas été mis en évidence chez les oiseaux d'élevage depuis 2000. Par contre, il a été mis en évidence une fois aux Pays-Bas sur des oiseaux sauvages en 2016. Les données recueillies ne laissent pas apparaître une saisonnalité nette des foyers, sauf chez les oiseaux sauvages, chez lesquels les foyers sont principalement identifiés en été.

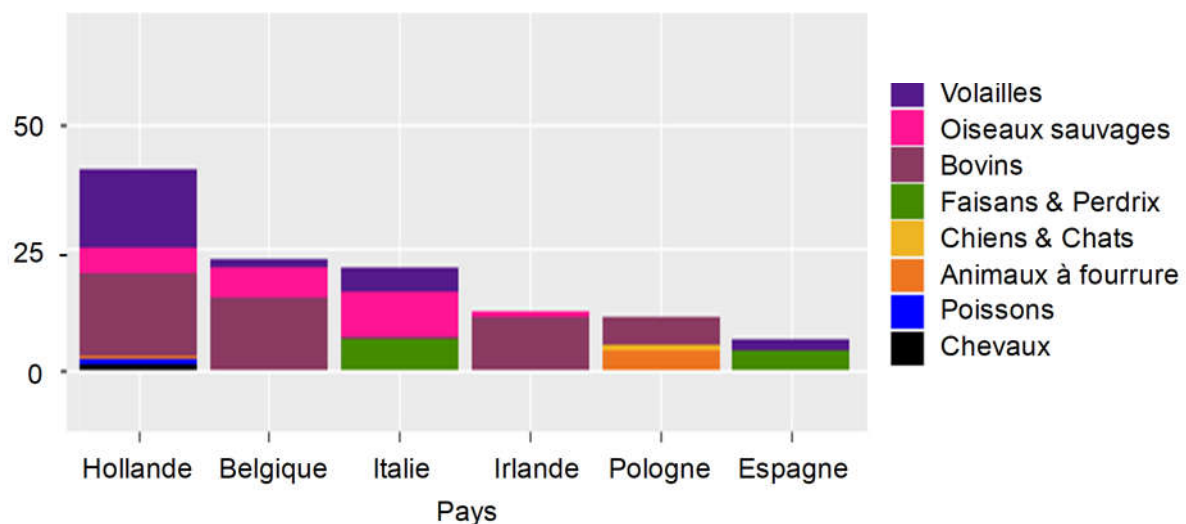


Figure 11 : Répartition des foyers par catégorie d'animaux et par pays (n = 114) de 2016 à 2020 (Source ANIBOTNET)

2.2.3 Synthèse

L'analyse de ces données sur la période 2005-2019 a permis de mettre en évidence les espèces et filières concernées par les cas de botulisme animal en France. D'une manière générale, les oiseaux sont très fortement concernés, qu'il s'agisse de volailles ou d'oiseaux sauvages. L'analyse des types de *C. botulinum* par filière montre une prédominance de la forme mosaïque C/D chez les oiseaux (d'élevage ou sauvages).

L'analyse détaillée effectuée à partir des données du LNR permet d'apporter des éléments descriptifs intéressants pour les cas survenus chez les oiseaux (espèces de volailles concernées, âge de survenue des cas, types dominants par espèce, etc.). Mais cette analyse reste difficile à conduire sur des données rétrospectives reposant presque uniquement sur des fiches commémoratives peu détaillées accompagnant les prélèvements au laboratoire.

Les cas présentés dans ce rapport correspondent aux foyers de botulisme animaux recensés par le CNR et le LNR. Toute suspicion de botulisme faisant l'objet d'une demande de diagnostic de laboratoire passe actuellement *in fine* par le LNR. Le botulisme animal étant une maladie à déclaration obligatoire en France, l'ensemble des prélèvements collectés devraient donc transiter par les laboratoires de référence dès suspicion. Il est cependant probable qu'un certain nombre de suspicions ne soient pas déclarées sans toutefois pouvoir en évaluer l'ampleur (Skarin *et al.* 2013). En filières volailles, les foyers de botulisme s'expriment plus fréquemment en fin de période d'élevage. L'éventualité de lots partant à l'abattoir en début d'incubation, avant le démarrage de l'expression clinique ne peut être exclue.

Les types de *C. botulinum* retrouvés dans les foyers de botulisme dans les élevages avicoles sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal durant cette période. Pour ce qui est du botulisme de type E, aucun cas n'a été déclaré dans les filières avicoles depuis 2000, date du dernier cas recensé sur des volailles. En 1997, le Réseau National d'Observations Épidémiologiques en Aviculture Pathologie aviaire (RNOEA) avait en effet enregistré un premier foyer de type E, suivi d'autres foyers en 1998, 1999 et 2000, tous constatés chez l'espèce *Gallus gallus* (d'après Drouin, Durand, Dufour (1999), cité dans AFSSA (2002)).

Au cours de la période de 2009-2019, 592 foyers de botulisme animal ont été recensés en France par le LNR et le CNR, principalement chez les oiseaux d'élevage (41,7 %), les oiseaux sauvages (35,8 %) et les bovins (20,3 %). Chaque année, une trentaine de foyers sont recensés dans les élevages de volailles, une vingtaine chez les oiseaux sauvages et une dizaine dans l'espèce bovine. Ce nombre fluctue néanmoins selon les années. Le type mosaïque C/D représente la forme dominante chez les oiseaux d'élevage, suivi des types D et D/C.

L'aspect saisonnier de la maladie a pu être mis en évidence chez les oiseaux d'élevage avec une incidence significativement plus élevée au cours du troisième trimestre et dans une moindre mesure au cours du quatrième trimestre de chaque année. La majorité des foyers de botulisme aviaire sont apparus dans le grand ouest de la France, zone d'élevage importante, mais des cas groupés ont pu être observés dans d'autres régions.

Les types de botulisme retrouvés dans les foyers de botulisme en élevages de volailles sont différents de ceux identifiés dans les foyers humains ces dix dernières années en France et aucun foyer de botulisme humain investigué par Santé publique France et le CNR n'a été rattaché à un foyer de botulisme animal. Par ailleurs, aucun cas de botulisme de type E n'a été déclaré depuis 2000, date du dernier cas recensé sur des volailles.

Enfin, il est probable qu'une part non négligeable de cas cliniques chez l'animal ne fassent pas l'objet d'un diagnostic de confirmation au laboratoire et de ce fait ne puissent être recensés. L'importance de cette sous déclaration est difficile à évaluer et varie vraisemblablement selon les espèces.

2.2.4 Cycle épidémiologique de *Clostridium botulinum* en élevage de volailles

Contrairement aux épisodes de botulisme bovin, les sources de contamination à l'origine des épisodes de botulisme dans les élevages avicoles sont rarement identifiées. Chez la volaille, les foyers de botulisme sont principalement associés à la présence d'oiseaux porteurs de *C. botulinum* (Dohms 2008) et à tout animal extérieur à l'élevage s'y introduisant et qui contaminerait la litière et/ou l'aliment *via* ses fèces ou son cadavre (rongeurs, oiseaux sauvages et autres, JP. Vaillancourt, communication personnelle) (cf. Figure 12 et Tableau 2). Les ténébrions (*Alphitobius diaperinus*), des insectes proliférant dans les locaux et l'environnement proche (abords des bâtiments), peuvent constituer des réservoirs et des vecteurs de spores de *C. botulinum* et contribuer ainsi à la dissémination. Les vêtements et bottes des opérateurs (par exemple les ramasseurs qui interviennent dans les bâtiments) ainsi que le matériel utilisé, ont été également rapportés comme sources possibles de contamination (Souillard *et al.* 2021).

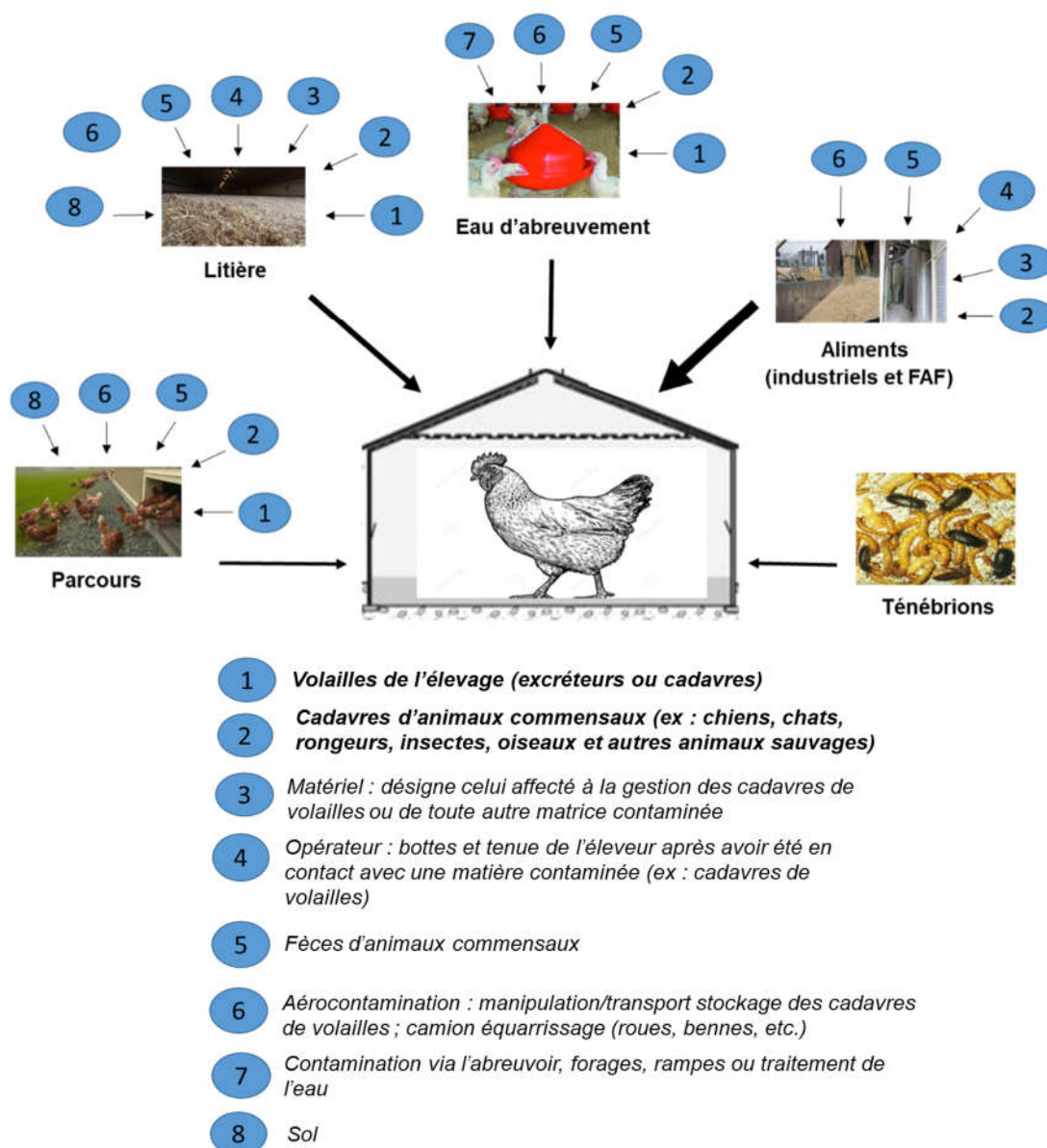


Figure 12 : Véhicules d'introduction de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles

(les véhicules les plus fréquents sont indiqués en gras, la largeur des flèches est proportionnelle à l'importance de l'introduction)

Le tableau 2 présente la hiérarchisation des différentes sources initiales et véhicules de contamination de *C. botulinum* (forme sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volailles, par ordre d'importance décroissante. L'aliment apparaît comme étant le véhicule de contamination principal de *C. botulinum* dans ces élevages. En effet, cette matrice peut se contaminer suite à l'incorporation accidentelle d'un animal ou du cadavre d'un animal lors de la récolte ou au cours de la période de stockage de l'aliment dans le silo. Dans le cas où l'éleveur produit son propre aliment, le matériel utilisé lors de la récolte peut également constituer un véhicule de contamination (par exemple, même remorque utilisée pour le transport du fumier et pour la récolte). Pour les aliments industriels, les bonnes pratiques agricoles sont très importantes à suivre et permettent de maîtriser ces véhicules de contamination (Anniballi, Fiore, *et al.* 2013).

La litière apparaît comme étant également un véhicule de contamination de *C. botulinum* dans un élevage de volailles (Bano *et al.* 2013; Fillo *et al.* 2021). Si elle n'est pas protégée durant le stockage, elle peut être contaminée par les fèces des oiseaux, notamment de ceux qui sont porteurs asymptomatiques de *C. botulinum* (prévalence inconnue).

Tableau 2 : Hiérarchisation par ordre d'importance décroissante des véhicules de contamination (colonne de gauche) de *C. botulinum* (formes sporulée, végétative et toxines) dans un élevage de volaille.

En regard la hiérarchisation des sources initiales de contamination des véhicules sus-cités et l'argumentaire de cette hiérarchisation.

Véhicule de contamination		
	Source initiale de contamination du véhicule	Argumentaire de hiérarchisation
Aliments	Cadavre d'animaux commensaux	Inclusion d'un cadavre d'animal lors de la récolte ou du stockage de l'aliment dans le silo
	Matériel	Si le camion d'aliment est contaminé, cela peut constituer une source. Si l'éleveur produit son propre aliment, le matériel utilisé lors de la récolte peut constituer un véhicule de contamination (par exemple, même remorque pour du fumier et pour la récolte sans précaution sanitaire). Pour les aliments industriels, les bonnes pratiques agricoles (suivi des recommandations pour optimiser les conditions de récolte, de stockage...) sont très importantes à suivre.
	Fèces d'animaux commensaux	Secondaire par rapport aux cadavres d'animaux commensaux et/ou autres animaux et au matériel
Litières	Animaux excréteurs dans le troupeau	Contamination de la litière par les fèces Portage asymptomatique de <i>C. botulinum</i> chez les volailles (prévalence inconnue)
	Matériel contaminé	Si les équipements utilisés pour manipuler la litière sont contaminés, il y a un risque de contamination et d'introduction dans le bâtiment
	Cadavre d'animaux commensaux et/ou volailles	Inclusion d'un cadavre d'animal commensal lors de la récolte Contamination de la litière par des cadavres de volailles en cours d'élevage
	Litière neuve contaminée	Contamination préalable de la matière première utilisée pour la litière
Eau d'abreuvement	Cadavre d'animaux commensaux et/ou volailles	Contamination de l'eau d'abreuvement par un cadavre
	Matériel	Le matériel, s'il est contaminé ou s'il n'est pas nettoyé, peut contaminer l'eau d'abreuvement et distribuer la contamination de façon homogène
	Fèces d'animaux commensaux	En retrait par rapport aux cadavres d'animaux commensaux et/ou matériel
Ténébrions (réservoir et véhicule)		Ils peuvent contribuer à la persistance de <i>C. botulinum</i> dans l'élevage.
Le sol (réservoir)		Il peut constituer une source de contamination (accès à un parcours extérieur) ou indirectement par contamination de la litière.

2.2.5 Pathogénèse et signes cliniques

Le botulisme a déjà été rapporté chez 264 espèces d'oiseaux représentant 39 familles (Rocke, 2006). En élevage avicole, les espèces concernées sont les poulets de chair, dindes, faisans et, dans une moindre mesure, les canards, poules pondeuses (élevées sur litière ou en plein air uniquement), oies, cailles et pintades (Le Marechal *et al.*, 2016, Le Marechal *et al.*, 2017, Souillard *et al.*, 2014, Ventujol *et al.*, 2017, Bano, 2019).

Dans les élevages de volaille de chair, les mâles semblent plus affectés que les femelles, en particulier chez les dindes (Popp *et al.*, 2012, Smart *et al.*, 1983, Souillard *et al.*, 2014). Aucune explication à cette observation n'a été apportée à ce jour. Il est à noter que la durée d'élevage des mâles est plus longue

que celle des femelles en filière chair, cependant l'impact de ce facteur sur la survenue d'un foyer de botulisme n'a pas été évalué.

La majorité des espèces d'oiseaux sont expérimentalement sensibles aux différentes toxines botuliques lorsqu'elles sont inoculées par voie intraveineuse, mais à des degrés divers selon l'espèce et les doses reçues (le poulet par exemple étant, par voie intraveineuse, 3000 fois plus sensible à la toxine A qu'à la toxine C) (Gross et Smith 1971; Miyazaki et Sakaguchi 1978). Néanmoins, les seules souches de *C. botulinum* naturellement impliquées dans les foyers de botulisme chez les oiseaux sont celles produisant les toxines C, D ou leurs mosaïques C/D et D/C, la toxine E et, beaucoup plus rarement, la toxine A.

2.2.5.1 Pathogenèse

Dans sa revue bibliographique de 1989, Popoff présente le botulisme chez les poulets de la façon suivante : « Les poulets se contaminent par des spores de *C. botulinum* de l'environnement : sol, nourriture, eau, litière. Les spores ingérées germent, prolifèrent et produisent de la toxine principalement dans le caecum. Puisqu'il faut des quantités importantes de toxine par voie orale pour causer la maladie, et que de telles sources de toxines n'ont pas été retrouvées dans l'environnement des élevages de poulets où s'est déclaré du botulisme, on admet que la production de toxine a lieu *in vivo*. L'absorption de toxine formée dans le tube digestif est responsable des symptômes » (Popoff 1989).

Trois études (Miyazaki et Sakaguchi 1978; Kurazono, Shimozaawa et Sakaguchi 1987; Hyun et Sakaguchi 1989) de reproduction expérimentale de botulisme aviaire de type C, réalisées par la même équipe japonaise montrent, *via* la ligature des caeca des animaux, que ceux-ci sont indispensables au développement du botulisme. À partir de ces trois études, cette équipe a émis l'hypothèse suivante sur la pathogenèse du botulisme chez le poulet de chair (cf Figure 13) : les poulets ingèrent des spores de *C. botulinum*, qui se développent et produisent la toxine botulique au niveau des caeca. La toxine, les spores et les cellules végétatives sont ensuite excrétées dans les fientes, avant d'être ingérées de nouveau par les animaux *via* le phénomène de la coprophagie. La toxine passe alors dans la circulation sanguine à travers l'épithélium intestinal au niveau de la partie supérieure de l'intestin tandis que les spores nouvellement ingérées se développent de nouveau, évoluant vers des formes végétatives au niveau du caecum, lesquelles vont produire de la toxine botulique au cours de leur croissance. La toxine va ainsi s'accumuler dans le sang jusqu'à atteindre le seuil d'induction des signes cliniques. Aucune autre étude de ce type n'a été publiée pour appuyer cette hypothèse. Le faible taux de détection de toxine dans les échantillons environnementaux (litière, eau, aliment), au regard de la quantité nécessaire pour induire des signes cliniques chez le poulet, est en faveur de l'hypothèse d'une toxi-infection plutôt que d'une intoxication (Dohms, Allen et Rosenberger 1982). Cet élément supplémentaire appuie les résultats obtenus dans ces études et est en faveur de cette hypothèse de la toxi-infection initiale, c'est-à-dire de la production *in situ* de la toxine botulique.

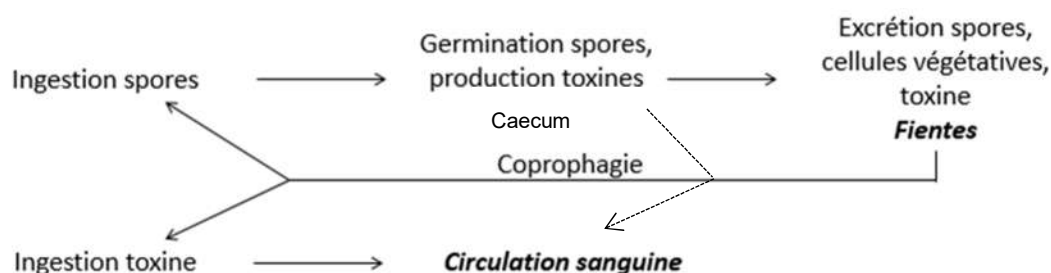


Figure 13 : Pathogenèse du botulisme chez le poulet de chair

Une autre étude (Okamoto *et al.* 1999) avait montré que l'inoculation de 10^4 à 10^7 spores ne permettait pas d'induire les signes cliniques du botulisme chez des poulets de chair et que seule l'utilisation d'un immunosuppresseur (cyclophosphamide) avait permis dans cette expérimentation l'installation de la souche au niveau caecal et l'induction des signes cliniques.

Plusieurs études rapportent que différents organes, notamment le foie, la rate et le jabot, sont infectés par *C. botulinum* chez les individus présentant des signes cliniques, mais également chez des individus asymptomatiques dans les lots atteints (Dohms, Allen et Rosenberger 1982; Anniballi *et al.* 2012;

Franciosa *et al.* 1996; Anniballi, Auricchio, *et al.* 2013; Woudstra *et al.* 2012). Une autre étude a montré que l'analyse des foies des animaux atteints est une méthode efficace pour la mise en évidence de *C. botulinum* lors des foyers de botulisme aviaire (Le Maréchal *et al.* 2016). Le rôle de la colonisation des organes par l'agent pathogène lui-même dans l'apparition des signes cliniques ou dans le développement de la maladie est inconnu à ce jour. Mais le fait que celui-ci ne soit détecté que dans les tissus des animaux provenant d'élevages atteints suggère une association entre la présence de celui-ci et le déclenchement de la maladie (Dohms, Allen et Rosenberger 1982).

Il faut rappeler, enfin, que les espèces d'oiseaux diffèrent par leur sensibilité à la toxine. Par exemple, la toxicité de la toxine C inoculée par voie intraveineuse, exprimée en nombre de doses létales souris (MLD pour « *mouse lethal doses* »), a été évaluée chez le poulet à 16 000 MLD₅₀ / kg (5600 MLD₅₀ / kg pour la toxine C/D) contre 320 MLD₅₀ / kg chez la dinde et 70 MLD₅₀ / kg chez le faisan (Gross et Smith, 1971). Une plus faible sensibilité à la toxine C rend ainsi nécessaire l'absorption d'une quantité plus importante de toxine pour que des signes cliniques soient observés chez les poulets (Popoff 1989; Okamoto *et al.* 1999; Le Maréchal, Woudstra et Fach 2016). Cette différence de sensibilité aux toxines pourrait expliquer les difficultés rencontrées pour détecter la toxine dans le sang chez les dindes et faisans cliniquement atteints lors des analyses menées dans le cadre de confirmations diagnostiques, contrairement au poulet (Le Maréchal, Woudstra et Fach 2016).

2.2.5.2 Signes cliniques

Le botulisme aviaire se manifeste par une paralysie flasque ascendante qui progresse des pattes vers le cou et les paupières. Il est souvent associé à une détresse respiratoire, provoquée par la paralysie de la musculature thoracique.

Le premier signe clinique chez les poulets de chair est donc la paralysie des pattes (Bano, 2019). Il semblerait que la paralysie touche ensuite rapidement, voire en premier lieu, les ailes qui restent écartées et pendantes. Les signes caractéristiques du botulisme sont : décubitus sternal avec les yeux fermés, réticence à se déplacer, paralysie flasque du cou avec une incapacité à relever la tête (Sharpe *et al.*, 2011). Les oiseaux sont très souvent incapables de redresser la tête, de marcher, ou même de se tenir debout ou de fuir. Ils restent prostrés (Skarin *et al.*, 2015). Des souillures au niveau des narines ont été parfois signalées chez les poulets de chair et les poules pondeuses (Skarin *et al.*, 2015, Dohms *et al.*, 1982, Sharpe *et al.*, 2011). En élevage de dindes, les signes cliniques peuvent être parfois moins évidents et, le plus souvent, le botulisme est suspecté en cas d'augmentation soudaine du taux de mortalité (Bano, 2019).

Au sein des élevages atteints, des taux de mortalité élevés sont rapportés. Par exemple en France, le taux de mortalité moyen relevé dans le cadre d'investigations de foyers confirmés était de 13,9 % (Souillard *et al.*, 2014), ce taux variant de 1 % à 25 % en élevage de volailles selon certaines études (Dohms *et al.*, 1982) ou de 2,8 % à 35,2 % selon d'autres (Souillard *et al.*, 2014). Des taux encore plus élevés ont été également rapportés chez d'autres espèces : jusqu'à 30 % (Smart *et al.*, 1983) ou 50 % en élevages de dindes (Popp *et al.*, 2012) et 84 % en élevages de faisans (Blandford, 1976).

Le cas particulier du portage asymptomatique de *C. botulinum* chez les volailles est traité dans la partie 2.2.6, notamment en raison des conséquences que cela peut avoir sur l'interprétation des résultats d'identification dans les tissus animaux.

2.2.5.3 Diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel doit être fait avec les intoxications aux ionophores (en particulier chez la dinde), au sélénium ou au plomb et les maladies susceptibles de provoquer des signes neurologiques telles que la maladie de Newcastle, la maladie de Marek ou l'Influenza aviaire. Les intoxications aux ionophores incorporés dans l'alimentation des volailles comme anticoccidien peuvent entraîner des signes cliniques d'incoordination, de faiblesse des pattes, de diarrhée et de dépression difficilement différenciables du botulisme (Dowling 1992). Le diagnostic de certitude repose sur des analyses de laboratoire pour doser les ionophores dans l'aliment et les tissus animaux.

La démarche diagnostique s'appuie systématiquement sur la prise en compte du contexte épidémiologique et une confirmation par des analyses de laboratoire.

Suite à une étude menée par le LNR entre 2013 et 2016 (Le Maréchal *et al.* 2016), il a été montré que l'analyse par PCR en temps réel, après une étape d'enrichissement, de quatre foies prélevés sur des animaux présentant des signes cliniques évocateurs de botulisme est la méthode recommandée pour confirmer le botulisme aviaire au laboratoire (mise en évidence de l'agent pathogène). Les foies doivent être congelés au plus vite après prélèvement afin de garantir la stabilité de l'échantillon (Le Maréchal *et al.* 2017).

2.2.5.4 Aspects méconnus et non couverts de la maladie

Les facteurs à l'origine de l'initiation d'un foyer de botulisme aviaire ne sont pas élucidés, en particulier le rôle du portage asymptomatique dans l'émergence d'un foyer est souvent mis en avant mais non clairement démontré. Même si plusieurs études émettent l'idée que la toxine est produite *in vivo*, la pathogenèse du botulisme aviaire n'est pas encore clairement élucidée, notamment le rôle joué par la bactérie dans la maladie. La dose de *C. botulinum* nécessaire pour initier un foyer, les conditions propices à la croissance de la bactérie *in vivo* et à la production de toxines sont inconnues.

2.2.6 Présence et concentration des différentes formes de *C. botulinum* dans les tissus chez les volailles

Bien que les volailles puissent être atteintes de botulisme E et A, ce chapitre se limitera au botulisme de type C, C/D, D, D/C, en rappelant que la majorité des foyers de botulisme aviaire reconnus en France sont de type C/D et que les poulets sont, contrairement à d'autres espèces comme les dindes, plus résistants cliniquement aux types D et D/C.

Pour répondre aux questions de la saisine, il est nécessaire de définir, en s'appuyant sur les publications scientifiques ayant trait au botulisme chez les volailles, quelles sont les parties du corps, tissus et sécrétions éventuellement manipulés et/ou consommés par l'Homme qui, en fonction du statut clinique des animaux, contiennent l'agent pathogène et/ou sa toxine, et à quelles concentrations.

En pratique, la recherche de neurotoxine est réalisée à partir des prélèvements (sérum, surnageant obtenu après broyage et centrifugation d'échantillons de tissus divers, contenu du tractus digestif) par le test de référence sur souris (MBA pour « *Mouse Bio assay* »). Ce test permet en outre de quantifier la toxine présente en l'exprimant en nombre de doses létales souris (MLD pour « *mouse lethal doses* ») par mL ou g d'échantillon analysé. Des techniques alternatives ont été aussi développées, exploitant les propriétés antigéniques des neurotoxines (tests ELISA) (Masters et Palmer 2021) ou fondées sur la recherche de leur activité endopeptidasique (Endopep-MS) (Hedeland *et al.* 2011). Il est enfin possible de rechercher par qPCR et/ou RT-qPCR les acides nucléiques (DNA/RNA) associés au gène codant la toxine. Ces acides nucléiques peuvent être associés au complexe botulique et sont parfois détectables par PCR alors que le MBA reste négatif (Masters et Palmer 2021). La détection de la bactérie par isolement et caractérisation selon les méthodes conventionnelles classiquement utilisées en bactériologie est difficile (Le Gratiot *et al.* 2020) et la méthode de choix passe par une mise en culture de l'échantillon en milieu liquide (phase d'enrichissement) suivie d'une recherche de la toxine produite, s'il y a eu multiplication bactérienne, par MBA, ELISA, ou plus communément par détection du gène codant la neurotoxine, par PCR (Le Maréchal *et al.* 2017). Les seules techniques permettant d'identifier les types mosaïques C/D et D/C sont la PCR et l'Endopep-MS couplée à une immuno-capture permettant au préalable la discrimination des types C, D et des mosaïques (Björnstad *et al.* 2014). La mise en culture de dilutions sériées des échantillons permet en outre une approche de quantification bactérienne exprimée en nombre le plus probable (NPP) par mL ou g d'échantillon analysé.

Cependant, l'absence de méthode normalisée pour détecter *C. botulinum* ou la toxine botulique dans les tissus, notamment en ce qui concerne les conditions de culture et d'enrichissement, explique que les méthodes utilisées varient d'une étude à l'autre et qu'il soit compliqué de dresser une synthèse des résultats, comme de déterminer avec certitude les niveaux de contamination. La variabilité des résultats pourrait également être liée à l'existence d'un portage à un niveau très faible, inférieur au seuil de détection des méthodes disponibles. A noter enfin la rareté des données d'ordre quantitatif présentées dans les études relatives au botulisme chez les volailles, les résultats étant généralement exprimés

qualitativement (spores/bactéries et/ou toxine détectées ou non détectées) et exprimant une variabilité selon les prélèvements analysés (tous, pour un même individu, ne fournissant pas un résultat positif).

En raison de leur impact possible en santé publique, sont présentées ici les données relatives à la présence de *C. botulinum* et/ou de la toxine botulique dans le tube digestif, le sang et différents autres tissus, notamment le foie et les muscles, et enfin, les œufs. Ces éléments sont présentés dans deux contextes, celui d'un élevage cliniquement atteint de botulisme et celui d'un élevage apparemment indemne mais incriminé comme étant la source de contamination d'élevage bovin dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

2.2.6.1 Cas d'un élevage cliniquement atteint de botulisme

■ **Cas des volailles présentant des signes cliniques de botulisme**

Les résultats d'analyses pratiquées sur des oiseaux présentant des signes cliniques sont les plus nombreux, mais pour autant ne renseignent pas, dans la majorité des cas, sur la quantité de bactéries ou de toxine présentes dans le tube digestif et les différents tissus. Ces analyses ont en effet été menées dans une optique de confirmation diagnostique et non d'étude du niveau de contamination des tissus.

Pour les raisons techniques et réglementaires déjà évoquées, les données de diagnostic portent essentiellement sur la détection de la bactérie, la méthode recommandée actuellement consistant, après mise en culture, à détecter par PCR le gène codant pour la toxine dans les foies d'au moins quatre volailles cliniquement atteintes. La bactérie peut être détectée, pour un sujet donné, dans tout ou partie des échantillons.

D'après les éléments disponibles dans la littérature, *C. botulinum* peut être détecté dans différents organes et fluides biologiques chez les animaux présentant des signes cliniques : foie, rate, rein, jabot, contenu intestinal, contenu caecal, bile, gésier, estomac et cloaque.

La neurotoxine peut être détectée dans le contenu du tractus digestif (jabot, estomac, intestin et caeca) (Pigatto *et al.* 2007), ainsi que dans le sérum, le foie, la rate, et plus rarement dans différents tissus tels les muscles squelettiques et les poumons (Masters et Palmer 2021). Le faible taux de détection de la toxine dans le sérum peut signifier des concentrations inférieures à la limite de détection. Il faut souligner en outre que la toxine est rarement identifiée dans l'ensemble des localisations précédemment évoquées chez un même sujet, ce que soulignent Masters et Palmer (2021) qui, dans leur étude portant sur 103 oiseaux testés et atteints de botulisme de type C/D, détectent simultanément la toxine dans le sérum, le foie, l'estomac (proventricule et gésier), et les fientes chez seulement deux oiseaux (canards).

La question de la contamination éventuelle des œufs par *C. botulinum* est aussi posée. Aucune analyse jusqu'à ce jour n'a permis de détecter la bactérie ou la toxine dans le contenu (jaune ou blanc) des œufs. Ainsi, il est admis qu'il n'existe pas de contamination verticale. Chez une pondeuse malade, une quantité de toxine circulante suffisamment importante pour permettre sa diffusion dans l'œuf en cours de formation et de transit dans l'oviducte provoquerait la mort rapide de l'animal (avant même que la toxine n'atteigne l'œuf). Et habituellement la quantité de toxine présente dans le sérum de l'animal malade est assez faible (expliquant d'ailleurs les difficultés de diagnostic rencontrées). En revanche, la présence des bactéries dans le cloaque peut permettre la contamination de la coquille en surface. Dans l'étude d'un foyer de botulisme de type C/D affectant un élevage de poules pondeuses âgées de 46 semaines, Souillard *et al.* (2017) ont constaté la présence de *C. botulinum* sur les coquilles d'œufs pondus 5 mois après l'épisode ; toutefois, les auteurs n'ont pu définir l'origine de la bactérie, consécutive soit à un faible portage cloacal (inférieur au seuil de détection), soit à une contamination après la ponte en rapport avec sa persistance dans l'environnement dans la mesure où l'élevage n'avait pas été nettoyé/désinfecté.

■ **Cas des volailles sans signe clinique**

Il est préconisé, en cas de diagnostic sur des lots de volailles partiellement atteints de botulisme de type C/D, C, D ou D/C, d'éliminer les volailles atteintes et de maintenir les sujets sans signe clinique dans le bâtiment après un changement de litière ou un repaillage pour limiter la contamination (coprophagie). Le lot est soumis à un traitement antibiotique par voie orale (β -lactamine en règle générale) et les cadavres sont retirés très régulièrement.

Une étude préliminaire (non publiée) a été menée par le LNR botulisme aviaire pour estimer la prévalence de portage de *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C par des volailles (poulets de chair, poules et dindes) ne présentant pas de signe clinique issus de lots atteints de botulisme. Les prélèvements étaient collectés au moment du départ à l'abattoir (à la fin du délai réglementaire correspondant au temps d'attente lié au traitement du lot par antibiotique) et le gène codant pour la toxine botulique détecté par PCR en temps réel après une étape d'enrichissement de l'échantillon. Dans les 5 élevages examinés, les résultats étaient positifs pour le foie chez 60 % à 100 % des animaux testés (5 animaux par élevage) et 0 à 100 % pour le contenu caecal des animaux testés (5 animaux par élevage). Ce résultat montre donc que les animaux issus de lots ayant rencontré un épisode de botulisme mais ne présentant pas de signe clinique peuvent héberger *C. botulinum* dans le foie et les caeca (Communication LNR).

Deux autres études rapportent également ce portage asymptomatique chez les volailles issues d'élevages atteints (Dohms *et al.*, 1982, Roberts and Aitken, 1974). Il a ainsi été montré que le foie, la rate, le duodénum, le jabot et la bile fournissaient des résultats positifs pour *C. botulinum* type C chez des volailles sans signe clinique issus du bâtiment atteint et d'un bâtiment adjacent dans lequel aucun signe clinique n'avait été détecté (Dohms *et al.*, 1982).

On dispose de peu de données sur la persistance du portage lorsque le lot a reçu un traitement antibiotique. Anza *et al.* (2016) décrivent une décroissance de l'excrétion fécale de *C. botulinum* de type C/D chez 32 oiseaux sauvages recueillis et soignés dans des centres de soins, excrétion détectée chez 30 % d'entre eux à l'arrivée et aucun sept jours plus tard *via* l'analyse d'écouvillons cloacaux. En revanche, dans les élevages atteints où les volailles sont maintenues dans un environnement contaminé, le traitement antibiotique, tel que pratiqué, ne permet pas d'éliminer l'agent pathogène et une résurgence du foyer est fréquemment observée.

2.2.6.2 Portage asymptomatique de *C. botulinum* dans des élevages sans historique de botulisme

Le portage asymptomatique, longtemps controversé, s'exprime par la présence de bactéries dans le contenu du tube digestif et dans les fientes. Les données disponibles découlent soit d'investigations destinées à évaluer l'importance du portage dans les effectifs sans historique de botulisme, soit d'investigations dans des élevages de volailles en lien épidémiologique avec des foyers bovins. Elles portent principalement sur le portage asymptomatique de *C. botulinum* de type C/D et D/C.

S'agissant de *C. botulinum* de type C/D auquel les volailles sont les plus sensibles, la prévalence du portage apparaît comme relativement faible. Une équipe norvégienne a ainsi testé 100 lots de poulets de chair pour évaluer la prévalence du portage de *C. botulinum* de type C et C/D dans des élevages sans historique et avec historique de botulisme et n'a pu mettre en évidence l'agent pathogène dans aucun des caeca analysés (Hardy et Kaldhusdal 2013). Les mêmes résultats ont été décrits en Corée du Sud, tous négatifs après analyses portant sur 300 poulets d'élevage sans historique de botulisme (mais tous positifs pour des prélèvements issus de huit sujets malades) (Jang *et al.* 2014). Ces résultats sont concordants avec une étude antérieure menée en Grande-Bretagne au cours de laquelle l'analyse de 100 litières issues d'élevages sans historique de botulisme n'avaient pas permis de détecter *C. botulinum* (T. A. Roberts et Aitken 1974). Une étude menée en 2011 par le LNR en France pour évaluer la prévalence de *C. botulinum* dans les élevages de poulets de chair, en réalisant des prélèvements dans 23 élevages, n'a permis de détecter *C. botulinum* de type C/D que dans un seul d'entre eux à partir de trois prélèvements d'environnement (pédichiffonnette du bâtiment, pédichiffonnette des extérieurs, chiffonnettes du bac d'équarrissage) mais dans aucun des caeca analysés (données non publiées). Des résultats différents peuvent être cependant observés, puisqu'une étude menée en Suède a permis de détecter *C. botulinum* de type C/D dans 11 % des élevages sains (Blomqvist *et al.* 2009). Le faible taux de détection et la variabilité des résultats pourraient provenir d'un portage à un niveau très faible, inférieur au seuil de détection des méthodes disponibles (Le Bouquin *et al.* 2017; Popoff 1989). Une étude a d'ailleurs permis d'estimer une limite de détection dans les prélèvements caecaux inférieure à 50 spores par g (Woudstra *et al.* 2012). Cette limite de détection serait identique pour des prélèvements cloacaux.

S'agissant de *C. botulinum* de type D/C, une étude menée en France par le LNR (menée en complément de celle précédemment évoquée) dans cinq autres élevages également sans historique de botulisme avait permis de détecter *C. botulinum* type D/C dans les caeca d'une dinde (cinq caeca et cinq foies analysés par élevage) ainsi que dans le fumier de cet élevage (données non publiées). Mais les principales données disponibles résultent des investigations menées dans des élevages de poulets pour identifier la source de contamination d'élevages bovins par *C. botulinum* de type D/C dans le cadre d'épisodes de botulisme chez les bovins. Le poulet est considéré comme résistant au botulisme de type D (Popoff 1989; Gross et Smith 1971) mais peut être porteur asymptomatique. C'est ce qu'ont montré Souillard *et al.* (2014) en détectant la présence de cette bactérie dans la litière et les locaux d'un élevage de poulets de chair incriminé dans la contamination de deux élevages bovins. Un portage du type D/C (détection de la bactérie via des prélèvements cloacaux) a été mis en évidence depuis dans différents élevages de poulets de chair en lien épidémiologique avec des foyers bovins (Le Maréchal *et al.* 2021; Souillard *et al.* 2021). Si l'existence de la circulation et de la persistance de *C. botulinum* de type D/C est maintenant bien établie, on ne dispose cependant pas de précision sur la prévalence de ce portage (étude en cours dans 30 élevages dans le cadre du projet BOTUSOL) et la possibilité que la bactérie puisse être détectées chez certaines volailles dans certains tissus, en particulier le foie.

2.3 Denrées alimentaires d'origine animale (DAOA)

2.3.1 Prévalence, croissance et toxinogénèse dans les DAOA (viandes et produits carnés, œufs et ovoproduits)

2.3.1.1 Données de prévalence dans les DAOA (types C, D, mosaïques C/D, D/C)

■ Méthodes mises en œuvre pour déterminer la présence de *Clostridium botulinum* dans des échantillons alimentaires

C. botulinum est recherché depuis plusieurs décennies (de nombreux articles déjà dans les années 1960 en attestent) dans des échantillons alimentaires, cliniques ou environnementaux et sa présence a été mise en évidence par des techniques variées évoluant au gré des progrès apportés dans les méthodes de détection des bactéries pathogènes. Ces techniques incluent notamment (i) la détection de la toxine botulique dans le bouillon d'enrichissement d'un échantillon par un test sur souris, qui reste la méthode de référence, et la détermination du type de toxine par séroneutralisation, ou (ii) la détection par méthodes moléculaires d'isolats bactériens possédant des gènes codant les toxines botuliques ou de leur présence dans un bouillon d'enrichissement bactérien. L'échantillon est incubé en anaérobiose et souvent chauffé (au moins à 65 °C/10 min selon la norme ISO/TS 17919:2013⁸) préalablement à l'enrichissement afin d'éliminer les cellules végétatives de bactéries compétitrices (Lindström et Korkeala 2006; Lund et Peck 2013).

La recherche de *C. botulinum* dans les aliments n'est pas pratiquée en routine, car la recherche de la bactérie et de la toxine ne peut se faire que dans des conditions de sécurité particulières.

■ Viandes et produits carnés

La bibliographie concernant la présence ou la quantification de *C. botulinum* de types C, D et mosaïques C/D, D/C dans les DAOA est très peu abondante. La contribution de Greenberg *et al.* (1966) apparaît être encore une référence en la matière car les quelques études plus récentes positionnent leurs résultats de détection en comparaison à cette dernière. L'analyse des études récentes a été réalisée par le GT socle (Anses 2021a). La conclusion est que dans l'ensemble des données publiées jusqu'en 1993, la mention du type C a concerné les volailles et le porc, cette détection apparaissant sporadique

⁸ Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) pour la détection de micro-organismes pathogènes dans les aliments - Détection des clostridies productrices de neurotoxine botulique de type A, B, E et F.

comparativement à celle des types A et B qui, dans un *corpus* de références où les études restent rares, suggère des prévalences faibles.

Sur la base de données de détections sporadiques malgré un échantillonnage parfois conséquent, une démarche de type NPP (nombre le plus probable) permet d'approcher le nombre de spores présentes dans un aliment donnant un résultat positif. Pour les différentes études, dans tous les cas, l'ordre de grandeur est au maximum de la dizaine d'unités par kg de viande.

■ Œufs et ovoproduits

Les études de prévalence sur les œufs et ovoproduits distribués semblent inexistantes. Ainsi, en l'absence d'enquêtes dédiées, les travaux réalisés dans le cadre d'enquêtes épidémiologiques sur la production dans un élevage de poules pondeuses à l'occasion du suivi d'un foyer clinique sont les seules qui puissent être considérés. Dans un tel contexte (Souillard *et al.* 2017), les analyses de pools de 30 œufs détectent régulièrement le type C/D par PCR en temps réel après enrichissement des chiffonnages de surfaces réalisés (cinq pools sur les 10 réalisés à l'occasion des cinq visites successives pendant les six mois de l'enquête (entre décembre et mai 2015)). Mais quand des pools de trois œufs sont réalisés (quatre pools par visite pour quatre visites), seules deux surfaces sont détectées positives. Il s'agit d'œufs macroscopiquement souillés de fientes, prélevés lors de la visite la plus proche de la confirmation du foyer clinique. Les contenus des œufs ne donnent pas de résultats positifs en qPCR. Cette étude ne visait pas à établir une prévalence sur et dans les œufs (seuls 32 pools de trois œufs ont été testés). Ces données indiquent que même dans un contexte de suivi d'un foyer clinique, les fréquences de détection à l'œuf sont faibles pour les surfaces (de l'ordre de 2 %). Aucun contenu testé n'apparaît contaminé. Dans ce contexte, avec ces fréquences de détection, les contaminations sur les surfaces sont estimées à moins de 20 spores par œuf (NPP). Ces conclusions indirectes devraient être confortées par des études de prévalence qui, compte tenu de la présence possible de spores à la surface de l'œuf, incluraient une évaluation de leur devenir dans les ovoproduits.

2.3.1.2 Croissance et production de la toxine botulique de types C, D, mosaïques (C/D D/C) ou E par *Clostridium botulinum* dans les denrées alimentaires d'origine animale

Le potentiel de croissance de la bactérie dans les aliments est déterminé soit par une évaluation de la croissance proprement dite, soit par la détection de la toxine botulique. Dans cette section, la « croissance » regroupera indistinctement multiplication et toxinogénèse.

■ Croissance des souches de *Clostridium botulinum* du Groupe III (types C, D, mosaïques C/D et D/C) dans les aliments

La croissance de *C. botulinum* du groupe III dans les denrées alimentaires a suscité peu de travaux. Des limites (de température, de concentration en NaCl, de pH) pour la croissance pour les souches du type C ont été établies par quelques-uns d'entre eux. L'absence de croissance à 10 °C, la croissance de quelques souches à partir de 12,8 °C et la croissance de six souches sur six à 15,6 °C ont été relevées (Segner, Schmidt et Boltz 1971). Aucune croissance n'est rapportée pour des concentrations en NaCl au-delà de 3 % ou pour des valeurs de pH inférieures ou égales à 4,9. Dans du haddock (préparation salée et fumée d'aiglefin [espèce *Melanogrammus aeglefinus*], seul exemple de DAOA disponible), la croissance de la bactérie s'est avérée aussi rapide que celle obtenue dans un milieu de culture au laboratoire. En l'absence de donnée spécifique supplémentaire de croissance ou de production de toxine dans les denrées alimentaires, la nature des substrats à l'origine des foyers de botulisme de type C suggère une bonne adaptation à de nombreuses denrées d'origine animale.

La température, le pH ou l' a_w contrôlant la croissance des souches du groupe I (protéolytiques de type A et B) permettront très vraisemblablement également le contrôle des souches du groupe III (T. A. Roberts et Gibson 1979) ; ces dernières présentent de moindres capacités à se développer à basse

température, bas pH ou faible a_w . Des conservateurs ajoutés (nitrite sous forme de sel) peuvent inhiber la croissance de *C. botulinum* et sont utilisés dans la production de certaines DAOA.

■ Croissance des souches de *Clostridium botulinum* du Groupe II, y compris les souches produisant la neurotoxine de type E

Les souches du groupe II sont dites psychrotrophes en raison de leurs capacités à se multiplier dès 3°C. L'intérêt de la réfrigération des produits alimentaires contenant ces *Clostridium* s'en trouve plus limitée que si les *Clostridium* présents sont de groupes III ou I. Ces souches ont ainsi suscité une attention particulière. Les résultats de plusieurs centaines de tests d'épreuves microbiologiques (Peck *et al.* 2008) ont été publiés et montrent que :

- La croissance et/ou la production de toxines est possible dans les DAOA dont les températures de conservation, le pH et l' a_w sont compatibles avec les exigences des souches du type II.
- La toxine botulique a pu être détectée après seulement quelques jours de conservation dans des aliments stockés à 8°C, et également à des températures de conservation inférieures (après une durée de stockage plus longue).
- Récemment, Peck, Webb et Goodburn (2020) ont réalisé un test de croissance en inoculant des spores de *C. botulinum* (types B et E) à des viandes de bœuf, agneau et porc, représentatives du marché britannique (maturation courte ou longue) et conservées selon un scénario de chaîne du froid partiellement maîtrisée (3°C/1j, 5°C/1j, 22°C/2h puis 8°C le reste du temps). La toxine botulique n'a été détectée que dans des viandes manifestement altérées. Les auteurs concluent que, dans tous les cas, la présence de toxine botulique dans une viande d'aspect consommable (*organoleptic shelf-life*) est très improbable, mais la viande de volaille ne faisait pas partie des denrées testées.

Par ailleurs, même si *C. botulinum* est une bactérie anaérobie stricte, la conservation des aliments dans une atmosphère contenant de l'oxygène ne permet pas, à elle seule, d'inhiber la croissance de la bactérie et la production de la neurotoxine. En effet, de nombreux aliments ont naturellement un potentiel redox bas (Morris 2000). Par exemple, après l'abattage, le potentiel redox Eh est de l'ordre de 0 mV en surface et descend jusqu'à -250mV à l'intérieur des tissus quelques heures après la mort. L'oxygène dissous peut être consommé par l'oxydation de composés présents dans les matrices alimentaires ou par la croissance du microbiote naturellement présent (Lund 1993; Peck *et al.* 2008).

Des modèles de prévision de la croissance sont disponibles dans des logiciels accessibles via internet (ComBase, par exemple, www.combase.cc) ou dans la littérature scientifique (Peck *et al.* 2008). L'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF) au Royaume-Uni présente des lignes directrices pour le contrôle de *C. botulinum* non-protéolytique dans les aliments. Elles sont basées sur le maintien des denrées alimentaires à une température inférieure à 3°C, à un pH inférieur à 5,0, à une teneur en sel supérieure à 3,5 % et/ou à une a_w inférieure à 0,97. Ces lignes directrices considèrent également les effets combinés de traitements thermiques et de facteurs de maîtrise, établissant solidement grâce à des tests d'épreuve microbiologique ou des modèles prévisionnels, l'absence de croissance et de production de neurotoxine botulique (ACMSF 2020).

2.3.2 Impact des procédés de transformation/production en filière avicole

Dans la production d'aliments, la maîtrise des dangers biologiques repose sur des mesures d'hygiène ou mesures de maîtrise⁹:

- de rang I : elles sont d'ordre préventif visant à empêcher ou limiter le transfert des agents de leur source vers leur cible, comme le sont les bonnes pratiques d'abattage ;

⁹ Actions et activités auxquelles il est possible de recourir pour prévenir ou éliminer un danger qui menace la sécurité des aliments ou pour le ramener à un niveau acceptable.

- de rang II : elles sont à la fois préventives et curatives visant à empêcher l'amplification du danger (inhiber la croissance, stopper la toxinogénèse...), comme l'est l'application de la chaîne du froid ou l'introduction de mélanges salants ;
- de rang III : elles sont curatives et vont inactiver ou éliminer le danger totalement ou suffisamment. Il s'agit, le plus souvent, de traitements physiques comme le sont, par exemple, l'application de traitements thermiques, l'ionisation et les hautes pressions hydrostatiques.

Il est à noter que ces mesures peuvent être constitutives d'un niveau de transformation ou totalement déconnectée de celui-ci. Par exemple, par définition, il n'existe pas de mesures de rang III à l'abattoir.

Ces mesures pourront être utilisées seules ou en combinaison dans des approches de type « technologies de barrières ». L'ensemble de ces mesures est très important dans le dispositif général de maîtrise, leurs interrelations étant fortes. Les mesures curatives ont un rôle clé dans cette maîtrise, notamment dans leur lien avec les points critiques de maîtrise (CCP ou *Critical Control Point*) et leur caractère « essentiel ».¹⁰

Les mesures d'hygiène de rang III ont une action sur le danger conduisant à :

- une **inactivation** des dangers qui peut être définie comme la perte irréversible pour le micro-organisme de la capacité à se reproduire (perte de viabilité) ou de germer (spore). Le même terme d'inactivation sera utilisé pour décrire l'effet des traitements (des mesures) sur la toxine et englobera également ce qui est appelé la destruction microbienne ;
- une **élimination** des dangers grâce par exemple à la détergence¹¹ lors d'immersions. Le produit (ou la surface) est alors littéralement physiquement « débarrassé(e) » de tout ou partie de ses dangers.

2.3.2.1 Procédés physiques d'inactivation

2.3.2.1.1 Traitement thermique

■ Paramètres d'inactivation thermique

Deux paramètres constants pour une souche permettent de prévoir l'inactivation obtenue pour un temps donné à une température donnée. Ces deux paramètres sont D_T et z (Anses 2019). D_T est le temps de réduction décimale, exprimé généralement en minutes. Il correspond à la durée du traitement thermique nécessaire à la température T , pour diviser par dix la charge microbienne. Lorsque la température de traitement augmente, la destruction des microorganismes est plus rapide et la valeur de D_T est donc plus faible. Le paramètre z est utilisé pour exprimer l'écart de température en degrés Celsius (°C) pour lequel les D_T sont dans un rapport de 1 à 10 (ou 0,1). Pour la plupart des moisissures et des spores de moisissures, les bactéries et les spores de bactéries, z varie de 4 à 14 °C pour des traitements en conditions humides, avec de nombreux cas où z est voisin de 10 °C. Les formes sporulées ont, en général, un z compris entre 7 et 14 °C et les formes végétatives un z compris entre 4 et 7 °C. Le milieu dans lequel les microorganismes sont étudiés peut modifier la valeur z , de même que le type de chaleur (chaleur sèche vs chaleur humide).

Dans la pratique, cela signifie que lorsque la température est augmentée de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est divisé par 10. Lorsque la température est réduite de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est multiplié par 10.

Dans la littérature, la convention d'écriture est la suivante : à droite du D majuscule, en indice, est indiquée la température (exprimée en degrés Celsius) pour laquelle la valeur de D (exprimée en minutes) a été obtenue. Pour les spores de *C. botulinum* non-protéolytiques, $D_{121,1^\circ\text{C}} = 0,21$ min.

■ Mode d'action des traitements thermiques

¹⁰ NF V01-006 - Hygiène des aliments

¹¹ C'est le nettoyage de la surface d'un objet par un bain contenant le détergent

Sur les cellules végétatives, la chaleur humide a un mode d'action dit multi-cibles. Ainsi, elle va dénaturer, de manière croissante avec la température, les membranes et les biomolécules. Les membranes sont souvent la première cible quel que soit le type de transfert (par convection ou conduction). Ce mode d'action a été décrit il y a de nombreuses années et semble la base de la thermobactériologie quel que soit le procédé thermique utilisé, c'est-à-dire quel que soit l'équipement, classique ou innovant, qui opère le transfert de chaleur.

■ Résistance des spores de *C. botulinum* (groupes I, II et III) à la chaleur en milieu humide

La résistance à la chaleur en milieu humide des spores de *C. botulinum* est très bien documentée, et ce depuis le début du XX^e siècle pour les spores des souches du groupe I (*C. botulinum* protéolytique, types A, B et F). Des méta-analyses récentes donnent une vision synthétique des paramètres D et z. Ainsi, $D_{121^{\circ}\text{C}}$ est estimé, à partir de 394 données, à 0,19 min pour les spores des *C. botulinum* protéolytiques, avec une valeur de z de 11,3 °C (Diao, Andre et Membre 2014). Pour les spores de *C. botulinum* non protéolytiques de type B, E et F (n = 549), les estimations de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ sont comprises entre 1 min et 1,5 min avec des valeurs de z comprises entre 6,5 °C et 6,9 °C (Wachnicka *et al.* 2016). Une particularité des *C. botulinum* non-protéolytiques (Groupe II) est l'existence, dans une population, de fractions de populations résistantes à la chaleur. Ces dernières sont révélées par l'ajout de lysozyme qui favorise la germination et la reprise de croissance des spores préalablement soumises à un traitement thermique. Les valeurs de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ de ces fractions de populations résistantes sont nettement plus élevées (estimées autour de 100 min) et leur valeur de z est estimée à 9 °C (Wachnicka *et al.* 2016). Le lysozyme est naturellement présent dans de nombreux aliments, dans le blanc d'œuf à des concentrations très élevées, mais également dans d'autres DAOA. Le lysozyme est également résistant à la chaleur et pourrait persister, après une pasteurisation par exemple (Lund et Notermans 1993).

Les seules valeurs disponibles pour les spores des souches du Groupe III ont été publiées par Segner et Schmidt (1971) : les estimations de $D_{104^{\circ}\text{C}}$ pour les souches de type C testées sont comprises entre 0,02 et 0,9 min avec des valeurs de z comprises entre 5,0 et 6,2 °C. Ces paramètres de résistance suggèrent une résistance bien supérieure à celle des spores des *C. botulinum* non protéolytiques (groupe II), mais également très inférieure à celle des spores des *C. botulinum* protéolytiques (groupe I) (figure 14).

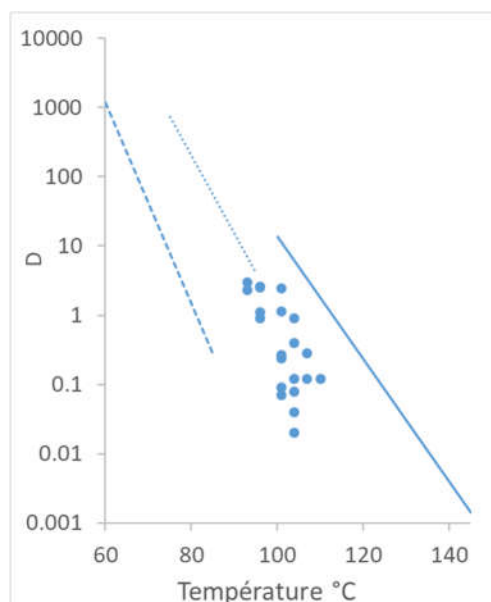


Figure 14 : Représentation schématique des relations entre la température appliquée et les valeurs du temps de réduction décimale D (minutes)

pour les spores de *C. botulinum* de groupe I (protéolytiques) (trait plein) (Diao, Andre et Membre 2014), de groupe II (non protéolytiques) (tirets) (Wachnicka *et al.* 2016), des fractions de populations de spores du groupe II résistantes à la chaleur en présence de lysozyme (pointillés) (Wachnicka *et al.* 2016), et du groupe III, avec représentation des données individuelles (points) issues de Segner et Schmidt (1971)

■ Inactivation par la chaleur de *Clostridium botulinum* dans les DAOA

En dehors des travaux de Segner et Schmidt (1971), il n'existe pas de données d'inactivation des spores des souches du groupe III dans les aliments (types C, D ou mosaïques). Les spores des souches du groupe I sont les plus résistantes à la chaleur humide. En d'autres termes, leur maîtrise par un procédé thermique (de type appertisation avec F0 supérieure à 3 min¹²) permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier celles du groupe III.

Les lignes directrices les plus abouties qui considèrent l'inactivation des spores de *C. botulinum* du type II sont relatives aux produits alimentaires sous-vide ou emballés sous atmosphère modifiée et conservés à basse température, y compris les viandes fraîches (« *Vacuum-packed and Modified atmosphere packed chilled foods, including fresh meat, held at temperatures from 3 to 8°C* ») et proposées par l'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food* (ACMSF 2020). Un traitement thermique de 90°C pendant 10 min, ou des traitements équivalents présentés dans le document, permet une inactivation d'au moins six réductions décimales, propre à assurer une durée de vie prolongée de ces aliments à basse température.

Toxines botuliques

Il est important de noter que les toxines botuliques sont plus facilement inactivées par la chaleur que les spores. Cependant, les données sur leur inactivation apparaissent très diverses dans la littérature scientifique selon les conditions expérimentales, le pH et la composition du milieu utilisé, entre autres. De plus, l'inactivation n'intervient pas de manière linéaire, ce qui ne permet pas les inter-comparaisons (Popoff 2017). Pour Siegel (1993) la valeur $D_{76,7^{\circ}\text{C}}$ pour les toxines botuliques de types A et B (chaleur humide) varie de 1 à 8 min selon le pH et la composition de l'aliment. La pasteurisation (72 °C, 15 s) permet d'inactiver 99,9 % des toxines de types A et B dans le lait (Siegel 1993; Weingart *et al.* 2010). Dans leur revue de 1979, Roberts et Gibson soulignent que la résistance thermique des toxines botuliques de types C et D est supérieure à celle des toxines de types A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70 °C suffit pour les inactiver, il faut atteindre 90 °C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines de types C et D.

Les températures et durées de traitement mises en œuvre dans les essais évaluant l'inactivation par la chaleur des toxines botuliques sont bien supérieures à celles déclenchant la sensation de brûlure chez l'être humain (50-60 °C). Ainsi, le simple réchauffage d'un aliment est insuffisant pour inactiver les toxines botuliques.

2.3.2.1.2 Autres procédés physiques d'inactivation

Comme indiqué plus haut, d'autres facteurs physiques peuvent être utilisés comme facteurs opérationnels, tels l'énergie de rayonnements (ionisants ou lumineux), la pression et un champ électrique ou magnétique. Le GT n'a abordé que les plus pertinents pour la filière.

■ L'ionisation

L'ionisation des aliments consiste en l'exposition des aliments à l'action de rayonnements ionisants, c'est-à-dire à une énergie suffisante pour arracher un électron d'une structure atomique ou moléculaire, en vue d'améliorer leurs qualités hygiéniques. À l'image des traitements thermiques, il s'agit d'un traitement « dans la masse » du produit. Les rayonnements ionisants les plus utilisés en radioconservation sont de nature électromagnétique (rayonnement gamma principalement, issu de la désintégration d'une source radioactive) ou corpusculaire (rayonnement bêta principalement, correspondant à un faisceau d'électrons accélérés). Les rayonnements vont créer dans la matière

¹² Le terme « F0 » est défini comme le nombre de minutes équivalentes de stérilisation à la vapeur à 250 °F (121,1 °C) délivré à une charge.

exposée, selon la dose, des produits de radiolyse (radicaux libres) qui vont exercer l'essentiel des effets létaux sur les micro-organismes. L'unité pour exprimer le traitement en Système International (S.I) est le Gray (Gy). Sa description mathématique est connue, depuis longtemps, et un paramètre équivalent au temps de réduction décimale (valeur D) a été décrit, à savoir la Dose de Réduction Décimale (DRD ou D₁₀). Il s'agit de la dose (exprimée en kGy) qui permet d'inactiver 90% de la population exposée. La valeur DRD pour un micro-organisme permet de le repositionner facilement par rapport à certaines « références » (ICMSF 1996; Kim et Foegeding 1993). Parmi ces dernières on trouve *Salmonella* (DRD 0,33 à 0,5 kGy dans l'œuf entier liquide). Les valeurs de DRD des spores des types C ou D, dans de l'eau ou une matrice carnée, sont généralement comprises entre 1 et 3 kGy et sont très similaires aux valeurs de DRD des spores du groupe I. Les valeurs de DRD des spores produisant des neurotoxines de type E dans divers tampons de laboratoire ou dans des aliments, y compris des produits carnés ou des produits de la mer, sont inférieures (entre 1 et 2 kGy), mais la différence est considérée comme marginale (T. A. Roberts et Gibson 1979; Kim et Foegeding 1993; ICMSF 1996). La résistance aux rayonnements ionisants augmente avec l'abaissement de la température. Ainsi, les valeurs de DRD ont tendance à augmenter de 0,1 kGy pour un abaissement de température de 10°C pour des traitements effectués entre +50°C et -200°C (Kim et Foegeding 1993). En ce qui concerne les formes végétatives de *C. botulinum*, peu d'informations sont disponibles mais il est raisonnable de penser que la valeur DRD est du même ordre que pour des bactéries ne formant pas de spores. Les mycotoxines et toxines bactériennes sont considérées comme radiorésistantes, leur inactivation par les seuls rayonnements ionisants nécessite la mise en œuvre de très fortes doses, incompatibles avec le maintien des qualités organoleptiques du produit. En particulier les valeurs de DRD des neurotoxines botuliques, évaluées entre 16 à 70 kGy (Siegel 1993; Gominet 2001), sont ainsi très supérieures aux valeurs de DRD des spores. Les aliments protègent très nettement les neurotoxines botuliques de la dégradation par les rayonnements ionisants (Siegel 1993). L'utilisation des traitements usuels d'aliments par des rayonnements ionisants comme facteur de maîtrise des cellules végétatives et des spores de *C. botulinum* (tous types) est concevable. Cela n'est pas le cas pour la toxine.

L'ionisation est utilisée pour l'alimentation animale ou l'alimentation humaine. Dans ce dernier cas, il s'agit d'un procédé soumis à autorisation après évaluation d'un dossier présentant l'avantage technologique et l'innocuité du traitement. Chaque État dispose d'une liste de produits autorisés au traitement avec la dose autorisée. Par exemple, les États-Unis autorisent le traitement de la viande pour déparasiter (0,1 kGy) ou lutter contre *E. coli* O157 :H7 (1,5 kGy) (Radomyski *et al.* 1994), le Mexique et la France permettent le traitement de cuisses de grenouilles avec 8 et 7 kGy, respectivement. Toujours en France, d'anciennes autorisations existent pour :

- les viandes de volailles séparées mécaniquement (VVSM) et les viandes de volailles hachées, broyées, morcelées avec 5 kGy maximum ;
- le blanc d'œuf, liquide déshydraté, congelé (avec des doses inférieures à 4 kGy).

Il s'agit bien d'autorisations, et donc d'applications potentielles, et non du reflet de l'activité en France, aujourd'hui.

■ Les Hautes Pressions Hydrostatiques (HPH)

Le principe de cette technologie est de soumettre des denrées alimentaires à de fortes pressions à l'intérieur d'une enceinte close, dans le but d'assainir et/ou de transformer ces produits. Il s'agit d'un traitement discontinu dans la masse du produit. L'unité S.I pour exprimer le traitement est le Pascal (Pa). Le domaine de pressions utilisées dans les industries agro-alimentaires s'étend généralement de 100 à 1000 MPa (1 000 à 10 000 fois la pression atmosphérique). Les traitements sont appliqués pour une large gamme de température (-20 à 100°C), ainsi que de durée. Généralement, ils durent de 5 à 30 min à température ambiante ou au froid positif.

L'inactivation des cellules végétatives par les HPH a fait l'objet de plusieurs revues bibliographiques et ouvrages divers (Lerasle *et al.* 2012; Guillou *et al.* 2017). L'inactivation augmente évidemment avec la pression, mais également avec l'augmentation de température. À ce titre, les traitements HP/HT (Hautes pressions/Hautes températures) semblent être une voie d'avenir pour le développement de ce procédé. Des synergies avec les pH acides (ou basiques) ont également été décrites (Lerasle *et al.* 2012).

L'inactivation de spores par les seules hautes pressions est difficile, mais peut être favorisée en combinaison avec un traitement thermique (Rivalain, Roquain et Demazeau 2010). Plusieurs réductions décimales de spores de type E sont obtenues en quelques minutes par diverses combinaisons de traitements HPH supérieurs à 600 MPa et de traitement thermique à température comprise entre 30°C et 100°C (Federighi *et al.* 1995; Tonello 2001; Black *et al.* 2007). Le barocomportement des *C. botulinum* est très variable selon les souches envisagées. Pour exemple, Margosch *et al.* (2004) ont montré que la souche *C. botulinum* TMW 2.357 (protéolytique type B) était plus résistante que les autres souches de *C. botulinum* et que les souches de *Bacillus* spp. Il avait également été montré précédemment que *Clostridium* était plus résistante à la pression que *Bacillus* (Patterson 2014). De plus, les souches protéolytiques semblent plus résistantes que les souches non protéolytiques (Margosch *et al.* 2004; Reddy *et al.* 2003).

Il est à noter que des pressions modérées (50-300 MPa) entraîne la germination des spores, les cellules végétatives issues de cette germination ne présentent pas de barorésistance particulière (Clouston et Wills 1969; Gould et Sale 1970; Ludwig *et al.* 1992; Kalchayanand *et al.* 2004; Kohler *et al.* 2018; Sarker *et al.* 2015). Les HPH sont connues pour exercer une action sur les protéines dès la structure secondaire (Rivalain, Roquain et Demazeau 2010). Cette capacité permet d'inactiver certaines enzymes d'altération dans les jus de fruits traités par exemple. Même si la nature protéique de la toxine botulique et les phénomènes de dégradation des protéines par les HPH laissent supposer qu'un tel traitement inactiverait les toxines botuliques, cela n'a pas été mis en évidence à ce jour.

Plusieurs applications existent concernant les DAOA dans différents pays ayant développé la technologie. En France, le traitement de magrets de canards ou le décorticage des crustacés peuvent être cités (Lerasle *et al.* 2012).

■ Les champs lumineux pulsés – Les ultra-violets

Le traitement par lumière pulsée est un procédé athermique innovant de préservation des aliments qui utilise la technologie de la puissance pulsée pour inactiver les micro-organismes en les soumettant aux flashes intenses de lumière blanche de large spectre pendant des temps très courts (10^{-6} à 10^{-1} seconde). Ce système de traitement comporte un condensateur qui stocke l'énergie pendant une période relativement longue (de l'ordre de 0,2 seconde) et qui se décharge sur une ou plusieurs lampes à xénon. La lampe émet des impulsions lumineuses qui sont focalisées sur la surface de traitement pendant un temps très court de quelques centaines de micro-secondes. Selon les équipements, des réflecteurs permettent à la lumière d'atteindre toutes les surfaces du produit. Il s'agit d'un traitement de surface des produits, à l'inverse des deux traitements précédents. Chaque flash délivre une énergie de quelques joules par cm^2 . Les spores sont de 10 à 50 fois plus résistantes aux rayonnements UV ou à la lumière pulsée que les cellules végétatives (Setlow 2006; Levy *et al.* 2012). Des valeurs de réduction décimale de 60 J/m^2 sont annoncées pour les cellules végétatives de *B. anthracis* alors que leurs spores demandent 810 J/m^2 (Reineke et Mathys 2020). Il est à noter que ce procédé peut être utilisé pour le traitement des œufs en coquilles (Levy *et al.* 2009).

Le procédé de traitement par illumination UV continu est connu depuis plus longtemps mais son utilisation est limitée dans les aliments du fait des réactions d'oxydation (notamment des lipides) qui entraînent des changements organoleptiques des produits qui en contiennent, alors que le système lumière pulsée limite efficacement ces réactions d'oxydation. Les applications potentielles concernent également l'eau (par illumination continue ou flash) et les surfaces au contact des denrées. Dans certains cas des applications à l'eau d'abreuvement des animaux et aux matériels utilisés à l'abattoir peuvent être envisagées.

Il est à noter qu'il existe une très forte activité de recherche-développement concernant l'inactivation microbienne par de nouveaux procédés utilisant la lumière (lumière bleue à 405 nm, Led UV, etc.) (Kebbi *et al.* 2020). Les premiers résultats semblent très prometteurs, y compris sur les spores. La veille scientifique sur le sujet doit être encouragée.

2.3.2.2 Procédés d'élimination

Il s'agit d'aborder le cas des traitements de carcasses de poulets par immersion et circulation à contre-courant dans un bain d'eau contenant la molécule active. Les molécules vont avoir généralement un effet inactivant sur des cellules végétatives. Certaines d'entre elles exercent également un effet de « décrochage » des micro-organismes de la surface de la carcasse. Dans ce cas, il n'existe pas de « résistance » aux traitements. Il faut noter que, bien que réel, le résultat de ce « décrochage » reste très modeste.

Les spores de *C. botulinum* peuvent être inactivées par les composés chlorés (chlore libre 4,5 ppm (m/v) (pH 6,5), temps de réduction décimale 5-10 min en solution aqueuse), de même que les toxines botuliques généralement plus sensibles aux désinfectants que les spores (Siegel 1993; Popoff 2017; Anses 2020).

2.3.2.3 Conclusion sur les procédés d'inactivation/élimination dans les denrées alimentaires d'origine animale

L'implication importante des groupe I et II dans les cas de botulisme humain a conduit les auteurs de publications scientifiques à privilégier les études sur ces groupes, délaissant le groupe III qui souffre d'un déficit d'informations en la matière. Les spores du groupe I sont souvent considérées comme une référence de « résistance » et cela a conduit, par exemple, au concept du 12D pour les barèmes d'appertisation. Leur maîtrise par un procédé thermique permet la maîtrise des spores des souches des autres groupes, en particulier des souches du groupe III.

L'état actuel des connaissances ne permet pas de remettre en cause la conclusion de Roberts et Gibson (1979) selon laquelle les mesures de maîtrise appliquées dans l'industrie agroalimentaire pour maîtriser les *C. botulinum* de types A et B seront efficaces pour les types C et D. Ceci semble pouvoir être affirmé pour les traitements thermiques des cellules végétatives et les spores. Les toxines botuliques des types C et D semblent plus thermorésistantes que celles des types A, B, E. Cependant, des traitements thermiques supérieurs à 90 °C/2 min permettent l'inactivation totale de ces toxines. L'acquisition de données nouvelles sur la sensibilité des toxines à différentes conditions de traitements physiques est recommandée.

En pratique, et en particulier pour les DAOA, la maîtrise de *C. botulinum* est obtenue par l'action combinée de plusieurs mesures d'hygiène et de facteurs : traitement thermique, diminution de l' a_w (ajout de sel ou séchage), ajout de nitrites ou d'autres conservateurs, fumage, réfrigération et/ou limitation de la durée de vie (Lund et Peck 2013).

Le biocontrôle ou la biopréservation constituent des voies de maîtrise de *C. botulinum* qui méritent d'être explorées à moyen terme, ce microorganisme n'étant pas connu pour être un grand « compétiteur ». Divers travaux expérimentaux ont montré un retard dans la production des toxines botuliques, voire une inhibition totale dans diverses DAOA en conditions de compétition microbienne (Lindstrom, Kiviniemi et Korkeala 2006).

Tableau 3 : Impact des procédés d'inactivation microbienne applicables aux DAOA sur *C. botulinum*

Procédé	Groupe / type	Forme	Matrice	Conditions	Impact	Référence
Traitement thermique ¹	I/A,B,F	Spore	Tampon	$D_{121,1\text{ °C}} = 0,21 \text{ min}$ $z = 10 \text{ °C}$ 3 min, 12D		Kim et Foegeeding (1993)
	I/A,B,F	Spore	Divers (méta-analyse)	$D_{121,1\text{ °C}} = 0,19 \text{ min}$ $z = 11,3 \text{ °C}$		Diao, Andre et Membre (2014)
	I/A,B	Toxine		$D_{76,7\text{ °C}} = 1 \text{ à } 8 \text{ min}$		Siegel (1993)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires	$D_{80\text{ °C}} = 1 - 1,5 \text{ min}$ $z = 6,7 \text{ °C}$		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	II/B,E,F	Spore	Divers milieux et matrices alimentaires + lysozyme	$D_{80\text{ °C}} = 100 - 257 \text{ min}$ $Z = 9 \text{ °C}$		Wachnicka <i>et al.</i> (2016)
	III/C	Spore	Tampon phosphate	$D_{101\text{ °C}} = 0,71 \text{ min}^*$ $Z = 10 \text{ °C}^*$; $z = 5,7^{**}$ $D_{120\text{ °C}} = 0,01 \text{ min}^{***}$ $D_{80\text{ °C}} = 89 \text{ min}^{***}$		Segner et Schmidt (1971)
	II/E	Toxine	Non précisée	70 °C / 2 min	Inactivation totale	Prévo et Brygoo (1953) cité par T. A. Roberts et Gibson (1979)
	III/C	Toxine	Non précisée	70 °C / 2 min 80 °C / 2 min 90 °C / 2 min	90 % d'inactivation 99 % d'inactivation Inactivation totale	
	III/ D	Toxine	Non précisée	90 °C / 2 min	Inactivation totale	
Ionisation	A,B	Spore	Tampon phosphate	DRD = 3,3 kGy		Desmonts <i>et al.</i> (2001)
		Toxines		DRD = 40-60 kGy		
	E	Spore	Bœuf	DRD = 1,4 KGy		
		Toxines		DRD = 17-21 kGy		
Hautes pressions hydrostatiques	C	Spore	Eau	DRD = 2,1 KGy		
	B	Spore	Tampon phosphate	827 MPa, 30 min, 75 °C	6 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2006)
	II/B	spore	Tampon phosphate	827 MPa, 5 min, 50 °C	5,5 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2006)
	C. sporogenes	spore	Poulet	680 MPa, 20 min, 80 °C	2 réductions décimales	Rivalain, Roquain et Demazeau (2010)
	Type I	Spore	Tampon ACES	600-750 Mpa, 2-6 min, 105 °C	> 3 réductions décimales	Reddy <i>et al.</i> (2013)
	E	Spore	Tampon IPB	750 Mpa, 10 min 30 °C 600 Mpa, 10 min 80 °C	> 3 réductions décimales	Lenz <i>et al.</i> (2015)

¹ Il est convenu en microbiologie des aliments (recherche et dénombrement de spores) qu'un chauffage de 10 min à 80 °C élimine toutes les cellules végétatives ; *Moyenne des valeurs de $D_{101\text{ °C}}$, n=6 (Segner et Schmidt, 1971). Valeur de z estimée sur l'ensemble des données de la publication. ** Valeur de z la plus élevée communiquée par Segner et Schmidt 1971 ; ***valeurs calculées à partir de D_{ref} , T_{ref} et z (10 °C) en utilisant le modèle dit « de Bigelow ».

3 Maîtrise des *C. botulinum* type C, D et mosaïques en filière avicole

3.1 Introduction

La filière avicole¹³ se caractérise par une grande diversité d'espèces, de modes et d'échelles de production. Le terme de « volailles » désigne tous les oiseaux domestiques élevés en vue de la production d'œufs de consommation et/ou de viandes. Les principales espèces élevées en France sont : la poule (genre *Gallus*) regroupant à la fois la poule pondeuse d'œufs de consommation et le poulet de chair, le canard (genre *Anas*), l'oie (genre *Anser*), la dinde (genre *Meleagris*), la pintade (genre *Numida*), la caille (genre *Coturnix*) et le pigeon (genre *Columba*). Il est à noter que l'autruche ou l'émeu sont considérés comme « gibier d'élevage à plumes » (viandes de ratites). La figure 15 propose un schéma synoptique de la filière avicole, fruit de la réflexion du GT.

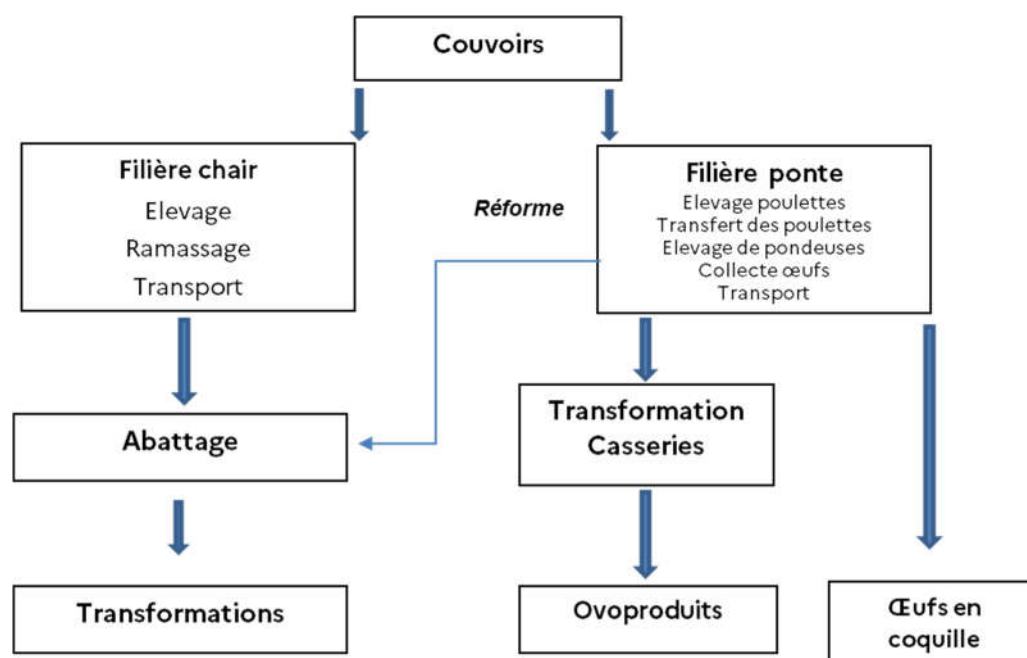


Figure 15: Représentation schématique simplifiée de la filière avicole

La production de carcasses de volailles se maintient de manière relativement stable en France depuis le début des années 2000, avec cependant des disparités selon les espèces. L'apparente stabilité est le résultat de progressions continues (+1,5% par an en moyenne (en Tonnes Equivalent Carcasse, TEC) concernant le poulet de chair et, dans une moindre mesure, la dinde, compensant des replis significatifs (-16% en 2020 par exemple) pour le canard à rôti et la pintade (Agreste 2020). Le GT a décidé de porter son attention sur les trois espèces dominant le marché de la viande de volaille à savoir le poulet de chair, la dinde de chair et le canard à rôti et la seule espèce *Gallus gallus* pour la production d'œufs.

Comme vu préalablement, le danger est à portage intestinal chez les animaux de la filière. Le transfert du danger à partir de ce réservoir aux produits et sous-produits se déroulera soit en *ante-mortem*, soit au décours des différents procédés de transformation (*post-mortem*). Il est donc très important de connaître, du vivant de l'animal, les parties du corps, tissus et œufs présentant un risque d'émission du

¹³ Les lagomorphes (lapin et lièvre) sont inclus dans la filière avicole.

danger devenant, par définition, source de contamination. De même, la connaissance de chacune des étapes de l'élevage aux produits finis (ou semi-finis) au regard des possibilités de contamination (incluant l'exposition professionnelle) est de nature à mieux évaluer l'impact des différentes mesures de maîtrise sur le danger.

3.2 Élevage

L'élevage avicole (chair ou ponte) se structure schématiquement en trois niveaux : Sélection, Multiplication et Production. Les couvoirs approvisionnent les élevages et l'exportation (œufs à couver, poussins). En 2020, on recense en France environ 2700 élevages de pondeuses et 13 500 élevages de volailles de chair (ITAVI 2020b, 2020a). La production française est d'environ 1,84 million TEC (chiffre 2020), dont 65 % en poulet, 19 % en dinde, 11 % en canard et 2 % en pintade. La production d'œufs s'élève à 14,5 milliards en 2020 (ITAVI 2020b, 2020a).

La moitié des exploitations de volailles de chair sont spécialisées, avec une capacité moyenne de 16 000 têtes par exploitation (données 2010). Les régions du grand ouest regroupent la majorité de ces élevages (la moitié en Bretagne et Pays de Loire et 13 % dans le Sud-Ouest).

Schématiquement trois systèmes de production peuvent être distingués au sein de la filière française de poulets de chair (poulet à croissance rapide, à croissance lente, ou poulet certifié à croissance intermédiaire). Les différents modes de production se démarquent par le potentiel de croissance des animaux, l'âge à l'abattage, la génétique, l'alimentation et le mode d'élevage, en claustration (cage, sol ou volière), ou avec accès à un parcours. La conduite d'élevage est divisée en trois phases : démarrage, croissance et finition avec des conditions d'ambiance et d'alimentation correspondant aux besoins de l'animal à chaque stade physiologique.

Pour la filière œuf, si les œufs de différentes espèces de volailles sont valorisables, l'essentiel de la production française concerne les poules.

Les poulettes démarrent dans des élevages spécialisés, jusqu'à l'âge de 15-17 semaines. Elles sont ensuite acheminées vers d'autres élevages pour la ponte jusqu'à environ 80 semaines. Plusieurs modes d'élevage sont possibles, en claustration ou avec accès à un parcours.

Les poules élevées en cages collectives aménagées ne représentent plus qu'environ le tiers des effectifs en production (36% en 2020). Les modes d'élevage alternatifs se développent et prennent une part de plus en plus importante du marché. Les poules élevées en plein air représentaient 23,2 % des œufs pondus en 2020, le plein air Label Rouge 5,8 %, le bio 16 % et le sol 19 % (avec ou sans parcours extérieur) (CNPO).

3.2.1 Gestion de foyers de botulisme en élevage de volailles

Réglementairement (arrêté du 30 mai 2008 relatif aux conditions sanitaires auxquelles doivent satisfaire les lots de volailles et de lagomorphes en vue de leur abattage pour la consommation humaine pris en application du règlement (CE) n° 853/2004), l'envoi d'un lot de volailles malades à l'abattoir est interdit et des taux de mortalité indicatifs sont définis (variant sur une journée de 0,25 à 1 % selon l'espèce, le type de production ou le mode d'élevage), au-delà desquels un lot de volailles doit être considéré comme malade. En outre, sans préjudice des autres dispositions relatives aux mesures de police sanitaire, l'envoi à l'abattoir de volailles atteintes ou suspectes de l'être de botulisme sous sa forme clinique est interdit. Le respect de ces critères est attesté par l'éleveur, qui a la responsabilité de renseigner (à partir du registre d'élevage, en notant les événements pathologiques des 30 derniers jours précédents et les mortalités constatées dans les 15 derniers jours) le document de transmission de l'information sur la chaîne alimentaire (ICA). Ce document doit être adressé avant chaque enlèvement au responsable de l'abattoir destinataire, impérativement 24 heures et dans la mesure du possible 48 heures avant abattage. En cas d'anomalie sur le lot, l'éleveur est tenu de faire appel à son vétérinaire sanitaire (VS) avant l'envoi des animaux à l'abattoir. L'absence de signes cliniques (signes nerveux par

exemple) est en outre évaluée dans le cadre de l'examen *ante-mortem* à l'arrivée à quai dans l'établissement d'abattage. Toute anomalie constatée à l'examen du document de transmission de l'ICA ou l'examen *ante-mortem* fait l'objet d'une information du service d'inspection vétérinaire et une suspicion de botulisme aviaire peut entraîner un refus du lot de volailles.

En cas de suspicion de botulisme aviaire, cette maladie étant réglementée au titre de l'arrêté ministériel modifié du 29 juillet 2013, l'éleveur doit en faire la déclaration à son vétérinaire sanitaire (article L223-5 du code rural et de la pêche maritime), lequel s'il confirme cette suspicion en fait le signalement au DDPP et procède aux prélèvements nécessaires au diagnostic de confirmation.

Aucune disposition technique, administrative ou financière relative à la lutte contre le botulisme aviaire n'ayant été arrêtée, les mesures (prises au cas par cas) peuvent varier d'un département à l'autre. Elles sont, dans la majorité des cas, encadrées par arrêté préfectoral, d'abord de mise sous surveillance (APMS), puis de déclaration d'infection (APDI) lorsque le botulisme est confirmé.

Lorsque l'élevage est placé sous APMS, le lot est bloqué dans l'élevage dans l'attente du diagnostic de confirmation. Les mesures sont prises en concertation avec la mission des urgences sanitaires (MUS) de la DGAL. L'élevage est alors l'objet d'un recensement des animaux de toutes espèces présentes sur l'exploitation, de prélèvements réservés au diagnostic, et d'une enquête destinée à déterminer les facteurs de risque ayant contribué au développement de la maladie et l'origine de la contamination. Toutes les mesures nécessaires sont prescrites pour éviter la propagation de la maladie. Aucune volaille ne doit entrer ou sortir de l'exploitation (sauf dérogation accordée par la DDPP). Les oiseaux sont maintenus dans leur bâtiment (généralement) ou dans un autre lieu de l'exploitation permettant leur isolement. L'éleveur est tenu d'enregistrer de façon précise l'évolution de la maladie et la mortalité, et doit retirer les cadavres au moins deux fois par jour pour réduire l'exposition des sujets sains (cadavres destinés à l'équarrissage). Un renouvellement des litières ou à défaut un renouvellement du paillage est effectué. Un traitement antibiotique peut être engagé pour détruire les formes végétatives présentes dans le tube digestif et empêcher la production de toxines responsables de la maladie. L'abattage de volailles pour la consommation est interdit. Toutes ces mesures sont levées en cas de résultat négatif pour le test de confirmation.

Lorsque le botulisme est confirmé, l'élevage est placé sous APDI. Les mesures précédentes sont maintenues ou renforcées.

En cas de botulisme de type C/D, C, D ou D/C, le lot reste bloqué au moins jusqu'à ce que le VS constate la disparition des signes de maladie. Les volailles peuvent être alors acheminées vers un établissement d'abattage (sous laissez-passer sanitaire si l'APDI n'a pas été encore levé), après respect des délais d'attente lorsqu'un traitement antibiotique a été prescrit. Quarante-huit heures avant leur départ, les volailles sont soumises à un examen clinique par le VS qui doit attester l'absence de signes de botulisme parmi les volailles du lot destiné à l'abattoir. Toutes ces indications doivent figurer sur le document de transmission de l'information sur la chaîne alimentaire. Noter que des sous-lots d'animaux reconnus comme non cliniquement atteints au sein d'un lot comportant des animaux malades, peuvent être également acheminés vers l'établissement d'abattage (sous laissez-passer sanitaire). Les services de l'État chargés de l'inspection sanitaire à l'abattoir en concertation avec l'abatteur donnent leur accord pour la réception des animaux à une date et une heure d'abattage déterminées.

Suite au départ des animaux, un chantier renforcé de nettoyage et désinfection des bâtiments, matériels, effluents et abords est mis en place pour éliminer *C. botulinum* et prévenir les récives dans les lots suivants.

Si ces dispositions sont appliquées, il est peu probable que des volailles atteintes de botulisme clinique se retrouvent sur la chaîne d'abattage. La possibilité que des cas associés à des signes cliniques peu marqués surviennent dans le lot dans les heures précédant l'enlèvement des animaux peut être envisagée, avec dans ce cas une mortalité bien en deçà des taux considérés comme des signes d'alerte (1 % sur 24h par exemple pour les poulets et dindes de chair en claustration), et soient attribués, lors de l'examen *ante-mortem* chez l'abatteur, à des problèmes (étouffements par exemple) survenus en cours de transport. La situation la plus plausible est celle d'un risque éventuel lié aux volailles (ayant survécu ou non touchées par la maladie) issues d'un lot dans lequel la maladie a été diagnostiquée.

En l'absence de dispositions réglementaires précisant le devenir des œufs en cas d'épisode de botulisme dans un élevage de poules, des mesures peuvent être mises en place au cas par cas, notamment le tri des œufs souillés (Le Bouquin *et al.* 2017).

3.2.2 Mesures de réduction de risque en élevage

Le respect des bonnes pratiques d'élevage et l'application rigoureuse des mesures de biosécurité prenant en compte les différentes sources et véhicules de contamination précédemment indiqués (Figure 12) peut permettre de réduire le risque d'introduction et de persistance de *C. botulinum* dans les élevages avicoles. Une mesure importante repose en outre sur une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, avec l'enlèvement systématique des cadavres présents dans les bâtiments et les parcours, et leur stockage dans un bac d'équarrissage fermé.

Pour prévenir les récurrences fréquentes des foyers de botulisme aviaire dues à la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage, un chantier renforcé de nettoyage et désinfection doit être lancé pour décontaminer les bâtiments d'élevage, matériels, abords et parcours. Des mesures sont aussi nécessaires pour traiter les effluents et aliments contaminés. Les modalités sont décrites dans le rapport du GT « Botulisme – décontamination » (Anses 2022), en préparation).

Bien qu'elle soit possible, la vaccination systématique n'est économiquement envisageable que chez certaines espèces (canards, faisans ou dindes par exemple). Aucun vaccin botulique destiné aux volailles ne dispose néanmoins d'AMM en France.

Bien que figurant dans la nomenclature des maladies réputées contagieuses depuis 2006 puis en tant que danger sanitaire de 1^{ère} catégorie depuis 2013, aucun arrêté ministériel ne définit les mesures spécifiques de police sanitaire à appliquer dans les foyers de botulisme aviaire. Cette situation conduit à une gestion des foyers en France au cas par cas par les DDPP en fonction des espèces et de l'atteinte des lots. Les seules mesures réglementairement édictées étant la déclaration obligatoire de la suspicion et l'interdiction de l'envoi d'un lot de volailles malades dans un établissement d'abattage (dispositions non spécifiques au botulisme). Après avis favorable de la DDPP, les animaux issus de lots ayant connu un épisode de botulisme et ne présentant pas de signe clinique sont envoyés à l'abattoir.

Aucune mesure réglementaire spécifique au botulisme n'est définie pour ce qui est du devenir des œufs en filière ponte d'œuf de consommation. Des mesures peuvent être mises en place au cas par cas, notamment le tri des œufs souillés.

3.3 Parties du corps, tissus et œufs présentant un risque d'émission du danger représenté chez les volailles par *C. botulinum* et la neurotoxine botulique

Ce paragraphe, sur la base des données précédemment présentées (section 2.2.6), vise à désigner les parties du corps et tissus de volailles issues d'élevages infectés qui, manipulées à l'abattoir et dans un atelier de transformation ou destinées à la consommation sont susceptibles de contenir de la toxine botulique, des cellules végétatives ou des spores botuliques. Il en est de même avec les œufs produits dans des élevages infectés.

Deux situations sont possibles selon le statut sanitaire du lot de volailles, cliniquement affecté de botulisme aviaire (par exemple par *C. botulinum* de type C/D) ou porteur asymptomatique (par exemple par *C. botulinum* de type D/C).

3.3.1 Volailles appartenant à un lot cliniquement atteint de botulisme aviaire

Les probabilités de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxine) dans les différentes parties du corps et les œufs des volailles ont donc été évaluées pour les trois catégories de volailles précédemment désignées : les volailles malades, les volailles issues d'un lot dans lequel la maladie a été diagnostiquée mais dont l'abattage a été autorisé après constatation par le vétérinaire sanitaire de l'absence de signes cliniques et les volailles sans signe clinique appartenant à un lot atteint pour lesquelles lequel le botulisme n'a pu être (encore) diagnostiqué, donc considérées en fin de période d'incubation.

Dans ces trois cas, même en tirant parti des données disponibles, ces évaluations, présentées dans le tableau 4 ci-après, s'apparentent à des avis d'experts. L'indétermination (large intervalle proposé pour les scores attribués) pour qualifier la probabilité de présence de *C. botulinum* dans les différents tissus exprime la variabilité des avis et donc pour partie l'incertitude qui découle du manque ou de l'hétérogénéité des données disponibles, mais aussi de la diversité des situations rencontrées. Par exemple, la variabilité importante des probabilités de présence de la toxine dans le sang et les tissus des volailles appartenant à des lots en fin de période d'incubation découle pour partie de la prise en compte des différences de sensibilité entre espèces de volailles. En effet, la recherche de toxine dans le sang s'avère le plus souvent négative chez les espèces les plus sensibles, comme c'est le cas chez la dinde ou le faisan, alors qu'elle est plus fréquemment positive chez le poulet dont la faible sensibilité aux toxines C ou C/D implique, pour que des signes cliniques apparaissent, des concentrations de toxine plus élevées.

Tableau 4 : Evaluation qualitative de la probabilité de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxine) dans différents tissus et les œufs de volailles d'un lot atteint de botulisme (volailles avec ou sans signes cliniques) ou précédemment atteint de botulisme (après disparition des signes cliniques)

NB : *Compte tenu du manque de données, l'évaluation qualitative de la probabilité de présence de C. botulinum s'appuie essentiellement sur l'avis des experts du GT.*

Sources potentielles de contamination	Lot en fin de période d'incubation						Lot dans lequel le botulisme a été diagnostiqué		
	Volailles sans signes cliniques			Volaille en début de phase symptomatique			(Pas de signes cliniques)		
	Cellules végétatives (-/+ /++)*	Spore (-/+ /++)*	Toxine (-/+ /++)*	Cellules végétatives (-/+ /++)*	Spore (-/+ /++)*	Toxine (-/+ /++)*	Cellules végétatives (-/+ /++)*	Spore (-/+ /++)*	Toxine (-/+ /++)*
Tube digestif (estomacs, intestin, caeca) ¹	+/++	+/++	-/+	++	++	++	+/++	+	-/+
Foie ²	+/++	-/+	-	++	+	-/++	+/++	-/+	-
Sang ³	-	-	-	-	-	-/++	-	-	-
Poumons, rates, reins ⁴	-	-	-	-	-	-/++	-	-	-
Muscles ⁴	-	-	-	-	-	-/++	-	-	-
Pattes, peau, plumes, bec ⁵	+/++	+/++	-	+/++	+/++	-	+/++	+/++	-
Œuf : jaune et blanc ⁶	-	-	-	Ponte interrompue			-	-	-
Œuf : coquille de l'œuf ⁶	-	-/+	-				-	-/+	-

(*) : La probabilité de présence du danger (forme végétative, spore ou toxine) est estimée comme :

- : « nulle (0) à très faible (4) » ; (+) : « faible (5) à peu élevé (6) » ; (++) : « assez élevé (7) à très élevé (9) ».

(1) : Le développement de la maladie dans le lot suppose une multiplication de la bactérie dans le tube digestif des volailles et une transmission via la litière contaminée par les fientes. Le portage digestif persiste dans le lot après disparition des signes cliniques.

(2) : Le foie des volailles malades est l'organe dans lequel *C. botulinum* est le plus régulièrement détecté. Bien que non recherchée en routine dans le foie, la présence de toxine y est également rapportée. Dans le lot, après disparition des signes cliniques, la détection de *C. botulinum* dans le foie peut atteindre 60 à 100% des volailles testées.

(3) : Le sang chez les volailles malades assure la diffusion de la toxine issue de et / ou produite dans l'intestin, mais sa présence n'y est pas systématiquement détectable, en particulier chez les espèces les plus sensibles comme la

dinde ou le faisan. Une volaille sans signes cliniques, même dans un environnement contaminé, est considérée comme ne présentant pas de toxine dans le sang, sinon à des concentrations extrêmement faibles et non détectables.

(4) : La présence de toxine dans ces organes ou tissus est dépendante de la concentration sanguine et ne peut donc être écartée chez les volailles malades. Les rares communications relatives à la présence de bactéries (spores ou formes végétatives) dans les différents tissus (autres que le foie) chez les sujets morts de botulisme conduisent à estimer cette éventualité chez l'animal malade comme extrêmement faible.

(5) : Les pattes sont souillées au contact du sol et de la litière contaminés par les fientes. Il en est de même pour la peau et surtout les plumes, contaminées aussi par les poussières émises lorsque les oiseaux grattent le sol ou la litière. La persistance de la toxine dans les particules de fientes présentes sur la peau et sur les plumes est considérée comme quasi-nulle.

(6) : La toxine, les cellules végétatives et les spores n'ont pu être détectées dans les œufs de volailles issues d'un lot atteint. La ponte est interrompue chez les femelles atteintes de botulisme. En revanche, la bactérie peut être détectée sur la coquille après passage de l'œuf dans le cloaque, lorsque l'œuf est souillé par des fientes contaminées ou, après collecte, lorsqu'il est placé en contact avec des surfaces contaminées (tapis de ponte...).

3.3.2 Volailles appartenant à un lot infecté asymptomatique (élevage sans historique de botulisme)

Une circulation de *C. botulinum* associée à un portage asymptomatique peut être détectée dans certains élevages de volailles, notamment lors d'enquêtes épidémiologiques induites par la découverte de foyers bovins dus au type D/C auquel les volailles, *Gallus gallus* en particulier, s'avèrent peu ou pas sensibles. Un portage asymptomatique par le type C/D est aussi possible dans des élevages sans historique de botulisme, mais il se traduit habituellement par un faible taux de détection.

En l'absence de cas cliniques, les lots correspondants de volailles ne sont pas visés par la réglementation sanitaire, et, comme précédemment souligné, l'arrêté du 30 mai 2008 indique que seul l'envoi à l'abattoir de volailles atteintes de botulisme sous sa forme clinique ou suspectes de l'être est interdit.

Comme l'indiquent les données publiées (cf. section 2.2.6.2), ce portage se traduit par la présence de la bactérie dans le tube digestif et les fientes. Aucune donnée publiée ne fait référence à la détection de la bactérie (ou sa toxine) en dehors du contenu du tube digestif des animaux, qu'il s'agisse du foie ou d'autres tissus.

Les probabilités de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxine) dans les différentes parties du corps et les œufs de ces volailles sont indiquées dans le tableau 5.

Tableau 5 : Evaluation qualitative de la probabilité de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxine) dans différents tissus et les œufs de volailles d'un lot porteur asymptomatique (sans signe clinique)

Sources potentielles de contamination	Lot infecté asymptomatique (pas d'atteinte clinique de botulisme)		
	Cellules végétatives (-/+ /++)*	Spores (-/+ /++)*	Toxine (-/+ /++)*
Tube digestif (estomacs, intestin, caeca) ¹	+/++	+/++	+
Foie ²	-	-	-
Sang ²	-	-	-
Poumons, rates, reins ⁴²	-	-	-
Muscles ²	-	-	-
Pattes, peau, plumes et bec ³	+	+	-
Œuf : Jaune et blanc ⁴	-	-	-
Œuf : coquille de l'œuf ⁴	-	-/+	-

(*) : La probabilité de présence du danger (forme végétative, spore ou toxine) est estimée comme :

- : « nulle (0) à très faible (4) » ; (+) : « faible (5) à peu élevé (6) » ; (++) : « assez élevé (7) à très élevé (9) ».

(1) : La circulation de la bactérie parmi les volailles du lot infecté implique un certain degré de multiplication dans le tube digestif et une excrétion dans les fientes, à l'origine d'une transmission via la litière contaminée.

(2) : Aucune donnée publiée ne fait référence à la détection de la bactérie (ou sa toxine) en dehors du contenu du tube digestif des animaux, qu'il s'agisse du foie ou d'autres tissus.

(3) : Les pattes sont souillées au contact du sol et de la litière contaminés par les fientes. Il en est de même pour la peau et surtout les plumes, contaminées aussi par les poussières émises lorsque les oiseaux grattent le sol ou la litière. La persistance de toxine dans les particules de fientes présentes sur la peau et sur les plumes est considérée comme quasi-nulle.

(4) : A fortiori, l'absence de détection de la bactérie ou sa toxine dans les œufs de volailles atteintes cliniquement de botulisme exclut leur présence dans les œufs des volailles porteuses asymptomatiques. En revanche, des cellules végétatives ou des spores peuvent être détectées sur la coquille lorsque l'œuf est souillé par des fientes contaminées ou, après collecte, lorsqu'il est placé en contact avec des surfaces contaminées (tapis de ponte...).

Compte tenu du faible nombre d'études disponibles dans la littérature, l'évaluation a été réalisée d'après l'avis des experts. Dans le cas des animaux en provenance d'un lot atteint de botulisme, le système digestif (y compris le foie) et les parties du corps en contact direct avec l'environnement extérieur ont été identifiés comme les plus à risque en termes de contamination par les cellules végétatives, spores ou toxines.

Des infections inapparentes sont détectées dans des lots de poulets infectés par *C. botulinum* D/C, toutefois aucune donnée publiée ne fait référence à la détection de la bactérie (ou sa toxine) en dehors du contenu du tube digestif de ces animaux.

Pour ce qui concerne les œufs, le danger est surtout représenté par la présence de spores sur la coquille, cette présence est évaluée avec une probabilité qui ne dépasse pas la qualification de « peu élevée ».

3.4 Filière volaille de chair

3.4.1 Transport et abattage : analyse des voies de contamination de la viande et d'exposition professionnelle

Un abattoir est un établissement permettant de préparer les viandes, de traiter les co-produits (comestibles ou non) et de soumettre ces denrées à une inspection de salubrité en même temps qu'à l'estimation de leur qualité. Ces établissements agréés, spécialisés ou non, publics ou privés, vont donc permettre la transformation progressive d'un animal vivant issu de la filière avicole, en carcasse de viande et en co-produits, on parle alors de 1^{ère} transformation ou de « préparation des viandes à l'abattoir ». Cette préparation consiste en une succession d'opérations unitaires (accrochage, saignée...) connue sous le terme de « diagramme d'abattage ». La carcasse obtenue lors de la 1^{ère} transformation peut être commercialisée en l'état (prête à cuire) ou bien être « démontée » pour donner différents types de produits de découpe (cuisses de poulet par exemple) ou, selon le vocabulaire professionnel, des « élaborés de volailles » (charcuteries de volailles par exemple).

La liste des abattoirs de volailles et de lagomorphes agréés CE au 10 août 2021 (site web DGAL consulté en août 2021¹⁴) fait apparaître, hors départements et territoires d'outre-mer, un total de 720 établissements agréés, en excluant la trentaine d'abattoirs spécialisés « lapins » ou « autruches ». Ce total recouvre bien évidemment une très grande diversité de structures et de fonctionnement, tant au niveau de la « spécialisation » de l'outil (abattoirs de canards, dindes, poulets...) que de sa capacité de production en termes de tonne équivalent carcasses (TEC)/jour. Par contre, les opérations constitutives du diagramme d'abattage sont communes. Les différences se situeront généralement au niveau de la taille des équipements et de l'automatisation de certaines étapes. Ainsi, dans ce total, vont coexister des abattoirs « industriels » annonçant la transformation de 500 000 poulets export/jour travaillant en 3x7h sur deux chaînes d'abattage, et d'autres abattoirs fonctionnant un ou deux jours par semaine pour abattre quelques centaines de têtes. Le poulet, la dinde et le canard représentaient 92 % des abattages en 2019 (Agreste 2020).

¹⁴ [SSA1_VIAN_COL_LAGO.pdf \(agriculture.gouv.fr\)](#)

Le GT a fait le choix de décrire une situation standard d'un abattoir de grande capacité représentatif du marché actuel et de présenter les points clés du diagramme d'abattage au regard de la contamination de la viande par *C. botulinum*. A chacune des étapes du processus d'abattage, le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition professionnelle au regard des principaux modes de transmission (INRS 2021):

- inoculation (blessure profonde par les becs, griffes, éperon coupure avec des objets contaminés),
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés),
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

3.4.1.1 Description synthétique du processus d'abattage

■ **Le ramassage et le transport**

Le ramassage des volailles en élevage se fait en général de nuit (limitation du stress) par une équipe de ramasseurs. Il est manuel ou semi-automatisé. Une fois les caisses de transport remplies, les oiseaux sont acheminés par camion vers l'abattoir en respectant les modalités réglementaires et/ou celles liées à la saison. Le ramassage des animaux d'un lot peut s'effectuer en une ou plusieurs fois, dans ce cas il s'agit d'un détassage. C'est notamment le cas des bâtiments dans lesquels les animaux sont non sexés. Pour des questions de poids et de débouchés, les mâles partent plus tôt que les femelles à l'abattoir, libérant ainsi de la place dans le bâtiment et abaissant la densité d'animaux.

Les oiseaux constituent le réservoir primaire du danger Clostridium. Comme pour toutes les activités impliquant une proximité et/ou une manipulation des oiseaux, l'exposition professionnelle du ramasseur et du transporteur est possible lors de la séquence ramassage / chargement / transport (inoculation, ingestion ou inhalation). Cette exposition est maximale lors du ramassage.

■ **L'arrivée à l'abattoir et le repos préalable**

Au moins 24h avant l'enlèvement de chaque lot, l'éleveur transmet à l'abattoir la fiche ICA. Ce document qui engage la responsabilité de l'éleveur répertorie les informations pertinentes sur les lots d'animaux quittant l'exploitation (caractéristiques de la bande et données de production, programme alimentaire, état sanitaire, pathologies exprimées et traitements administrés en cours d'élevage). C'est un outil complémentaire pour l'analyse de risque lors des contrôles en abattoir, qui permet d'anticiper la gestion des lots d'animaux pouvant présenter un risque à l'abattoir.

Pour réduire le stress des oiseaux, un repos préalable à l'installation sur la chaîne est obligatoire, durant lequel une première « inspection » (Inspection *ante mortem* IAM) des volailles est réalisée. Du fait des cadences et de la productivité, il s'agit le plus souvent d'observations par échantillonnage de caisses d'animaux, durant lesquelles, principalement et théoriquement :

- les oiseaux morts sont éliminés ;
- la propreté du plumage est observée ;
- la densité d'animaux dans les cages est évaluée (protection animale) ;
- le nombre d'oiseaux morts par cage est déterminé ;
- la présence d'anomalies cutanées peut être observée ;
- le taux de malformation des pattes est observé et, le cas échéant, estimé.

Il s'agit de détecter des signes de maladies, des lésions évocatrices de dangers mais également des signes de mauvaises conditions d'élevage, de ramassage ou de transport. Cette inspection est d'une réalisation difficile, car les cages sont empilées et les animaux restent en cage ; de plus, elle ne peut pas concerner tous les oiseaux pour des raisons pratiques.

L'abattage des lots présentant des anomalies peut être différé. Dans la mesure du possible, les lots sales sont abattus en fin de journée (abattage logistique). L'IAM est en fait la combinaison d'une inspection documentaire sur base d'ICA et de cette inspection physique par échantillonnage de cages.

Cas du botulisme

En théorie, le diagnostic sur animaux vivants est possible (paralysie générale flasque (pattes, ailes, cou, paupières), animaux moribonds ou retrouvés morts au déchargement). Cependant, compte-tenu des modalités de réalisation de l'IAM à l'abattoir, ce diagnostic est très difficile à réaliser dans la pratique.

Les animaux guéris ou en incubation ne présentent ni signes cliniques ni lésions et ne sont pas détectables lors de l'inspection *ante mortem* ou *post mortem*.

Dans tous les cas, il est important de nettoyer et désinfecter le camion après le déchargement des caisses de transport et avant le départ de l'abattoir, et les caisses après l'accrochage (risques d'exposition professionnelle à des fientes contaminées).

À cette étape, l'exposition professionnelle du travailleur est limitée du fait de l'absence de manipulations. Elle va concerner les agents chargés de l'inspection visuelle (risque d'inhalation).

■ L'accrochage, l'insensibilisation, la saignée et l'égouttage

La séquence de ces opérations diffère selon le mode d'insensibilisation pour lequel il existe deux grandes modalités de réalisation :

- L'électronarcose en bain d'eau. Les animaux, accrochés par les pattes à la chaîne d'abattage en mouvement et dont la tête trempe dans un bain d'électronarcose permettent la transmission d'un courant électrique entre le bac et la chaîne. L'insensibilisation est obtenue par le passage de ce courant électrique dans l'encéphale des animaux, notamment.
- L'hypercapnie. L'étourdissement¹⁵ est obtenu en plaçant les animaux en caisses dans une atmosphère très enrichie en dioxyde de carbone. Les animaux, insensibilisés, sont ensuite accrochés sur la chaîne.

L'insensibilisation est une opération obligatoire ; elle doit entraîner la perte de conscience des oiseaux mais pas l'arrêt cardiaque. La présence d'une activité cardiaque (cf *infra*) est essentielle pour une bonne saignée.

Seuls neuf abattoirs industriels sur 124 disposent d'un système d'étourdissement par hypercapnie mais ils représentent 25% de la production annuelle. Leur part est en augmentation (informations DGAL).

L'accrochage se fait en insérant les membres postérieurs dans une structure métallique en mouvement, les animaux se retrouvent ainsi la tête en bas. Il est réalisé sur les oiseaux vigiles dans le cas d'une chaîne avec étourdissement par électronarcose ou sur animaux étourdis après la phase d'insensibilisation par hypercapnie.

L'accrochage d'animaux vigiles permet généralement des cadences d'approvisionnement des chaînes d'abattage très élevées et peut constituer un second « tri » parmi les oiseaux, notamment en retirant les morts. Par contre, il s'agit d'un événement « stressant » pour les animaux, pourvoyeur de lésions traumatiques (hématomes, fractures notamment des ailes ...). De surcroît, les « accrocheurs » sont soumis, dans un environnement généralement confiné, à des poussières, plumes, aérosols divers générés par les battements d'ailes au moment de l'accrochage (Puterflam *et al.* 2016). L'accrochage d'oiseaux préalablement étourdis se déroule dans de meilleures conditions pour les opérateurs, diminuant à l'évidence le risque de blessure. Nonobstant, le choix d'un mode d'insensibilisation obéit d'abord à différentes contraintes industrielles liées aux infrastructures, aux équipements disponibles, à l'espèce cible, aux capacités de production (cadence), etc.

Comme vu ci-dessus, l'accrochage d'oiseaux vigiles doit être considéré comme une activité comportant une exposition plus importante aux blessures et aux poussières. La manipulation d'oiseaux, qu'ils soient vigiles ou non, expose à une problématique d'hygiène des mains.

La saignée suit l'étourdissement. L'activité cardiaque est nécessaire à une bonne saignée qui est réalisée par section des carotides le plus souvent, mais pas exclusivement, de manière automatique. Le sang est récolté dans le couloir d'égouttage qui doit être suffisamment long. Le sang doit être

¹⁵ Ici, l'étourdissement et l'insensibilisation sont considérés comme synonymes

rapidement réfrigéré. La saignée peut être à l'origine d'excrétions par les animaux ; les fientes des animaux seront libérées lors du relâchement sphinctérien consécutif à la mort. La saignée automatique constitue la modalité dominante. L'utilisation d'un couteau par un opérateur se retrouvera essentiellement dans les petites structures mais également après le poste de saignée automatique pour veiller à corriger d'éventuels échecs de saignée.

L'exposition professionnelle du travailleur lors de la saignée et l'égouttage est possible en cas de saignée au couteau (inoculation). Elle peut également survenir par ingestion (contamination de la main qui tient la tête) ou par inhalation de spores mises en suspension lors de mouvements agoniques.

■ L'échaudage et la plumaison

Le procédé de plumaison le plus utilisé actuellement est mécanique : par flagellation des oiseaux saignés et suspendus à l'aide de rouleaux sur lesquels sont fixés des doigts de caoutchouc semi-rigide. Préalablement, les follicules plumeux ont été imprégnés quelques minutes par de l'eau chaude (53 à 59°C généralement). Cette imprégnation correspond à l'échaudage. Ce dernier peut être fait dans des bacs (le plus courant) ou, selon les équipements, par aspersion d'eau ou caissons d'échange-vapeur. L'échaudage et la plumaison sont considérés comme des étapes permettant la diffusion de la contamination externe des oiseaux. La plumaison mécanique, par la pression exercée sur la carcasse, peut s'accompagner de sorties de matières fécales contaminant la carcasse et le matériel. Il est à noter que la plumaison peut s'effectuer à sec (plumeuse à rouleaux) ou bien à la cire comme chez les anatidés.

Pour ce qui concerne l'exposition professionnelle, il faut distinguer le cas des grandes structures avec des cadences élevées et très automatisées de celui des petites structures où ces opérations seront largement manuelles. Si faits manuellement, l'exposition professionnelle du travailleur lors de l'échaudage et la plumaison est possible (inoculation, ingestion, inhalation).

Dans tous les cas, il importera, pour les opérateurs, d'être vigilants lors des opérations de nettoyage et désinfection des différents matériels utilisés et d'évacuation des déchets, tous deux fortement contaminés.

■ Séparation de la tête et coupe des pattes

À ce stade, la source de contamination représentée par les plumes a été éliminée. La tête est séparée de la carcasse par passage dans un guide qui s'écarte de la chaîne d'abattage. La trachée et l'œsophage peuvent venir avec la tête ; la peau du cou, étirée, reste en place. Les pattes peuvent être sectionnées dans la foulée ou bien après l'éviscération. Ces opérations sont largement automatisées.

■ L'éviscération – La déjaboteuse

L'éviscération des poulets est aujourd'hui automatique ou semi-automatique, par des équipements dont le fonctionnement peut différer selon le fabricant. En tout état de cause il s'agit, après ouverture de la cavité abdominale, d'enlever l'intestin par l'orifice cloacal et de récupérer le foie, le cœur et le gésier. Ces viscères, valorisés pour la consommation humaine, vont subir un parage et devront être réfrigérés.

Puis la déjaboteuse va « nettoyer » le cou avant un lavage externe et interne à l'eau qui précède l'aspiration finale des poumons.

Il convient de noter que l'effilage, largement manuel, reste une technique pratiquée en France. Cela consiste en l'ablation de l'intestin par le cloaque sans enlèvement des viscères et abattis. Nonobstant, le marché des volailles effilées reste marginal en France.

Encore une fois, la distinction doit être faite entre le procédé manuel ou automatisé, ce dernier exposant moins les opérateurs. De fait, si faits manuellement, l'exposition professionnelle du travailleur est possible lors de l'éviscération/utilisation de la déjaboteuse (inoculation, ingestion). L'inhalation de

spores mises en suspension apparaît très peu probable dans le cas d'une réalisation de ces opérations conformes aux bonnes pratiques.

■ Inspection Vétérinaire *Post-Mortem* – Vérification de l'éviscération

C'est l'examen macroscopique visuel des carcasses et des viscères visant à détecter des « anomalies » évoquant un possible caractère dangereux des produits. À ce stade, on peut vérifier également si l'éviscération est bien complète.

Cas du botulisme : les animaux malades ou en incubation ne présentent aucune lésion spécifique. L'Inspection *post mortem* n'est d'aucune utilité pour détecter le botulisme à l'abattoir.

Les agents chargés de l'inspection et de la vérification de l'éviscération peuvent être exposés du fait de la manipulation des carcasses et de l'absence de signes visibles. Ils devront être très vigilants à l'hygiène de leurs mains et avants bras (contamination manuportée).

■ Calibrage – Bridage

Le calibrage (pesée) permet d'orienter le produit vers une filière de transformation particulière, le cas échéant. Le bridage par un bracelet élastique permet une présentation classique de type PAC (prêt à cuire).

Les opérateurs manipulant les carcasses pour les brider devront être très vigilants à l'hygiène de leurs mains et avants bras (contamination manuportée).

■ Ressuage – Refroidissement

Les viandes (au sens large) de volailles doivent être amenées à une température inférieure à 4°C le plus rapidement possible. Il existe deux grandes modalités de refroidissement :

- Un dit « à sec » utilisant un air très froid circulant à vitesse élevée sur et entre les carcasses ;
- Un dit « humide » (*spin chilling*) obtenu par un parcours immersif des carcasses dans des bains d'eau et de glace. Ce mode de refroidissement est suivi d'une surgélation, les produits étant généralement exportés. Il est à noter que dans ce cas, l'eau des bacs de refroidissement peut être additionnée de substances chimiques autorisées permettant une réduction de la charge microbienne en surface des carcasses.

3.4.1.2 Les points-clés du diagramme d'abattage au regard de la contamination par *Clostridium botulinum*

La figure 16 présente le schéma conceptuel de l'abattage des volailles. Le principe à l'abattoir consiste à préparer la carcasse entière des oiseaux (ainsi que les autres pièces comestibles) et/ou de récupérer les muscles attenants au squelette ou les principales pièces anatomiques après différentes opérations successives ayant mené à la mise à mort des animaux, l'enlèvement des plumes et des viscères.

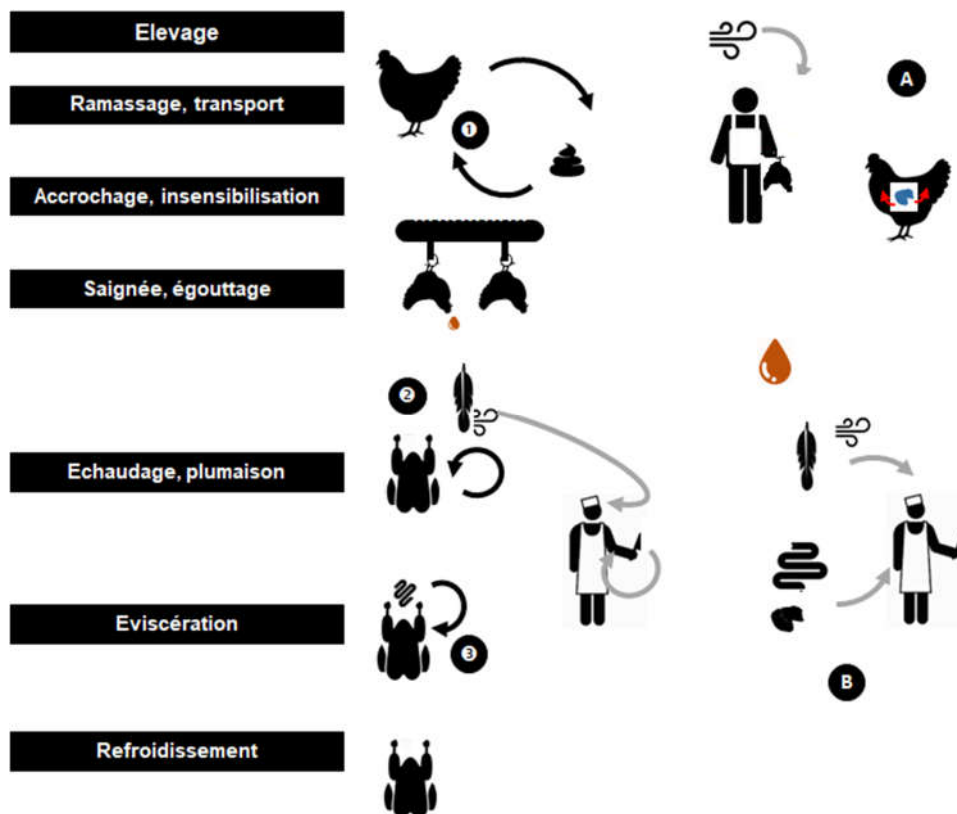


Figure 16 : Principales sources et voies de contamination de la viande (flèches noires) et d'exposition des opérateurs (flèches grises) par *C. botulinum* du transport à la fin de la chaîne d'abattage

Les lettres et numéros correspondent aux sources et étapes clés de contamination identifiées par le GT.

A : contamination ; 1 : plumes souillées par les matières fécales 2 : contamination de la carcasse au moment de la plumaison ; 3 : contamination par le contenu du tube digestif ; B : sources d'exposition professionnelle

La situation considérée est l'abattage de volailles appartenant à un lot atteint de botulisme ou précédemment atteint de botulisme. Le réservoir principal de *Clostridium botulinum* (toutes formes) est constitué par le tube digestif des oiseaux. La contamination en profondeur des muscles par *C. botulinum* suite à une bactériémie d'origine digestive, ainsi que le transfert de la toxine aux muscles par voie sanguine, semblent pouvoir être considérés comme des événements très rares. La contamination de la carcasse sera essentiellement superficielle et pourra se produire en *ante mortem* (élevage, ramassage, transport, attente, accrochage) ou en agonique et *post mortem*. Compte tenu du raisonnement ayant conduit à l'élaboration du Tableau 4, la suite de l'analyse concernera principalement les spores.

Les matières fécales seront donc à l'origine de la grande majorité des contaminations. Par conséquent, toutes les étapes (jusqu'à l'enlèvement du tube digestif) du processus entraînant l'excrétion seront considérées comme des étapes clés au regard du transfert des *C. botulinum* vers la peau ou le muscle. Ainsi, le ramassage, le transport, l'attente en cage, l'accrochage, la saignée (par relâchement des sphincters) pourront être à l'origine d'excrétions et donc de contaminations externes des animaux et de l'environnement.

L'échaudage est une étape particulière. Elle consiste, lorsqu'elle est pratiquée, juste après la saignée, à immerger (la plupart du temps) tous les animaux (quelle que soit leur contamination externe) dans une eau généralement comprise entre 53 et 59°C selon les abattoirs, pendant deux à trois minutes. La température de l'eau du bac d'échaudage est un facteur important pour faciliter la plumaison mais ne permet aucune inactivation des spores de *C. botulinum*. Il est à noter que pour des raisons d'efficacité, il est recommandé par la profession de faire passer les animaux à contre-courant de l'eau dans trois bacs en « cascades », du plus « sale » vers le plus « propre », pratique pouvant permettre une certaine élimination « mécanique », limitée toutefois.

La plumaison, lorsqu'automatisée, entraînera mécaniquement (i) des excréments de matières fécales sur des animaux accrochés par les postérieurs et (ii) la diffusion de poussières de fientes à l'intérieur de l'équipement.

Enfin, par essence, la manipulation du réservoir principal de *C. botulinum* et son enlèvement (étape d'éviscération) est clairement une étape « critique » pour la contamination externe des carcasses et des organes internes (foies par exemple). L'automatisation de cette étape a permis l'augmentation des cadences sans éviter totalement les accidents (mauvais réglage, rupture de l'intestin...). La situation ne doit pas être considérée comme figée ; il est probable qu'à moyen ou long terme, les équipements d'éviscération s'amélioreront au sens d'une diminution des « accidents d'éviscération ». De même, l'amélioration de l'homogénéité des lots en élevage (poids et conformation des oiseaux) devra participer à cette diminution.

Dès lors que l'éviscération aura eu lieu, les contaminations seront alors généralement qualifiées d'indirectes, par contact entre carcasses et/ou contact de la carcasse avec une surface contaminée (équipement, matériel, opérateurs, etc.). Quantitativement moins importantes que les contaminations par les matières fécales, elles ne doivent néanmoins pas être sous-estimées. Cependant, la mise en œuvre et le respect des bonnes pratiques d'hygiène, le bon entretien des matériaux ainsi que les procédures validées de nettoyage et de désinfection sont de nature à maîtriser ces contaminations.

A ce stade, il est possible, lorsque cela est autorisé, de « traiter » les carcasses avant le ressuage. Si l'on met de côté l'utilisation de diverses molécules à activité antibactérienne en « bain » ou « spray », interdites pour les marchés français et européens, l'utilisation d'eau chaude (ou vapeur) peut être citée. Au-delà, des améliorations technologiques du procédé d'abattage sont prévisibles, elles visent, et viseront, la réduction, ciblée ou non, de la charge microbiologique des carcasses. A titre d'exemple, le traitement des carcasses de poulets par une combinaison de vapeur et d'ultrasons peut être cité. L'impact de ces solutions innovantes sur les dangers biologiques pertinents de la filière devra être évalué.

Compte tenu de la nature du danger et de son réservoir, toutes les étapes du processus (jusqu'à l'enlèvement du tube digestif) entraînant l'excrétion sont considérées comme des étapes clés au regard du transfert des *Clostridium botulinum* vers la peau ou le muscle. Après l'étape d'éviscération, les contaminations seront alors généralement qualifiées d'indirectes, par contact entre carcasses et/ou contact de la carcasse avec une surface contaminée (équipement, matériel, opérateurs...). Bien que non spécifiques à *C. botulinum*, les mesures de biosécurité en élevages ainsi que les Bonnes Pratiques Hygiéniques d'abattage sont de nature à limiter ce type de contaminations. En l'absence de CCP (*Critical Control Point*), toutes les démarches permettant d'attester de leur mise en place et de leur efficacité doivent être encouragées. Lorsque le statut du lot est connu (élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué), la séquence transport-abattage doit être effectuée de manière logistique (préférentiellement en fin de journée et avant une opération de nettoyage et de désinfection renforcée utilisant un produit sporicide) afin de limiter les transferts de contamination entre lots et vers les surfaces.

3.4.1.3 Les points-clés du diagramme d'abattage au regard de l'exposition professionnelle

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long de la séquence Poulailier-Abattoir concerne les ramasseurs, les chauffeurs et les intervenants sur la chaîne. Il convient de noter qu'au regard des modes de transmission considérés, les personnes les plus exposées sont les éleveurs ; le principal réservoir de danger étant l'animal lui-même (p. ex. tube digestif, phanères).

Toutes les possibilités d'exposition professionnelle ont été présentées, même si leur survenue est **hautement improbable**. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir, contrairement à d'autres maladies (cas de la chlamydiose aviaire). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et/ou que les bonnes pratiques d'hygiène et d'abattage sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.

■ Botulisme par inoculation

Le risque lié aux blessures infligées par les animaux vigiles est sans doute limité mais réel. Il va concerner essentiellement les oiseaux de plus grande taille possédant griffes et éperons (p.ex. dindons, poulets de races lourdes, canards). Cependant, il est très improbable que les blessures, souvent superficielles, soient suffisamment profondes pour créer des conditions d'anaérobiose permettant, après la germination de spores de *C. botulinum*, la production de toxine et la survenue d'un botulisme chez les ramasseurs et les accrocheurs qui doivent être équipés systématiquement d'EPI (Équipements de Protection Individuelle), et de gants épais notamment.

Toute manipulation d'objet coupant/piquant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation suite à une blessure ou une coupure avec un objet possiblement contaminé avec des spores, des cellules végétatives ou des toxines. L'utilisation d'outils individuels serait responsable de 15 % des accidents à l'abattoir (Ministère du travail 2009). Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter/maîtriser le risque de botulisme par coupure, d'autant plus dans les abattoirs de volailles de forte capacité où de nombreuses opérations sont automatisées et où les interventions d'opérateurs avec un couteau sont réduites à la portion congrue (postes de vérification saignée, arrachage tête et section pattes essentiellement). Ce raisonnement ne s'applique pas dans les petites structures où l'utilisation d'équipements tranchants/piquants est plus fréquente.

Lors de l'abattage d'animaux issus d'un élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué, le GT souhaite attirer particulièrement l'attention sur la stricte application de ces mesures, et sur la nécessité, dans tous les cas, de désinfecter très soigneusement toutes les blessures chez les travailleurs et recouvrir toute plaie non cicatrisée.

■ Botulisme par inhalation

La nécessité qu'une grande quantité de toxine soit effective au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores ne causera pas cette forme de botulisme. Les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont pas en place dans les voies respiratoires supérieure et inférieure. Suite à l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée par l'escalator mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme.

Les personnes les plus exposées durant la séquence poulailler-abattoir sont :

- Les ramasseurs qui vont devoir canaliser puis installer un très grand nombre d'oiseaux dans des caisses de transport en évitant les traumatismes (ailes ou pattes cassées). Cette activité va générer beaucoup de poussières et d'aérosols.
- Les accrocheurs, surtout lorsque les oiseaux sont vigiles (électronarcose). Les cadences atteintes (8 000 poulets/h) impliquent la proximité et la manipulation d'un grand nombre d'oiseaux qui arrivent aux postes d'accrochage. À ce stade, il peut être rappelé que l'accrochage d'animaux étourdis par voie gazeuse (hypercapnie ou azote) est moins générateur de poussières et d'aérosols pour les accrocheurs que ne l'est l'accrochage par électronarcose.
- Les opérateurs en charge du nettoyage sous pression des équipements (ex. plumeuse).

L'exposition de ces personnes sera également dépendante de la conception des locaux (poulaillers, salle d'accrochage). Des espaces d'accrochage ouverts dans les locaux d'attente seront, par exemple, préférés à un petit local exigu et non ventilé (INRS 2017). La maîtrise des flux d'air (circulation, filtration) en salle d'accrochage est possible et devrait être favorisée (INRS 2017).

Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.

■ Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque, de même que le port de gants (et leur changement fréquent) au poste de vérification de l'éviscération et lors de la manipulation des foies. Pour les espèces et/ou les abattoirs nécessitant des interventions d'opérateurs plus fréquentes, le respect strict des bonnes pratiques d'hygiène et d'abattage est impératif. La mise en œuvre de toute démarche organisée et planifiée permettant de s'en assurer est naturellement à recommander.

Le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition au regard des principaux modes de transmission :

- Inoculation suite à une blessure profonde par les becs, griffes, éperons, coupure avec des objets contaminés ;
- Ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- Inhalation de poussières sur le lieu de travail.

L'application des mesures de protection des opérateurs (comme le port d'EPI) et des bonnes pratiques d'hygiène (lavage des mains en particulier) permet de limiter/maîtriser l'exposition des opérateurs à *C. botulinum*. Lors de l'abattage d'animaux issus d'un élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué, le GT souhaite attirer l'attention sur la stricte application de ces mesures et recommande la mise en œuvre d'une démarche organisée et planifiée permettant de s'en assurer.

3.4.2 Transformation

Les viandes de volailles préparées à l'abattoir doivent être amenées à une température inférieure à 4°C le plus rapidement possible. Le terme viandes est ici employé au sens le plus large incluant les muscles et les abats comestibles, notamment foies, cœurs et gésiers. Ces derniers rentrent en deuxième transformation pour y subir essentiellement un parage, une réfrigération et un éventuel conditionnement en unité de vente.

Seules seront considérées la possibilité d'une contamination en surface des carcasses et des abats à l'abattoir par des spores et la présence de cellules végétatives, spores, et toxine dans les foies issus d'animaux sans signes cliniques. La contamination profonde *ante mortem* des muscles par des spores (bactériémie) ne peut être exclue mais si elle intervient, il s'agit d'un événement particulièrement rare.

Les possibilités de contamination, croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* des types C, D, mosaïques, et E (non protéolytique) sont évaluées au cours de la transformation de trois types de produits :

- Produits crus à cuire : foies de volailles¹⁶ (et escalope de poulet) ;
- Produit cuit/ appertisé : foie gras (cuit / mi-cuit) ;
- Salaison de volaille : saucisson sec de poulet.

Cette sélection permet d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, séchage, ajout de sel et de conservateurs, traitement thermique.

¹⁶ Foies de volailles seront différenciés des foies gras

3.4.2.1 Première découpe – Deuxième transformation

On parle également de découpe anatomique, les produits issus de cette découpe sont :

- Les ailes (ailerons et blanquette) ;
- Les cuisses (haut de cuisse et pilons) ;
- Le tronc (filet et croupion).

Toutes les espèces ne sont pas découpées. Chez le canard, seul le mâle est découpé. L'homogénéité des individus dans l'espèce poule permet l'automatisation de la découpe (sauf Label Rouge), ce qui n'est généralement pas le cas chez la dinde (découpe manuelle).

La deuxième transformation s'applique aux produits de la découpe anatomique en les « fragmentant » un peu plus, ou bien en les désossant et/ou dépeçant. Elle donne lieu à de nombreux produits commercialisés. La structure tissulaire de ces produits n'est pas modifiée.

Les pièces de viande issues de la découpe sont stockées à 4°C.

Les produits (incluant les abats) sont ensuite conditionnés sous film perméable aux gaz, sous atmosphère modifiée ou sous vide. Les produits sont ensuite stockés à +4°C ou à -18°C, en attente d'expédition.

Lors des opérations de découpe, les sources de contamination sont les surfaces de travail, les outils de découpe et les opérateurs (transfert de contamination). La conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe sur la base de bonnes pratiques hygiéniques et de la démarche HACCP sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, croissance ainsi que la production de toxines. La mise en place de toute démarche planifiée permettant d'attester de cette bonne organisation ne peut qu'être recommandée (p. ex. surveillance de l'application des bonnes pratiques, surveillance microbiologique de l'environnement de production).

Le GT souhaite porter l'attention sur certains points de vigilance notamment le respect de la chaîne du froid, l'efficacité du nettoyage et de la désinfection des équipements et des surfaces de découpe.

■ Evolution de la contamination dans un produit cru à cuire (ex : foies de volaille, escalopes)

Très peu de données sont disponibles sur le niveau de contamination en *C. botulinum* des matières premières destinées à la transformation. Sur la base des quelques études publiées (poulet, dinde), le GT socle a estimé, selon l'approche NPP, un niveau de contamination inférieur à une spore par kg de viande fraîche (Anses 2021a). Concernant le foie, une étude réalisée par Membre *et al.* (2015) sur des matières premières destinées à la fabrication de conserves de foie gras de canard rapporte une prévalence de *C. botulinum* de 1,1% et estime la concentration jusqu'à 4,9 cfu/g.

La maîtrise de la chaîne du froid exclut toute possibilité de croissance et de toxinogénèse des *C. botulinum* du groupe III.

S'agissant des *C. botulinum* non protéolytiques de type E, psychrotrophes, le modèle de microbiologie prévisionnelle établi sur des données de culture en laboratoire (en milieu de culture et sous atmosphère maîtrisée) prévoit une croissance de 4,5 log10 pour des produits à pH=6 et à activité de l'eau de 0,997 en 10 jours (2/3 du temps à 4°C et 1/3 à 8°C). Cependant les tests de croissance réalisés par Peck, Webb et Goodburn (2020) pour des viandes de bœuf, agneau et porc, conservées selon un scénario de chaîne du froid (3°C/1j, 5°C/1j, 22°C/2h puis 8°C le reste du temps) constatent l'absence de neurotoxine détectable en fin de DLC. La toxine botulique n'a été détectée que dans des viandes manifestement altérées.

Chez le consommateur lors de la cuisson, la taille des pièces est un élément favorable à la diffusion rapide de la chaleur à l'ensemble de la préparation. Une cuisson même d'intensité modérée (cas des

confits, avec une valeur pasteurisatrice ,VP¹⁷, inférieure à 100), entraînera une inactivation des formes végétatives de *C. botulinum* du groupe III si la température est maintenue 10 min à 80°C (Anses 2021b) et de celles de type E non protéolytiques si la température est maintenue 15 minutes à 60°C (Grecz et Arvay 1982). A ces valeurs de VP, l'inactivation des éventuelles toxines C, D présentes ne sera que partielle (au-delà, VP 200 et supérieures, l'inactivation est totale). L'action de la cuisson sur les éventuelles spores présentes sera limitée mais les conditions de la production de toxine ne seront pas réunies dans les conditions attendues de consommation rapide puis d'application rigoureuse d'une chaîne du froid sur les restes du repas.

Conclusion sur les points clés de maîtrise

L'application rigoureuse de la chaîne du froid pour la conservation des viandes fraîches de volailles (incluant les abats) est un point clé de la maîtrise, visant notamment l'inactivité des formes sporulées de *C. botulinum*.

La cuisson des viandes (autres qu'abats) permet la maîtrise des formes végétatives et toxiques du danger. L'éventuelle présence de la toxine dans le foie ne peut être considérée maîtrisée par un procédé de cuisson à température basse.

3.4.2.2 Troisième transformation

De nombreuses technologies de transformation peuvent intervenir à ce stade de transformation (hachage, assaisonnement, cuisson, mélanges...) aboutissant à la modification de l'organisation tissulaire. De nombreux produits sont transformés avec un objectif de commercialisation directe, d'autres sont des PAI¹⁸, c'est le cas notamment des viandes séparées mécaniquement (VSM) et des surfines.

■ Foie gras (cuit – mi-cuit)

Les foies gras prélevés à l'abattoir sont refroidis (<3°C en moins de 24h) puis vient l'étape de déveinage (ou dénervage) consistant à l'enlèvement des veines dans tous les lobes du foie. Certaines veines peuvent contenir du sang qui donnerait un goût amer au foie après la cuisson. Cette étape se fait manuellement en atelier de transformation (sous régime du froid). Les lobes déveinés peuvent être rassemblés pour reconstituer le foie et utilisés pour tous types de fabrication à base de foie gras (cuit, mi-cuit, terrine...).

Un foie gras cuit est en général cuit en bocal fermé à une température comprise entre 90 et 110°C au four ou bain-marie pendant 20 à 30 min, le mi-cuit est cuit à plus basse température (70 à 85°C, 20 à 30 min) selon différentes recettes (torchons, bouillons, bain-marie...).

Après 20 minutes de traitement à 110°C, l'inactivation estimée pour les spores de *C. botulinum* de type III est supérieure à 12 log10. Après 30 min de traitement à 90°C, l'inactivation est de 3,4 log10 et de moins de 1 log10 à 70°C. Dans tous les cas, le refroidissement doit intervenir très rapidement. La conservation (au réfrigérateur pour le mi-cuit mais à possiblement à une température supérieure à +3°C pour le foie gras cuit) se fera pendant plusieurs mois (jusque 4 ou 12 mois selon mi-cuit ou cuit, durées de vie sous la responsabilité du transformateur).

Produit à activité de l'eau élevée, le foie gras présente un pH généralement de 6. Au cours de la conservation au froid, le développement d'une flore lactique d'altération peut faire baisser le pH des foies.

Dans les conditions présentées ci-dessus, la cuisson selon le barème le plus élevé (110°C/20min) permet la maîtrise du danger (spores et toxines des *C. botulinum* groupe III et type E) pour une

¹⁷ La valeur pasteurisatrice (notée VP) caractérise l'intensité du traitement thermique appliquée au produit. Elle est exprimée en équivalent temps (minutes) passé à une température de référence pour atteindre un nombre de réductions décimales du microorganisme d'intérêt. La température de référence pour la pasteurisation des produits non acides est de 70°C. Une VP 100 correspond à un barème de 100 min à 70°C, (ou 10 min/80 °C, 1 min/90°C).

¹⁸ Produit Alimentaire Intermédiaire

production de foie gras cuit. Mais son action sera limitée dans le cas de barèmes inférieurs aboutissant à un foie gras cuit et *a fortiori* mi-cuit. Toutefois, les conditions de la production de toxine ne seront pas réunies dans les conditions attendues de conservation (application rigoureuse d'une chaîne du froid) et de consommation rapide des restes du produit (réfrigérés également).

Conclusion sur les points clés de maîtrise

Les points clés de maîtrise concernent la qualité des matières premières qui va dépendre du statut des animaux et des conditions d'abattage et d'obtention des foies. La chaîne du froid doit être maîtrisée tout au long du processus de transformation empêchant toute hypothétique toxinogénèse. Les traitements thermiques envisagés doivent permettre l'inactivation de la toxine dans les foies pour le cuit, mais pas pour le mi-cuit.

■ Salaison de volailles (saucisson sec de poulet)

Le procédé de fabrication des saucissons secs de volailles est identique à celui des saucissons secs à base de viande porcine ou bovine. Les viandes présentant des évolutions *post mortem* anormales ne peuvent pas être utilisées pour la fabrication de ces produits.

Les principales étapes de fabrication sont les suivantes : la préparation de la mêlée, l'embossage, l'étuvage (ou fermentation) et le séchage (Arnaud, Santchurn et Collignan 2014).

La mêlée est obtenue par hachage de viande désossée de poulet avec peau (80-90%) et de gras (7-15%) auxquels des additifs sont ajoutés (sel 1,5%-3%, nitrate/nitrite, épices), et le tout est homogénéisé. L'activité de l'eau (a_w) du produit est élevée, comprise entre 0,97 et 0,98 (Arnaud, Santchurn et Collignan 2014). La mêlée est ensuiteensemencée par un mélange de ferments (staphylocoques et bactéries lactiques) puis embossée dans des boyaux artificiels (cellulose) pour les saucissons pur volailles. La surface du produit peut être ensemencée par trempage dans une suspension de spores de *Penicillium* sp. (*Penicillium candidum* et *Penicillium nalgiovensis*).

Les produits sont ensuite étuvés pendant 72 h à des températures variant de 6°C à 22°C à une humidité relative de 85 à 90%. Cette étape permet la multiplication des bactéries lactiques. Les glucides ajoutés sont catabolisés par les bactéries lactiques en acide lactique, ce qui conduit à une acidification de la mêlée. La vitesse d'acidification dépend de la nature du ferment, et de la concentration en sucre, de la température de l'étuvage. A la fin de cette étape le pH doit être inférieur à 5,3.

Le produit est ensuite séché à 14°C pendant 18 jours à une humidité relative de 75%. Le séchage permet d'obtenir un produit stabilisé dont l' a_w finale se situe entre 0,85 et 0,86. La valeur de pH est comprise entre 4,8 et 5,7 (idéalement inférieure à 5,3) selon le ferment utilisé.

Pour les *C. botulinum* du groupe III, la croissance prédite pour une durée de fermentation de 48h est inférieure à 0,3 log₁₀ (moins d'un doublement) pour une activité de l'eau de 0,975 à 20°C et un pH de 5,6¹⁹. Pour les formes non-protéolytiques, la probabilité de croissance est estimée à moins de 0,001 pour les concentrations en sel de 3% dans la phase aqueuse. Merialdi *et al.* (2016) ont rapporté qu'aucune croissance et aucune production de toxine n'ont eu lieu dans des viandes salées et présentant des activités de l'eau inférieures à 0,97 inoculées avec des souches de *C. botulinum* protéolytiques et non protéolytiques.

Conclusion sur les points-clés de maîtrise

Les conditions de température, de pH, d'activité de l'eau et de sel sont des facteurs clefs dans la maîtrise de *C. botulinum* lors de la fabrication des salaisons de volailles.

¹⁹ D'après le logiciel Combase Predictor www.combase.cc

3.5 Filière ponte

3.5.1 Introduction

L'œuf en coquille est le produit de la ponte, selon le règlement (CE) n°589/2008 « il est produit par des poules de l'espèce *Gallus gallus* et est propre à la consommation humaine en l'état ou à la préparation de produits à base d'œufs ». Le terme « œuf » désigne donc toujours l'œuf de poule propre à la consommation humaine, il doit être suivi du nom de l'espèce lorsqu'il provient d'un autre oiseau. On distingue classiquement trois compartiments : le jaune, le blanc et la coquille. Le jaune (30 % du poids) est entouré d'une membrane cellulaire, fine et transparente : la membrane vitelline connectée à la couche chalazifère. Le blanc (60 %) ou albumen n'est pas un milieu homogène, il est généralement formé de quatre couches distinctes : (i) le blanc liquide externe, (ii) le blanc épais, (iii) le blanc liquide interne et (iv) les chalazes. Les deux chalazes, en liaison avec la membrane vitelline et les deux extrémités de l'œuf, assurent le maintien du jaune en position centrale. La coquille présente, de l'extérieur vers l'intérieur : la cuticule, la couche calcifiée et les membranes coquillères. La coquille est traversée de plusieurs milliers de canaux (pores) permettant les échanges gazeux (et la respiration de l'embryon). La cuticule, tant qu'intègre, s'opposera à la pénétration dans l'œuf de corps pouvant passer à travers les pores. Le jaune a une densité plus faible que le blanc et va donc « flotter » sur ce dernier, ce qui permettra de les séparer plus facilement en casserie. Son pH est relativement stable au cours de la conservation passant de 6 (œuf frais) à 6,8 (œuf vieux). Le blanc possède un point cryoscopique légèrement différent de celui du jaune (-0,4 vs -0,5 °C) et son pH varie de 2 unités au cours de sa conservation (de 7,4 à 9,4), alcalinisation suite à la diffusion du CO₂ à travers les pores de la coquille.

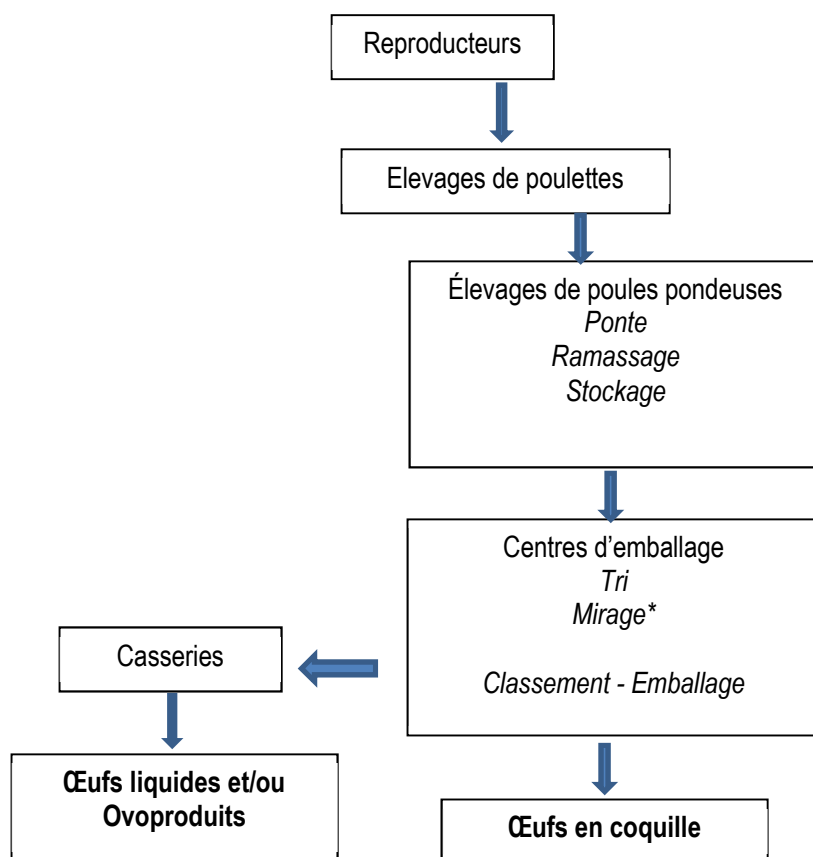


Figure 17 : Schéma simplifié de l'organisation de la filière « œufs »
*méthode d'observation par transillumination

Elevage

Il existe une grande diversité dans la structure et le mode d'organisation des élevages de poules pondeuses. La majeure partie de la production se situe en Bretagne, devant les Pays-de-la-Loire, même si de très grosses structures de production sont situées en Ile de France. Le GT s'attachera à décrire succinctement un élevage « standard » représentatif des grosses structures. Le plus souvent les bâtiments où se déroule la ponte sont équipés de nids d'où les œufs roulent vers un tapis de collecte. Le tapis convoyeur fait converger les œufs vers une salle dite de collecte. Dans cette salle, les œufs sont triés, éventuellement calibrés suivant leur poids et sont distribués dans des alvéoles de 30 places (faites de cartons ou plastique). Si le centre d'emballage est délocalisé, une étape de transport des alvéoles palettisées est à considérer entre la collecte et le centre d'emballage.

Centres d'emballage

Les centres d'emballage sont des établissements agréés permettant d'effectuer diverses opérations. En particulier, ils seront responsables de la qualité, de la salubrité, de la sécurité et de la traçabilité des œufs qu'ils mettent sur le marché. L'activité d'un centre consiste à classer les œufs par catégorie de qualité et de poids, à marquer et emballer les œufs, puis les conditionner et assurer la traçabilité amont et aval.

Casseries

Les casseries sont des établissements industriels permettant la production d'œuf liquide (= le contenu non transformé de l'œuf après enlèvement de la coquille) ou la production d'ovoproduits (activité de transformation d'œufs). Ces deux types de production nécessitent des agréments distincts mais peuvent avoir lieu dans le même établissement. Les ovoproduits²⁰ sont définis dans le règlement (CE) n°853/2004, une transformation d'œufs n'inclut pas forcément un traitement thermique (œufs marinés, œufs de 100 ans).

3.5.2 Collecte-transport-conditionnement : analyse des voies de contamination des œufs

A ce stade, la contamination des coquilles, essentiellement par des spores de *C. botulinum*, peut être directe par contact avec les fientes des poules et/ou secondaire par contact avec un matériel (tapis principalement) contaminé par ces déjections. Ce risque de contamination directe ou secondaire ne peut être exclu mais apparaît faible compte-tenu de la mise en place de bonnes pratiques d'hygiène et de production. Le maintien d'une atmosphère (humidité et température) prévenant tout phénomène de condensation à la surface de la coquille est visé. L'humidité en surface de la coquille favorise la diffusion du danger microbiologique à l'intérieur de l'œuf. Pour le manipulateur, les bonnes pratiques de production, quand elles sont mises en œuvre, sont de nature à limiter le risque de contamination manuportée. Une attention particulière peut être portée au recyclage des alvéoles, mais la prise en compte du risque de transmission bactérienne dans cette filière a permis de mettre en place des plans de nettoyage et de désinfection décrits dans le guide de bonnes pratiques et contrôlés par les services de l'État. L'intégration d'une évaluation de l'efficacité contre les spores bactériennes, même partielle, des procédés de décontamination utilisés serait une avancée dans la maîtrise du risque de contamination microbiologique à ce stade de la production.

3.5.3 Transformation

Comme vu plus haut, un ovoproduit est le résultat de la transformation des œufs coquilles et ce terme est généralement réservé aux denrées destinées à la consommation humaine. La transformation implique une modification substantielle du produit "matière première" qui perd ses caractéristiques d'œuf frais cru, sinon, on parlera d'œuf liquide. Il s'agira, le plus souvent, *a minima* d'un traitement thermique qui donnera des produits de 1^{ère} transformation correspondant au blanc, jaune ou œuf entier

²⁰ « ovoproduits » : les produits transformés résultant de la transformation d'œufs ou de leurs différents composants ou mélanges ou d'une nouvelle transformation de ces produits transformés

pasteurisés et vendus sous forme liquide, congelés ou en poudre (PAI). Les œufs durs ou pochés, les ovoproduits cuisinés avec d'autres ingrédients comme les omelettes sont représentatifs de la 2^{ème} transformation et souvent distribués en restauration hors foyer.

Les œufs utilisés pour la fabrication d'ovoproduits proviennent souvent d'élevages spécifiques, hébergeant généralement les poules en cages, mais il peut s'agir également « d'excédents structurels de production d'œuf de table » ou d'œufs déclassés (mauvais calibre) dans les centres de conditionnement et d'emballage.

Lavage et décontamination des coquilles

Le lavage et la décontamination des coquilles sont autorisés, mais rarement pratiqués à une grande échelle en France. Ils sont généralement réservés à des fabrications de 2^{ème} transformation qualifiées de « microbiologiquement sensibles » (ile flottante par exemple). Alternativement, il est à noter que la décontamination à sec des coquilles par des flashs de lumière est autorisée en France.

Cassage

Le cassage des œufs se fait de manière individuelle dans des équipements (casseuse) permettant des cadences importantes et, si besoin, la séparation jaune/blanc. À l'issue de cette étape, les jaunes, blancs ou œufs entiers sont filtrés et réfrigérés très rapidement en attente des étapes ultérieures. À ce stade, on peut distinguer la transformation des jaunes et de l'œuf entier de celle des blancs qui subissent, eux, un désucrage²¹, une déshydratation et une pasteurisation basse. La figure 18 présente les principales étapes de transformation.

Les coquilles sont des sous-produits importants de cette filière.

Traitement thermique – Pasteurisation et alternatives

Une pasteurisation est systématiquement appliquée aux œufs transformés entiers et aux fractions blanc et jaune. Celle-ci sera de faible intensité pour éviter la coagulation des protéines de l'œuf. Ainsi, pour les jaunes et l'œuf entier, des barèmes d'environ 66°C pendant 2 à 6 min sont appliqués, contre 57°C pendant 2 à 5 min pour les blancs. Ce dernier barème paraît limité, il conviendrait alors de parler plutôt de traitement thermique que de pasteurisation. Nonobstant, ce traitement intervient en complément de propriétés antimicrobiennes intrinsèques du blanc. En revanche, dans les deux cas, les barèmes sont insuffisants vis-à-vis de spores bactériennes, justifiant la stabilisation par conservation au froid (positif ou négatif) des produits ou le recours au séchage par atomisation.

L'ionisation (quelle que soit la source d'énergie électrique ou radioactive) peut également constituer une alternative au traitement thermique pour les blancs (liquides, déshydratés ou congelés). Ainsi, il existe une autorisation de traitement de ces produits (dose maximale de 4 kGy) depuis 1990 en France.

Œufs durs – Œufs en barre

Les œufs, entreposés plusieurs jours (évolution du pH du blanc), sont cuits dans leur coquille dans de l'eau bouillante pendant 13 à 20 min selon le calibre. Après refroidissement, les œufs sont écalés et conditionnés sous atmosphère modifiée ou, le plus souvent, en saumure acide (pH 5,2 à 5,6). Les coquilles sont des sous-produits importants (au moins d'un point de vue volume et économique) de cette filière. La fabrication d'œufs en barre fut une innovation de cette filière dans les années 80. Elle nécessite la séparation préalable du jaune et du blanc. Ce dernier est coagulé en tube avant que le jaune soit coulé à l'intérieur pour une deuxième cuisson et l'obtention d'une barre avec le jaune bien centré. Les durées de vie de ces deux types de produits (réfrigérés) sont de l'ordre de 3 à 4 semaines.

²¹ Diminution du glucose endogène par oxydation en acide gluconique (ajout de préparation enzymatique). L'objectif est de diminuer le brunissement dû à la formation de produits de la réaction de Maillard qui survient lors d'étapes de chauffage (pasteurisation, séchage et stockage des poudres de blancs d'œufs).

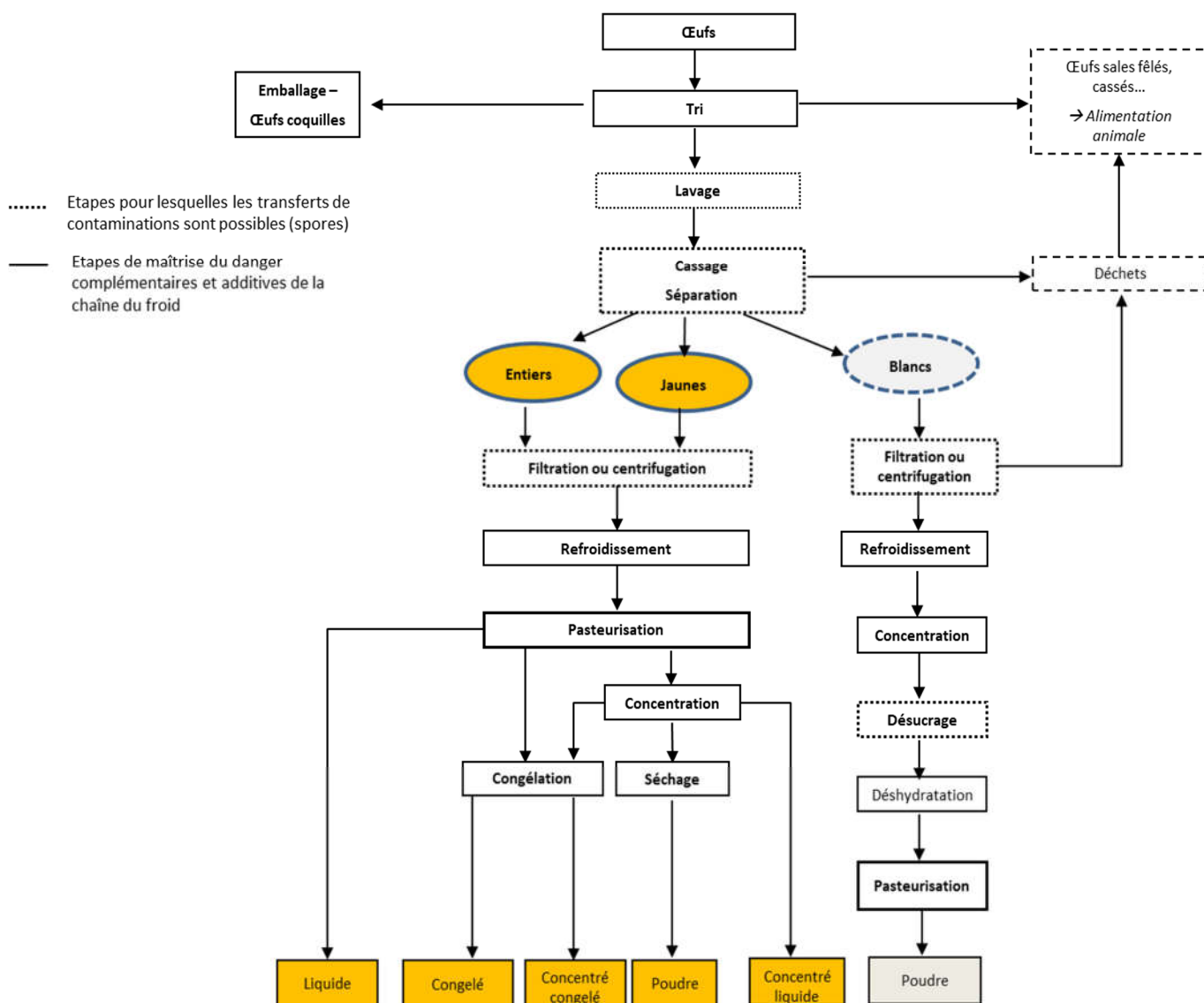


Figure 18 : Diagramme simplifié de transformation des ovoproduits

Points clés de maîtrise en transformation

La contamination des produits dans cette filière va concerner essentiellement les coquilles, et sera représentée par des spores de *C. botulinum*. Comme vu préalablement, cette contamination (directe ou indirecte) ne peut être exclue mais apparaît avec une probabilité inférieure à “peu élevée” (section 3.3). Les points clés de maîtrise vont reposer sur les bonnes pratiques (de production, d’hygiène, de biosécurité, de fabrication) limitant les transferts de contamination des coquilles vers le jaune et le blanc :

- pas de condensation, matériels propres (alvéoles), interventions humaines limitées en élevages ;
- limiter le contact (personnel et matériel) avec les coquilles lors du cassage, matériels propres, interventions humaines limitées, respect des mesures d’hygiène corporelle et vestimentaire des personnels en casseries.

Toute démarche planifiée permettant d’attester de la mise en œuvre de ces Bonnes Pratiques doit être encouragée. Pour les ovoproduits, les traitements thermiques mis en œuvre ne sont pas suffisants pour inactiver les spores. Le point clé de maîtrise sera alors la chaîne du froid qui doit être initiée rapidement lors de la transition post-traitement thermique.

3.6 Efficacité des procédés de traitement des sous-produits de volailles en vue de leur valorisation

3.6.1 Aspects réglementaires

Le règlement (CE) n° 1069/2009 définit les conditions sanitaires de collecte, de transport, d'entreposage, de manipulation, de traitement et de transformation, d'utilisation ou d'élimination des sous-produits animaux non destinés à la consommation humaine ainsi que des produits qui en sont dérivés. Ce règlement classe les sous-produits animaux en trois catégories sur la base de leur risque potentiel pour la santé humaine et animale et l'environnement (C1/C2/C3).

Seules certaines matières de catégorie 3 peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux et ce après application d'un traitement approprié dans des installations de transformation agréées. La liste des sous-produits animaux de catégorie 3 sous-tend un principe majeur du règlement : seuls y figurent ceux issus d'animaux sains, ou ceux au travers desquels ne peuvent être véhiculés des agents de maladies transmissibles à l'Homme ou à l'animal.

Pour les sous-produits de la filière volaille, la liste comprend notamment (article 10 du règlement) :

- les sous-produits animaux d'abattoir (art. 10 a), b), d), et o)),
- les sous-produits animaux issus de l'abattage hors abattoir agréé, pratiqué en annexe d'une exploitation agricole (EANA, art. 10 c)),
- les sous-produits animaux issus de la filière « œufs » (art. 10 k) points ii), iii) et iv)) et
- les cuirs, peaux et phanères (art. 10 n)).

A l'abattoir, seules les matières provenant d'animaux reconnus aptes à la consommation humaine après inspections *ante* et *post mortem* favorables peuvent donc prétendre à la qualité C3. L'application de l'article 10 dans ces établissements est développée en détail dans un guide spécifique à l'usage des exploitants et des inspecteurs²².

A l'abattoir, les sous-produits de volailles valorisables en alimentation animale incluent : têtes de volailles, plumes, sang, pattes, œufs collectés au cours de l'éviscération.

Cas des Œufs

Les seuls sous-produits animaux utilisables en tant que matière première pour fabriquer un ovoproduit destiné à l'alimentation animale sont listés dans le règlement (UE) n° 142/2011 (annexe X, chap. II, section 9) :

- les sous-produits animaux issus de la production d'ovoproduits destinés à la consommation humaine (jus de coquille, issue d'ovoproduit déclassé pour des motifs autres que sanitaires),
- les anciennes denrées alimentaires telles les œufs et ovoproduits, et les œufs et leurs sous-produits animaux provenant d'animaux terrestres,
- les œufs déclassés de la consommation humaine peuvent, s'ils ont été transformés au sens du règlement (CE) n° 852/2004, être destinés à l'alimentation animale comme prévu au règlement (UE) n° 142/2011 (annexe X, chap. II, section 10).

Les œufs souillés, fêlés ou cassés et déclarés impropres à la consommation humaine au centre de conditionnement voire dans l'élevage sont classés en catégorie 3 dès lors qu'ils proviennent d'animaux ne présentant pas de signes cliniques de maladies transmissibles par les œufs à l'Homme ou aux animaux.

²² [2017_guide_tri_sous_produits_abattoir \(2\).pdf](#)

Méthodes de transformation des matières de catégorie 3

Dans le cas général, les matières de catégorie 3 doivent, pour pouvoir être utilisées en alimentation animale, avoir subi une transformation dans une usine agréée au titre du règlement (CE) n°1069/2009. Des exceptions existent à ce principe.

Le règlement (CE) n°142/2011 définit sept méthodes de transformation normalisées dans son annexe IV chapitre 3. Les matières de catégorie 3 doivent être transformées conformément à l'une des méthodes de transformation 1 à 5 (Tableau 6) ou à la méthode de transformation 7 (dans le cas de matières provenant d'animaux aquatiques, une méthode 6 peut également être utilisée).

Dans le cas de la méthode 7, il s'agit de "tout autre procédé autorisé par l'autorité compétente, pour lequel l'exploitant a réalisé une analyse des dangers et démontré la capacité du procédé à les maîtriser". Cette démonstration s'appuie notamment sur le respect pendant 30 jours de production de critères microbiologiques ciblant *C. perfringens* (après l'application du procédé) et *Salmonella* et *Enterobacteriaceae* sur le produit final pendant l'entreposage.

Tableau 6 : Barèmes prévus par le règlement (CE) n°142/2011 pour les méthodes 1 à 5

Méthode	Taille maximale des particules	Températures min	Durées	Pression
1	50 mm	133°C	20 min	3 Bars
2	150 mm	100 °C et 110 °C et 120 C	125 min 120 min 50 min	
3	30 mm	100°C et 110°C et 120°C	95 min 55min 13min	
4	30 mm	100 °C et 110 °C et 120°C et 130 °C	16 min 13 min 8 min 3 min	
5	20 mm	80°C et 100°C	120 min 60 min	

Il est important de noter que toutes les combinaisons temps/température prévues pour une méthode sont appliquées aux sous-produits animaux mis en transformation sur la ligne, selon diverses modalités. La diversité des profils d'évolution des températures dépendra à la fois des équipements utilisés et des produits traités, notamment la taille maximale des particules le composant.

Les produits issus de cette filière de transformation sont en majorité des protéines animales transformées (PAT), des graisses fondues, des matières laitières et des aliments pour animaux de compagnie. En 2019, le débouché principal des PAT de volailles était l'alimentation des animaux de compagnie (*petfood*)²³. Depuis septembre 2021, les PAT de volailles sont autorisées pour l'alimentation des porcs.

3.6.2 Efficacité des procédés de traitement des sous-produits animaux

Les profils des méthodes 2, 3, 4 et 5 ont été utilisés pour prédire les niveaux d'inactivation pour *C. botulinum* de type C (selon les valeurs de D_{120} et z rapportées dans le rapport du GT socle), pour *C. botulinum* de type B, C, D et E (valeurs proposées par van Asselt et Zwietering (2006)) et pour *C. perfringens* (selon van Asselt et Zwietering (2006)). Pour ces deux derniers cas, la borne supérieure de

²³ Réponse du Syndicat des Industries Françaises des Coproduits (SIFCO) au questionnaire du Groupe de travail « Protéines animales transformées n°2 » (GT PAT 2)

l'intervalle de confiance à 95% des valeurs de D_{120} ont été retenues (c'est-à-dire les valeurs de D correspondant aux souches les plus résistantes).

Le Tableau 7 présente les niveaux d'inactivation pour les différentes méthodes.

Tableau 7 : Réduction logarithmique calculée pour les quatre méthodes normalisées de traitement des sous-produits définies dans le règlement (UE) n°142/2011

	Méthode 2	Méthode 3	Méthode 4	Méthode 5
<i>C. perfringens</i> *	> 9 log10	> 9 log10	> 9 log10	2 log10
<i>C. botulinum</i> BCDE*	> 9 log10	> 9 log10	> 9 log10	9 log10
<i>C. botulinum</i> C	> 9 log10	> 9 log10	> 9 log10	> 9 log10

*D'après les valeurs de D_{120} et de z tirées de van Asselt et Zwietering (2006) correspondant aux souches les plus thermoresistantes (95^{ème} percentile de la valeur de D_{120}).

L'application des procédés tels que préconisée par le règlement (UE) n°142/2011 (méthodes 1 à 5) permettent une inactivation totale des spores de *C. botulinum*. Néanmoins, la plupart des usines de transformation de catégorie 3 en France utilisent une méthode 7, et le GT n'a pas connaissance des procédés utilisés²⁴.

Pour la mise en œuvre des méthodes de transformation 7 sur les sous-produits de la filière volaille, le GT recommande la prise en compte des *C. botulinum* du groupe III dans l'analyse des dangers et, de fait, sa nécessaire maîtrise par les barèmes envisagés dans la méthode.

²⁴ Réponse du Syndicat des Industries Françaises des Coproduits (SIFCO) au questionnaire du Groupe de travail « Protéines animales transformées n°2 » (GT PAT 2)

4 Conclusions du groupe de travail

En France, les foyers de botulisme aviaire sont dus à la toxine de type mosaïque C/D (majoritaire), suivie des types D et D/C. L'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une trentaine de foyers dans les élevages de volailles par an.

Entre 2008 et 2018, l'incidence du botulisme humain est en moyenne de 7,5 foyers/an (trois à 13 foyers) et de 14,5 cas/an (quatre à 25 cas). Les types de toxines botuliques en cause sont les types A et B puis E, occasionnellement F. Aucun foyer/cas de botulisme humain de types C, D ou mosaïques C/D et D/C n'a été recensé en France entre 2008 et 2018.

Il apparaît important dans ce contexte de rappeler la démarche d'évaluation du caractère zoonotique des *C. botulinum* de types C, D et mosaïques réalisée par le GT socle (Anses 2021a). Les données épidémiologiques disponibles permettent d'établir une relation causale entre l'exposition à la toxine botulique et/ou à *C. botulinum* de type C et la survenue de cas de botulisme humain (deux foyers en France (1972) et au Japon (1990), confirmés dont l'un d'origine aviaire rapportés par la littérature internationale). Néanmoins, les sources de contamination de ces deux foyers n'ont pas été formellement confirmées et une incertitude faible demeure sur l'origine zoonotique de ces cas. S'agissant du type D, un seul foyer de botulisme alimentaire a été identifié dans le monde sur la période étudiée (Tchad, 1958), dans lequel l'exposition à la toxine botulique de type D était suspectée. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas de botulisme humain lié aux types C, D, C/D, D/C.

Le GT a procédé à l'évaluation des mesures de maîtrise du danger applicables tout au long de la filière avicole (de l'élevage à la consommation) lors de la détection d'un foyer de botulisme en élevage de volailles en suivant les étapes suivantes :

- évaluation qualitative de la probabilité d'émission du danger dans les tissus animaux (en fonction du statut clinique des animaux) ;
- identification des causes de contamination des animaux, des produits (viandes et œufs) ainsi que l'exposition des opérateurs ;
- évaluation des possibilités de contamination, de croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* de l'élevage à la consommation avec comme point de départ un foyer clinique animal ;
- évaluation de l'efficacité des mesures de maîtrise existantes vis-à-vis du danger (transformation des denrées alimentaires d'origine animale et des sous-produits animaux).

Bien que les volailles puissent être atteintes de botulisme E et A, la majorité des foyers de botulisme aviaire reconnus en France sont de type C/D et les poulets sont, contrairement à d'autres espèces comme les dindes, plus résistants cliniquement aux types D et D/C. L'expertise du GT s'est focalisée principalement sur les types C, C/D, D, D/C. Le type E a été pris en considération pour l'évaluation de l'impact des procédés de transformation.

1. Dans le cas d'un foyer de botulisme aviaire, les produits issus d'animaux (viande, abats, œufs) sont-ils susceptibles de contenir des formes végétatives/spores/toxines de *C. botulinum* ? Comment l'état de santé des animaux influence-t-il le niveau de contamination des produits ?

Les probabilités de présence de *C. botulinum* (cellules, spores, toxine) dans les différentes parties du corps et les œufs des volailles ont été évaluées qualitativement (cf. tableaux 4 et 5) selon deux contextes : celui d'un élevage cliniquement atteint de botulisme et celui d'un élevage apparemment indemne mais incriminé comme étant la source de contamination d'élevages bovins dans le cadre d'une enquête épidémiologique.

Dans le cas d'un élevage cliniquement atteint (foyer identifié), trois catégories de volailles ont été considérées : (1) les volailles sans signes cliniques, (2) les volailles en fin de période d'incubation et (3) les volailles sans signes cliniques dans l'élevage après élimination des malades et traitement antibiotique.

Dans le cas des animaux en provenance d'un lot atteint de botulisme, le système digestif (y compris le foie) et les parties du corps en contact direct avec l'environnement extérieur (pattes, peau, plumes) ont été identifiés comme les plus à risque en termes de contamination par les cellules végétatives, spores ou toxines.

Le portage digestif persiste dans le lot atteint après disparition des signes cliniques. Le foie des volailles malades est l'organe dans lequel *C. botulinum* est le plus régulièrement détecté. Bien que non recherchée en routine dans le foie, la présence de toxine y est également rapportée. Dans un lot atteint de botulisme, après disparition des signes cliniques, la détection de *C. botulinum* dans le foie peut atteindre 60 à 100 % des volailles testées.

Des infections inapparentes sont détectées dans des lots de poulets infectés par *C. botulinum* D/C, toutefois aucune donnée publiée ne fait référence à la détection de la bactérie (ou sa toxine) en dehors du contenu du tube digestif de ces animaux.

Pour ce qui concerne les œufs, le danger est surtout lié à la présence de spores sur la coquille, évaluée avec une probabilité qui ne dépasse pas la qualification de « peu élevée ».

2. Dans la filière avicole, les mesures appliquées de l'élevage à la consommation permettent-elles de maîtriser le danger dans les produits à base d'œufs et de viande ?

- *Quelle seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou des œufs ?*
- *Quels sont les impacts sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés de transformation appliqués sur les produits à base d'œufs et de viande ?*

Au stade de l'élevage, le respect des bonnes pratiques d'élevage et l'application rigoureuse des mesures de biosécurité prenant en compte les différentes sources et véhicules de contamination peuvent permettre de réduire le risque d'introduction et de persistance de *C. botulinum* dans les élevages avicoles. Une mesure importante repose en outre sur une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux, avec l'enlèvement systématique des cadavres de volailles présents dans les bâtiments et les parcours, et leur stockage dans un équipement adapté permettant leur conservation, avant transfert dans un bac d'équarrissage.

Pour prévenir les récurrences fréquentes des foyers de botulisme aviaire dues à la persistance de *C. botulinum* dans l'élevage, un chantier renforcé de nettoyage et désinfection doit être lancé pour décontaminer les bâtiments d'élevage, matériels, abords et parcours. Des mesures sont aussi nécessaires pour traiter les effluents et aliments contaminés.

Bien qu'elle soit possible, la vaccination systématique n'est économiquement envisageable que chez certaines espèces (canards, faisans ou dindes par exemple). Aucun vaccin botulique destiné aux volailles ne dispose néanmoins d'AMM en France.

Dans la filière « volailles de chair »

Du transport à l'abattage, toutes les étapes du processus (jusqu'à l'enlèvement du tube digestif) entraînant l'excrétion sont considérées comme des étapes clés au regard du transfert des *C. botulinum* vers la peau ou le muscle. Après l'étape d'éviscération, les contaminations sont généralement qualifiées d'indirectes, par contact entre carcasses et/ou contact de la carcasse avec une surface contaminée (équipement, matériel, opérateurs...). Bien que non spécifiques à *C. botulinum*, les mesures de biosécurité en élevages ainsi que les Bonnes Pratiques Hygiéniques d'abattage sont de nature à limiter

ce type de contaminations. En l'absence de CCP (*Critical Control Point*), toutes les démarches permettant d'attester de leur mise en place et de leur efficacité doivent être encouragées.

Lorsque le statut du lot est connu (*i. e.* élevage dans lequel le botulisme a été diagnostiqué), la séquence transport-abattage doit être effectuée de manière logistique (*i. e.* préférentiellement en fin de journée et avant une opération de nettoyage et de désinfection renforcée utilisant un produit sporicide) afin de limiter les transferts de contamination entre lots et vers les surfaces. Le GT recommande d'exclure de la consommation humaine les foies et autres abats issus de ces lots.

Les possibilités de contamination, croissance et de toxinogénèse de *C. botulinum* des types C, D, mosaïques, et E (non protéolytique) ont été évaluées au cours de la transformation de trois types de produits de deuxième et troisième transformation : produits crus à cuire (foies de volaille et escalope de poulet), produit cuit/appertisé (foie gras [cuit / mi-cuit]) et une salaison de volailles (ex : saucisson sec de poulet) (section 3.4.2 du rapport). Cette sélection a permis d'illustrer l'impact de différents procédés de transformation et de mesures de maîtrise sur *C. botulinum* : maîtrise de la chaîne du froid, traitement thermique, séchage, ajout de sel et de conservateurs.

La conception hygiénique des ateliers et des équipements utilisés, ainsi que l'organisation des activités de découpe sur la base de bonnes pratiques d'hygiène et de la démarche HACCP sont de nature à maîtriser les transferts des spores éventuellement présentes, leur germination, croissance ainsi que la production de toxines.

L'application rigoureuse de la chaîne du froid tout au long du processus de transformation puis lors de la conservation des viandes est un point clé de la maîtrise de la croissance et de la toxinogénèse de *C. botulinum*.

S'agissant de l'impact des traitements thermiques, les barèmes retenus pour les produits considérés permettent :

- l'inactivation totale des cellules végétatives et l'inactivation partielle des toxines (totale à partir 90°C/2min ou traitement équivalent) (foies frais, foie gras mi-cuit) ;
- l'inactivation des spores, des cellules et des toxines (foie gras cuit selon un barème minimal de 110°C / 20 min ou traitement équivalent).

Les conditions de température, de pH, d'activité de l'eau et de sel sont des facteurs clefs dans la maîtrise de *C. botulinum* lors de la fabrication des salaisons de volailles.

Dans la filière œufs et ovoproduits

Les points clés de maîtrise vont reposer sur les bonnes pratiques (de production, d'hygiène, de biosécurité, de fabrication) limitant les transferts de contamination depuis la coquille jusqu'au jaune et au blanc. Toute démarche planifiée permettant d'attester de la mise en œuvre de ces Bonnes Pratiques doit être encouragée. Pour les ovoproduits, les traitements thermiques mis en œuvre ne sont pas suffisants pour inactiver les spores. Le point clé de maîtrise sera alors la chaîne du froid qui doit intervenir rapidement lors de la transition post-traitement thermique.

3. La manipulation en abattoir des carcasses issues d'animaux d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvus de signes cliniques, présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?

A chacune des étapes du processus d'abattage, le GT a procédé à l'identification exhaustive des différentes possibilités d'exposition professionnelle au regard des principaux modes de transmission :

- inoculation suite à une blessure profonde par les becs, griffes, éperon, coupure avec des objets contaminés ;
- ingestion manuportée (port à la bouche des mains ou d'objets contaminés) ;
- inhalation de poussières sur le lieu de travail.

L'exposition professionnelle des opérateurs tout au long de la séquence poulailler-abattoir concerne les éleveurs, les ramasseurs, les chauffeurs et les intervenants sur chaîne. Il convient de noter qu'au regard des modes de transmission considérés, les personnes les plus exposées sont les éleveurs et les ramasseurs.

Toutes les possibilités d'exposition professionnelle ont été présentées, même si leur survenue est hautement improbable. En effet, le contexte épidémiologique se traduit par l'absence de cas rapporté de botulisme en milieu professionnel tant en élevage qu'à l'abattoir, contrairement à d'autres maladies (cas de la chlamydie aviaire). Cela pourrait s'expliquer par le fait que la présence à l'abattoir de ce type d'animaux est peu fréquente, et/ou que les bonnes pratiques d'hygiène et d'abattage sont suffisantes pour limiter l'exposition des opérateurs.

Botulisme par inoculation

Il est très improbable que les blessures infligées par les animaux vigiles, souvent superficielles, soient suffisamment profondes pour créer des conditions d'anaérobiose permettant, après la germination de spores de *C. botulinum*, la production de toxine et la survenue d'un botulisme chez les ramasseurs et les accrocheurs qui doivent être équipés systématiquement d'EPI et de gants épais notamment.

Toute manipulation d'objet coupant/piquant peut être considérée comme une voie potentielle d'exposition par inoculation suite à une blessure ou une coupure avec un objet possiblement contaminé. L'utilisation d'outils individuels serait responsable de 15 % des accidents à l'abattoir (Ministère du travail 2009). Les mesures de protection appliquées à l'abattoir permettent de limiter le risque de botulisme par coupure. Dans tous les cas, il convient d'attirer l'attention sur la nécessité de désinfecter très soigneusement toutes les blessures chez les travailleurs et recouvrir toute plaie non cicatrisée.

Botulisme par inhalation

Les personnes les plus exposées aux aérosols durant la séquence poulailler-abattoir sont les ramasseurs, les accrocheurs et les opérateurs en charge du nettoyage sous pression des équipements (p. ex. plumeuse). L'exposition de ces personnes sera également dépendante de la conception des locaux (poulaillers, salle d'accrochage).

La nécessité qu'une grande quantité de toxine soit effective au niveau des muqueuses nasales des travailleurs en abattoir rend très improbable un botulisme par inhalation. L'inhalation seule de spores ne causera pas cette forme de botulisme. Les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination et à la production de toxine ne sont pas en place dans les voies respiratoires supérieure et inférieure. Suite à l'inhalation de spores, il peut y avoir remontée par l'escalator mucociliaire puis déglutition de celles-ci. Seul un botulisme infectieux de l'adulte pourrait être envisagé par ce mécanisme. Les conditions médicales prédisposant à un botulisme infectieux de l'adulte sont incompatibles avec le travail à l'abattoir.

Botulisme suite à l'ingestion de toxines (manuportées)

Les toxines provenant d'un animal en incubation pourraient être ingérées par les opérateurs par l'intermédiaire de mains souillées. L'application des BPH (le lavage des mains en particulier) permet de maîtriser ce risque, de même que le port de gants (et leur changement fréquent) au poste de vérification de l'éviscération et lors de la manipulation des foies.

4. Quel est l'impact sur *C. botulinum* (formes végétatives, spores et toxines) des procédés appliqués pour la valorisation de sous-produits animaux destinés à l'alimentation des animaux ? (plumes, sang, pattes, tête, viscères...).

Le règlement CE) n°1069/2009 classe les sous-produits animaux en trois catégories sur la base de leur risque potentiel pour la santé humaine et animale et l'environnement (C1/C2/C3). Seules certaines matières de catégorie 3 peuvent être utilisées dans l'alimentation des animaux et ce après application d'un traitement approprié dans des installations de transformation agréées.

Les sous-produits de volailles valorisables en alimentation animale incluent : têtes de volailles, plumes, sang, pattes, œufs collectés au cours de l'éviscération, œufs déclassés, sous-produits de la filière ovoproducts.

Les matières de catégorie 3 issues de volailles doivent être transformées conformément à l'une des méthodes définies dans le règlement (UE) n°142/2011 (méthodes 1 à 5 cf. tableau 6, ou méthode 7). Dans le cas de la méthode 7, il s'agit de "tout autre procédé autorisé par l'autorité compétente, pour lequel l'exploitant a réalisé une analyse des dangers et démontré la capacité du procédé à les maîtriser".

L'application des procédés selon les méthodes 1 à 5 permettent une inactivation totale des spores de *C. botulinum*. La plupart des usines de transformation de catégorie 3 en France utilisent une méthode 7, et le GT n'a pas connaissance des procédés utilisés.

La valorisation en alimentation animale des sous-produits issus des lots qui ont été cliniquement atteints nécessiterait l'application d'un traitement physique permettant l'inactivation des spores de *C. botulinum*.

Les principales sources d'incertitudes ainsi que les modalités de leur prise en compte par le GT sont présentées en annexe 3. Le GT émet des recommandations pour l'acquisition de données concernant plus particulièrement les points suivants :

- des recherches du danger dans les prélèvements autres que le foie, le sérum et le contenu du tube digestif en particulier pour des animaux sans signes cliniques ;
- l'effet des traitements physiques de conservation des aliments au regard des différentes formes de *C. botulinum* (à confirmer en matrices alimentaires).

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : 29 novembre 2021

5 Bibliographie

- ACMSF. 2020. "(Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) Subgroup on non-proteolytic *Clostridium botulinum* and vacuum and modified atmosphere packaged foods. Final report. <https://acmsf.food.gov.uk/acmsfreps/acmsfreports>." ACMSF.
- AFSSA. 2002. *Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine*. AFSSA (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT-Ra-Botulisme.pdf>.
- AFSSA. 2009. *Avis du 14 janvier 2009 sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire* <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2008sa0334.pdf>.
- Agreste. 2020. *Bilan conjoncturel 2020* <https://agreste.agriculture.gouv.fr/agreste-web/disaron/BilanConj2020/detail/>.
- Anderson, J., P. T. Williams, A. M. Katos, M. Krasna, W. Burrows et C. J. Hilmas. 2009. "CHAPTER 30 - Botulinum Toxin." Dans *Handbook of Toxicology of Chemical Warfare Agents*, édité par Ramesh C. Gupta, 407-432. San Diego: Academic Press.
- Anniballi, F., B. Auricchio, E. Delibato, M. Antonacci, D. De Medici et L. Fenicia. 2012. "Multiplex real-time PCR SYBR Green for detection and typing of group III *Clostridium botulinum*." *Vet Microbiol* 154 (3-4): 332-8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.07.018>.
- Anniballi, F., B. Auricchio, C. Woudstra, P. Fach, A. Fiore, H. Skarin, L. Bano, B. Segerman, R. Knutsson et D. De Medici. 2013. "Multiplex real-time PCR for detecting and typing *Clostridium botulinum* group III organisms and their mosaic variants." *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1 (Suppl 1): S207-14. <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0084>.
- Anniballi, F., A. Fiore, C. Löfström, H. Skarin, B. Auricchio, C. Woudstra, L. Bano, B. Segerman, M. Koene, V. Båverud, T. Hansen, P. Fach, A. Tevell Aberg, M. Hedeland, E. Olsson Engvall et D. De Medici. 2013. "Management of animal botulism outbreaks: from clinical suspicion to practical countermeasures to prevent or minimize outbreaks." *Biosecur Bioterror* 11 Suppl 1: S191-9. <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0089>.
- Anses. 2017. *Illustrations et actualisation des recommandations pour l'évaluation du poids des preuves et l'analyse d'incertitude à l'Anses*. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AUTRE2015SA0089Ra-2.pdf>.
- Anses. 2019. Fiche-outil relative à la réalisation de documents synthétiques à destination des tutelles et des rédacteurs de GBPH : Eléments pour évaluer l'efficacité d'un traitement thermique sur la contamination microbiologique des aliments.
- Anses. 2020. *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "Clostridium botulinum, Clostridium neurotoxigènes"*. Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0074Fi.pdf>.
- Anses. 2021a. *Clostridium botulinum : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E* <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0112Ra.pdf>.
- Anses. 2021b. *Evaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme (saisine 2019-SA-0112)* (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0112Ra-1.pdf>.
- Anses. 2022. *Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui sur la décontamination et les mesures de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire (saisine 2019-SA-0113)*
- Anza, I., D. Vidal, J. Feliu, E. Crespo et R. Mateo. 2016. "Differences in the Vulnerability of Waterbird Species to Botulism Outbreaks in Mediterranean Wetlands: an Assessment

- of Ecological and Physiological Factors." *Appl Environ Microbiol* 82 (10): 3092-9. <https://doi.org/10.1128/aem.00119-16>.
- Arnaud, E., S. J. Santchurn et A. Collignan. 2014. "Fermented Poultry Sausages." Dans *Handbook of Fermented Meat and Poultry*, 329-338.
- Arnon, S. S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat et f. t. W. G. o. C. Biodefense. 2001. "Botulinum Toxin as a Biological Weapon Medical and Public Health Management." *JAMA* 285 (8): 1059-1070. <https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059>.
- Bano, L., I. Drigo, E. Tonon, F. Agnoletti, D. Giovanardi et E. Morandini. 2013. "Rice hulls as a possible source of *Clostridium botulinum* type C spores for poultry." *Vet Rec* 173 (17): 427-8. <https://doi.org/10.1136/vr.f6521>.
- Barash, J. R. et S. S. Arnon. 2014. "A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxins." *J Infect Dis* 209 (2): 183-91. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit449>.
- Bernardor, J., J. Neveu, H. Haas, G. Pitelet, M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Bérard, C. Boulay et B. Chabrol. 2018. "Infant botulism: Two case reports and electroneuromyogram findings." *Archives de Pédiatrie* 25 (5): 340-343.
- Birch, T. B. et T. P. Bleck. 2019. "Botulism (*Clostridium botulinum*)." Dans *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases (9th Edition)*, édité par John E. Bennett, Raphael Dolin et Martin J. Blaser. Philadelphia: W.B. Saunders.
- Björnstad, K., A. Tevell Åberg, S. R. Kalb, D. Wang, J. R. Barr, U. Bondesson et M. Hedeland. 2014. "Validation of the Endopep-MS method for qualitative detection of active botulinum neurotoxins in human and chicken serum." *Anal Bioanal Chem* 406 (28): 7149-61. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8170-4>.
- Black, E. P., P. Setlow, A. D. Hocking, C. M. Stewart, A. L. Kelly et D. G. Hoover. 2007. "Response of spores to high-pressure processing." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 6 (4): 103-119.
- Blomqvist, G., H. Skarin, A. Lindberg, V. Båverud et B. Engström. 2009. "Surveillance for *Clostridium botulinum* type C or C/D in Swedish broilers." The 16th World Vet Poultry Congress.
- CAC, C. d. C. A. 2007. Principles and guidelines for the conduct of microbiological risk management CAC/GL 63-2007. Annex I suggested elements to include in a microbiological risk profile.
- Carlin, F. 2011. "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiology* 28 (2): 177-182. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.008>.
- Clouston, J. G. et P. A. Wills. 1969. "Initiation of germination and inactivation of *Bacillus pumilus* spores by hydrostatic pressure." *J Bacteriol* 97 (2): 684-90. <https://doi.org/10.1128/jb.97.2.684-690.1969>.
- CNPO. "Filière Oeufs : les chiffres clés." <https://oeuf-info.fr/infos-filiere/les-chiffres-cles/>.
- Coffield, J. A., N. Bakry, R. D. Zhang, J. Carlson, L. G. Gomella et L. L. Simpson. 1997. "In vitro characterization of botulinum toxin types A, C and D action on human tissues: combined electrophysiologic, pharmacologic and molecular biologic approaches." *J Pharmacol Exp Ther* 280 (3): 1489-98.
- Connan, C., C. Deneve, C. Mazuet et M. R. Popoff. 2013. "Regulation of toxin synthesis in *Clostridium botulinum* and *Clostridium tetani*." *Toxicon* 75: 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.001>.
- DasGupta, B. R. 2006. "Botulinum neurotoxins: perspective on their existence and as polyproteins harboring viral proteases." *J Gen Appl Microbiol* 52 (1): 1-8. <https://doi.org/10.2323/jgam.52.1>.

- Desmonts, M. H., A. Strasser, C. Hasselmann, E. Marchioni et F. Hausser. 2001. "Traitements ionisants des aliments." Dans *Traitements ionisants et hautes pressions des aliments*, édité par Federighi M. & Tholozan J.L., 21 - 149. Paris: Polytechnica.
- Diao, M. M., S. Andre et J. M. Membre. 2014. "Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679." *Int J Food Microbiol* 174: 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029>.
- Dohms, J. E. 2008. *Botulism*. Edité par Y Saif. *Diseases of Poultry*, édité par Oxford Blackwell Publishing Ltd., UK.
- Dohms, J. E., P. H. Allen et J. K. Rosenberger. 1982. "Cases of type C botulism in broiler chickens." *Avian diseases*: 204-210.
- Dowling, L. 1992. "Ionophore toxicity in chickens: A review of pathology and diagnosis." *Avian Pathology* 21 (3): 355-368. <https://doi.org/10.1080/03079459208418854>.
- Dressler, D., K. Kollewe, T. H. C. Kruger, N. Gade, S. Sikorra et H. Bigalke. 2019. "Botulinum toxin type D blocks autonomic cholinergic synapses in humans: discussion of a potential therapeutic use." *Journal of Neural Transmission* 126 (10): 1337-1340. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02029-5>.
- Dürre, P. 2014. "Physiology and Sporulation in *Clostridium*." *Microbiology Spectrum* 2 (4). <https://doi.org/doi:10.1128/microbiolspec.TBS-0010-2012>.
- Eleopra, R., C. Montecucco, G. Devigili, C. Lettieri, S. Rinaldo, L. Verriello, M. Pirazzini, P. Caccin et O. Rossetto. 2013. "Botulinum neurotoxin serotype D is poorly effective in humans: An in vivo electrophysiological study." *Clinical Neurophysiology* 124 (5): 999-1004. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.clinph.2012.11.004>.
- Eleopra, R., V. Tugnoli, O. Rossetto, C. Montecucco et D. De Grandis. 1997. "Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human." *Neuroscience Letters* 224 (2): 91-94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13448-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13448-6).
- Espelund, M. et D. Klaveness. 2014. "Botulism outbreaks in natural environments - an update." *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00287>.
- Federighi, M., M. Vidon, J. F. Mescle et M. F. Pilet. 1995. "Traitement hautes pressions et denrées alimentaires : revue bibliographique. I: Le matériel, le procédé et ses effets sur les composants des aliments; High pressure treatment of food : an overview. I: Material, process and effects on food constituents." *M.A.N. Microbiologie, aliments, nutrition* 13 (2): 115-126.
- Fillo, S., F. Giordani, E. Tonon, I. Drigo, A. Anselmo, A. Fortunato, F. Lista et L. Bano. 2021. "Extensive Genome Exploration of *Clostridium botulinum* Group III Field Strains." *Microorganisms* 9 (11): 2347.
- Franciosa, G., L. Fenicia, C. Caldiani et P. Aureli. 1996. "PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (4): 882-885.
- Gauvry, E., A. G. Mathot, I. Leguerinel, O. Couvert, F. Postollec, V. Broussolle et L. Coroller. 2017. "Knowledge of the physiology of spore-forming bacteria can explain the origin of spores in the food environment." *Research in Microbiology* 168 (4): 369-378. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2016.10.006>.
- Gominet, M. 2001. "Traitement des denrées alimentaires par rayonnements ionisants." *Techniques de l'ingénieur Opérations unitaires du génie industriel alimentaire* base documentaire : TIB430DUO (ref. article : f3050).
- Gould, G. W. et A. J. Sale. 1970. "Initiation of germination of bacterial spores by hydrostatic pressure." *J Gen Microbiol* 60 (3): 335-46. <https://doi.org/10.1099/00221287-60-3-335>.
- Grecz, N. et L. Arvay. 1982. "Effect of temperature on spore germination and vegetative cell growth of *Clostridium botulinum*." *Applied and Environmental Microbiology* 43: 331 - 337.

- Greenberg, R. A., R. B. Tompkin, B. O. Bladel, R. S. Kittaka et A. Anellis. 1966. "Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in the United States and Canada." *Appl Microbiol* 14 (5): 789-93.
- Gross, W. B. et L. D. Smith. 1971. "Experimental botulism in gallinaceous birds." *Avian diseases*: 716-722.
- Guillier, L. 2017. "Analyse des risques microbiologiques " Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par Guillier L. Naïtali M, Dubois- Brissonet F, In Sciences et techniques agroalimentaire. Paris: Lavoisier Tech & Doc.
- Guillou, S., M. Lerasle, H. Simonin et M. Federighi. 2017. "High-pressure processing of meat and meat products." Dans *Emerging Technologies in Meat Processing*, 37-101.
- Hardy, S. P. et M. Kaldhusdal. 2013. "Type C and C/D toxigenic *Clostridium botulinum* is not normally present in the intestine of healthy broilers." *Veterinary microbiology* 165 (3-4): 466-468.
- Hedeland, M., H. Moura, V. Båverud, A. R. Woolfitt, U. Bondesson et J. R. Barr. 2011. "Confirmation of botulism in birds and cattle by the mouse bioassay and Endopep-MS." *Journal of Medical Microbiology* 60 (9): 1299-1305. <https://doi.org/https://doi.org/10.1099/jmm.0.031179-0>.
- Holzer, E. 1962. "Botulism caused by inhalation." *Medizinische Klinik* 57: 1735-1738.
- Hughes, J. M., J. R. Blumenthal, M. H. Merson, G. L. Lombard, V. R. Dowell Jr et E. J. Gangarosa. 1981. "Clinical features of types A and B food-borne botulism." *Annals of Internal Medicine* 95 (4): 442-445.
- Hyun, S. H. et G. Sakaguchi. 1989. "Implication of coprophagy in pathogenesis of chicken botulism." *The Japanese Journal of Veterinary Science* 51 (3): 582-586.
- ICMSF. 1996. "(International Commission on Microbiological Specifications for Foods). *Clostridium botulinum*." Dans *Micro-organisms in Foods 5. Microbiological Specifications of Food Pathogens*, édité par T. A. Roberts, A. C. Baird-Parker et R. B. Tompkin, 66-111. London: Blackie Academic and Professional.
- INRS. 2017. *Ventilation des postes d'accrochage en abattoir de volailles*. <https://www.inrs.fr/media.html?refINRS=ED%206279>.
- INRS. 2021. "Les risques biologiques." www.inrs.fr/risques/biologiques
- ITAVI. 2020a. "Filière Poules pondeuses - 2020." Consulté le 25 novembre 2021. <https://www.itavi.asso.fr/filieres-poules-pondeuses>.
- ITAVI. 2020b. "Filière Volailles de chair - 2020." Consulté le 25 novembre 2021. <https://www.itavi.asso.fr/filieres-volailles-de-chair>.
- Jang, I., M.-S. Kang, H.-R. Kim, J.-Y. Oh, J.-I. Lee, H.-S. Lee et Y.-K. Kwon. 2014. "Occurrence of avian botulism in Korea during the period from June to September 2012." *Avian diseases* 58 (4): 666-669. <https://doi.org/10.1637/10793-020414-case>.
- Kalchayanand, N., C. P. Dunne, A. Sikes et B. Ray. 2004. "Germination induction and inactivation of *Clostridium* spores at medium-range hydrostatic pressure treatment." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 5 (3): 277-283. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ifset.2004.02.004>.
- Kebbi, Y., A. I. Muhammad, A. S. Sant'Ana, L. do Prado-Silva, D. Liu et T. Ding. 2020. "Recent advances on the application of UV-LED technology for microbial inactivation: Progress and mechanism." *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 19 (6): 3501-3527. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1541-4337.12645>.
- Kim, J. et P. M. Foegeding. 1993. "Principles of control " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 121-176. New York: Marcel Dekker
- King, L. A. 2008. "Two severe cases of botulism associated with industrially produced chicken enchiladas, France, August 2008." *Eurosurveillance* 13 (37): 18978.

- King, L. A., T. Niskanen, M. Junnikkala, E. Moilanen, M. Lindström, H. Korkeala, T. Korhonen, M. R. Popoff, C. Mazuet et H. Callon. 2009. "Botulism and hot-smoked whitefish: a family cluster of type E botulism in France, September 2009." *Eurosurveillance* 14 (45): 19394.
- King, L. A., M. R. Popoff, C. Mazuet, E. Espié et V. Vaillant. 2010. "Infant botulism in France, 1991-2009." *Archives de pediatrie: organe officiel de la Societe francaise de pediatrie* 17 (9): 1288-1292.
- Kohler, L. J., A. V. Quirk, S. L. Welkos et C. K. Cote. 2018. "Incorporating germination-induction into decontamination strategies for bacterial spores." *Journal of Applied Microbiology* 124 (1): 2-14. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/jam.13600>.
- Kudrow, D. B., D. A. Henry, D. A. Haake, G. Marshall et G. E. Mathisen. 1988. "Botulism associated with *Clostridium botulinum* sinusitis after intranasal cocaine abuse." *Annals of internal medicine* 109 (12): 984-985.
- Kurazono, H., K. Shimozawa et G. Sakaguchi. 1987. Experimental botulism in pheasants.
- Le Bouquin, S., C. Le Marechal, V. Ballan, S. Rouxel, D. Leon, L. Balaine, T. Poezevara, E. Houard, B. Robineau, C. Robinault, M. Chemaly et R. Souillard. 2017. "Investigation d'un cas de botulisme aviaire dans un élevage de poules pondeuses plein-air." *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 78: 13-17.
- Le Gratiot, T., T. Poezevara, S. Rouxel, E. Houard, C. Mazuet, M. Chemaly et C. L. Maréchal. 2020. "Development of An Innovative and Quick Method for the Isolation of *Clostridium botulinum* Strains Involved in Avian Botulism Outbreaks." *Toxins (Basel)* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010042>.
- Le Maréchal, C., V. Ballan, S. Rouxel, M. H. Bayon-Auboyer, M. A. Baudouard, H. Morvan, E. Houard, T. Poëzevara, R. Souillard et C. Woudstra. 2016. "Livers provide a reliable matrix for real-time PCR confirmation of avian botulism." *Anaerobe* 38: 7-13.
- Le Maréchal, C., S. Rouxel, V. Ballan, E. Houard, T. Poezevara, M. H. Bayon-Auboyer, R. Souillard, H. Morvan, M. A. Baudouard, C. Woudstra, C. Mazuet, S. Le Bouquin, P. Fach, M. Popoff et M. Chemaly. 2017. "Development and Validation of a New Reliable Method for the Diagnosis of Avian Botulism." *PLoS One* 12 (1): e0169640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0169640>.
- Le Maréchal, C., R. Souillard, Y. Villaggi, G. Kuntz, S. Le Bouquin, A. Scalabrino, K. Ayadi-Akrout, F. Mahé, S. Thomas, M. Chemaly et S. Rautureau. 2021. "Botulisme bovin : importance de la biosécurité pour prévenir les contaminations croisées avec les ateliers de volailles." *Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* 92.
- Le Maréchal, C., C. Woudstra et P. Fach. 2016. *Botulism*. Wiley. ed. *Clostridial Diseases of Animals*, édité par Songer F. A. Uzal, J. G., Prescott, J. F. and Popoff M. R.
- Lenz, C. A., K. Reineke, D. Knorr et R. F. Vogel. 2015. "High pressure thermal inactivation of *Clostridium botulinum* type E endospores - kinetic modeling and mechanistic insights." *Front Microbiol* 6: 652. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00652>.
- Lerasle, M., F. Duranton, H. Simonin, J. M. Membré, R. Chéret, M. De Lamballerie, S. Guillou et M. Federighi. 2012. "Traitements par hautes pressions hydrostatiques des denrées alimentaires : état de l'art " *Revue de Médecine Vétérinaire* 12 (163): 595-614
- Levy, C., X. Aubert, B. Lacour et F. Carlin. 2012. "Relevant factors affecting microbial surface decontamination by pulsed light." *International Journal of Food Microbiology* 152 (3): 168-174. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.022>.
- Levy, C., G. Gatt, M. Busnel, M. Chemaly, M. Coignard et M.-A. Valette. 2009. "Décontamination des œufs coquilles par le procédé de lumière pulsée." Huitièmes Journées de la Recherche Avicole, St Malo, 25 et 26 mars 2009.
- Lindstrom, M., K. Kiviniemi et H. Korkeala. 2006. "Hazard and control of group II (non-proteolytic) *Clostridium botulinum* in modern food processing." *International Journal of Food Microbiology* 108 (1): 92-104. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.11.003>.

- Lindström, M. et H. Korkeala. 2006. "Laboratory diagnostics of botulism." *Clin Microbiol Rev* 19 (2): 298-314. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.298-314.2006>.
- Ludwig, H., C. Bieler, K. Hallbauer et W. Scigalla. 1992. "Inactivation of microorganisms by hydrostatic pressure." Dans *High Pressure and Biotechnology*, édité par C. Balny, R. Hayashi, K. Heremans et P. Masson, 25 - 32 Paris: INSERM and John Libbey.
- Lund, B. M. 1993. "Quantification of factors affecting the probability of development of pathogenic bacteria, in particular *Clostridium botulinum*, in foods." *Journal of Industrial Microbiology* 12 (3-5): 144-155. <https://doi.org/10.1007/bf01584183>.
- Lund, B. M. et S. Notermans. 1993. "Potential hazards associated with REPFEDS." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and Control in Food*, édité par A. H. W. Hauschild et K. L. Dodds, 279-304. New York: Marcel Dekker.
- Lund, B. M. et M. W. Peck. 2013. *Clostridium botulinum*. Edité par R. G. Labbe et S. Garcia. *Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition*.
- MacDonald, K. L., G. W. Rutherford, S. M. Friedman, J. R. Dietz, B. R. Kaye, G. F. McKinley, J. H. Tenney et M. L. Cohen. 1985. "Botulism and botulism-like illness in chronic drug abusers." *Annals of internal medicine* 102 (5): 616-618.
- Margosch, D., M. A. Ehrmann, M. G. Gänzle et R. F. Vogel. 2004. "Comparison of Pressure and Heat Resistance of *Clostridium botulinum* and Other Endospores in Mashed Carrots." *Journal of Food Protection* 67 (11): 2530-2537. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-67.11.2530>.
- Martrenchar, A., F. Djossou, C. Stagnetto, C. Dupuy, E. Brulez, C. Attica, G. Egmann, J. Gruenfeld, J.-M. Fontanella et M.-R. Popoff. 2019. "Is botulism type C transmissible to human by consumption of contaminated poultry meat? Analysis of a suspect outbreak in French Guyana." *Anaerobe* 56: 49-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2019.02.008>.
- Masters, A. M. et D. G. Palmer. 2021. "Confirmation of botulism diagnosis in Australian bird samples by ELISA and RT rtPCR." *J Vet Diagn Invest* 33 (4): 684-694. <https://doi.org/10.1177/10406387211014486>.
- Maupas, P., J. P. Lamagnere, F. Lamisse et J. Laugier. 1976. "Botulisme de Type C. Intérêt de la Recherche de la Toxémie." *Médecine et Maladies Infectieuses* 6 (6): 207-210. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0399-077X\(76\)80079-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0399-077X(76)80079-0).
- Mazuet, C., P. Bouvet, L. A. King et M. R. Popoff. 2011. "Le botulisme humain en France, 2007–2009." *Bull Epidemiol Hebd* 2011: 49-53.
- Mazuet, C., N. Da Silva Jourdan, C. Legeay, J. Sautereau et R. M. Popoff. 2018. "Le botulisme humain en France, 2013–2016." *Bull. Epidemiol. Hebd* 3: 46-54.
- Mazuet, C., C. Legeay, J. Sautereau, L. Ma, C. Bouchier, P. Bouvet et M. R. Popoff. 2016. "Diversity of Group I and II *Clostridium botulinum* Strains from France Including Recently Identified Subtypes." *Genome biology and evolution* 8 (6): 1643-1660. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw101>.
- Mazuet, C., M. R. Popoff, J. Sautereau, C. Legeay et P. Bouvet. 2014. "Le botulisme humain en France, 2010-2012." *Bulletin épidémiologique hebdomadaire* (6): 106-114.
- Membre, J. M., M. Diao, C. Thorin, G. Cordier, F. Zuber et S. Andre. 2015. "Risk assessment of proteolytic *Clostridium botulinum* in canned foie gras." *Int J Food Microbiol* 210: 62-72. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.06.002>.
- Meriardi, G., M. Ramini, G. Parolari, S. Barbuti, M. A. Frustoli, R. Taddei, S. Pongolini, P. Ardigò et P. Cozzolino. 2016. Study on Potential *Clostridium Botulinum* Growth and Toxin Production in Parma Ham. *Italian journal of food safety* 5 (2): 5564. Consulté le 2016/04//. <https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5564>.
- Ministère du travail, d. I. e. e. d. I. i. 2009. "Fiche métier: Abattage et découpe de volaille." Dernière mise à jour 20 août 2021. Consulté le 22 août 2021. <https://travail->

emploi.gouv.fr/archives/archives-courantes/metiers-et-activites/article/abattage-et-decoupe-de-volaille.

- Miyazaki, S. et G. Sakaguchi. 1978. "Experimental botulism in chickens: the cecum as the site of production and absorption of botulinum toxin." *Japanese Journal of Medical Science and Biology* 31 (1): 1-15.
- Moore, R. J. et J. A. Lacey. 2019. "Genomics of the Pathogenic Clostridia." *Microbiol Spectr* 7 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0033-2018>.
- Morris, G. J. 2000. "The effect of redox potential." Dans *The Microbiological Quality and Safety of Food. Volume I*, édité par B.M. Lund, A.C. Baird-Parker et G.W. Gould, 235-250. Gaithersburg: Aspen Publishers.
- Okamoto, K., K. Sato, M. Adachi et T. Chuma. 1999. "Some factors involved in the pathogenesis of chicken botulism." *Journal of the Japan Veterinary Medical Association* 52 (3): 159-163.
- Patterson, M. 2014. "High-Pressure Treatment of Foods." Dans *Encyclopedia of Food Microbiology (Second Edition)*, édité par Carl A. Batt et Mary Lou Tortorello, 206-212. Oxford: Academic Press.
- Peck, M. W., K. E. Goodburn, R. P. Betts et S. C. Stringer. 2008. "Assessment of the potential for growth and neurotoxin formation by non-proteolytic *Clostridium botulinum* in short shelf-life commercial foods designed to be stored chilled." *Trends in Food Science & Technology* 19 (4): 207-216. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2007.12.006>.
- Peck, M. W., T. J. Smith, F. Anniballi, J. W. Austin, L. Bano, M. Bradshaw, P. Cuervo, L. W. Cheng, Y. Derman, B. G. Dorner, A. Fisher, K. K. Hill, S. R. Kalb, H. Korkeala, M. Lindström, F. Lista, C. Lúquez, C. Mazuet, M. Pirazzini, M. R. Popoff, O. Rossetto, A. Rummel, D. Sesardic, B. R. Singh et S. C. Stringer. 2017. "Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature." *Toxins* 9 (1): 38. <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>.
- Peck, M. W., M. D. Webb et K. E. Goodburn. 2020. "Assessment of the risk of botulism from chilled, vacuum/modified atmosphere packed fresh beef, lamb and pork held at 3 degrees C-8 degrees C." *Food Microbiol* 91: 103544. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103544>.
- Pegram, P. et S. Stone. 2020. "Botulism." <https://www.uptodate.com/contents/botulism>.
- Pellett, S., W. H. Tepp, J. M. Scherf, C. L. Pier et E. A. Johnson. 2015. "Activity of botulinum neurotoxin type D (strain 1873) in human neurons." *Toxicon* 101: 63-69. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.04.015>.
- Peng Chen, Z., J. G. J. Morris, R. L. Rodriguez, A. Wagle Shukla, J. Tapia-Núñez et M. S. Okun. 2012. "Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins." *Toxins* 4 (11): 1196-1222. <https://doi.org/10.3390/toxins4111196>.
- Pigatto, C. P., R. P. Schocken-Iturrino, T. P. Chioda, G. R. Garcia, J. Vittori et S. C. P. Berchielli. 2007. "Natural *Clostridium botulinum* type "C" toxicosis in a group of chickens." *Archives of Veterinary Science*.
- Pingeon, J. M., C. Vanbockstael, M. R. Popoff, L. A. King, B. Deschamps, G. Pradel, H. Dupont, A. Spanjaard, A. Houdard et C. Mazuet. 2011. "Two outbreaks of botulism associated with consumption of green olive paste, France, September 2011." *Eurosurveillance* 16 (49): 20035.
- Popoff, M. R. 1989. "Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 8(1): 129-145. <https://doi.org/10.20506/rst.8.1.404>.
- Popoff, M. R. 2017. "*Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* producteurs de neurotoxines botuliques." Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par M. Naïtali, L. Guillier et F. Dubois-Brissonnet. : Lavoisier

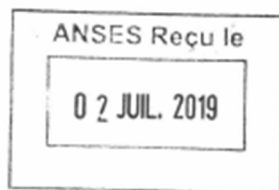
- Popoff, M. R. 2018. "Botulinum Toxins, Diversity, Mode of Action, Epidemiology of Botulism in France " Dans *Botulinum Toxin*, édité par IntechOpen Nikolay Serdev.
- Poulain, B. et M. R. Popoff. 2019. "Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic?" *Toxins (Basel)* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010034>.
- Puterflam, J., L. Balaine, P. Galliot, S. Le Bouquin et A. Huneau. 2016. "Accroch'air: Exposition professionnelle aux poussières dans les abattoirs de volaille." *Tema* 40.
- Radomyski, T., E. A. Murano, D. G. Olson et P. S. Murano. 1994. "Elimination of Pathogens of Significance in Food by Low-dose Irradiation: A Review." *J Food Prot* 57 (1): 73-86. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-57.1.73>.
- Rao, A. K. et S. Maslanka. 2018. "Botulism." Dans *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 20e, édité par Anthony S. Fauci J. Larry Jameson, Dennis L. Kasper, Stephen L. Hauser, Dan L. Longo, Joseph Loscalzo.
- Rasetti-Escargueil, C., E. Lemichez et M. R. Popoff. 2019. "Public Health Risk Associated with Botulism as Foodborne Zoonoses." *Toxins (Basel)* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010017>.
- Reddy, N. R., K. M. Marshall, T. R. Morrissey, V. Loeza, E. Patazca, G. E. Skinner, K. Krishnamurthy et J. W. Larkin. 2013. "Combined high pressure and thermal processing on inactivation of type a and proteolytic type B spores of *Clostridium botulinum*." *Journal of Food Protection* 76 (8): 1384-1392. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-538>.
- Reddy, N. R., H. M. Solomon, R. C. Tetzloff et E. J. Rhodehamel. 2003. "Inactivation of *Clostridium botulinum* type A spores by high-pressure processing at elevated temperatures." *Journal of Food Protection* 66 (8): 1402-1407. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-66.8.1402>.
- Reddy, N. R., R. C. Tetzloff, H. M. Solomon et J. W. Larkin. 2006. "Inactivation of *Clostridium botulinum* nonproteolytic type B spores by high pressure processing at moderate to elevated high temperatures." *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 7 (3): 169-175. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2006.03.002>.
- Reineke, K. et A. Mathys. 2020. "Endospore Inactivation by Emerging Technologies: A Review of Target Structures and Inactivation Mechanisms." *Annu Rev Food Sci Technol* 11: 255-274. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051632>.
- Rey, M., I. Diop Mar, R. Baylet, M. Armengaud, R. Michel, R. Bon-Nardot et M. Sow. 1964. "Du botulisme en pays Serer, à propos de six cas hospitalisés." *Bull. Soc. Méd. Afr. noire* 9: 34-44.
- Rivalain, N., J. Roquain et G. Demazeau. 2010. "Development of high hydrostatic pressure in biosciences: pressure effect on biological structures and potential applications in biotechnologies." *Biotechnol Adv* 28 (6): 659-72. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.04.001>.
- Roberts, T. A. et I. D. Aitken. 1974. "Botulism in birds and mammals in Great Britain and an assessment of the toxicity of *Clostridium botulinum* type C toxin in the domestic fowl." Dans *Barker, A.N., Gould, G.W., Wolf, J. (Eds.), Spore Research 1973. Academic Press, London, pp. 1-9*.
- Roberts, T. A. et A. M. Gibson. 1979. "The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing." *International Journal of Food Science & Technology* 14 (3): 211-226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb00866.x>.
- Roblot, F., M. Popoff, J. Carlier, C. Godet, P. Abbadie, S. Matthis, A. Eisendorn, G. Le Moal, B. Becq-Giraudon et P. Roblot. 2006. "Botulism in patients who inhale cocaine: the first cases in France." *Clinical Infectious Diseases* 43 (5): e51-e52.

- Roblot, P., F. Roblot, J. L. Fauchère, A. Devilleger, R. Maréchaud, J. P. Breux, G. Grollier et B. Becq-Giraudon. 1994. "Retrospective study of 108 cases of botulism in Poitiers, France." *J Med Microbiol* 40 (6): 379-84. <https://doi.org/10.1099/00222615-40-6-379>.
- Sarker, M. R., S. Akhtar, J. A. Torres et D. Paredes-Sabja. 2015. "High hydrostatic pressure-induced inactivation of bacterial spores." *Critical Reviews in Microbiology* 41 (1): 18-26. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2013.788475>.
- Segner, W. P. et C. F. Schmidt. 1971. "Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C." *Applied microbiology* 22 (6): 1030-1033.
- Segner, W. P., C. F. Schmidt et J. K. Boltz. 1971. "Minimal growth temperature, sodium chloride tolerance, pH sensitivity, and toxin production of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* Type C " *Applied Microbiology* 22 (6): 1025-&. <https://doi.org/10.1128/aem.22.6.1025-1029.1971>.
- Semenko, N., H. Mokhort, O. Sokolovska, I. Kolesnikova, I. Kuzin et K. Saylor. 2020. "Foodborne Botulism in Ukraine from 1955 to 2018." *Foodborne Pathog Dis*. <https://doi.org/10.1089/fpd.2020.2826>.
- Setlow, P. 2006. "Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals." *Journal of applied microbiology* 101 (3): 514-525.
- Setlow, P., S. W. Wang et Y. Q. Li. 2017. "Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales." Dans *Annual Review of Microbiology, Vol 71*, édité par S. Gottesman, In *Annual Review of Microbiology*, 459-477.
- Siegel, L. S. 1993. "Destruction of Botulinum Toxins in Food and Water " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K. L. Dodds, 323-332. New York: Marcel Dekker
- Silva, R. O. S., R. A. Martins, R. A. Assis, C. A. Oliveira Junior et F. C. F. Lobato. 2018. "Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil." *Anaerobe* 51: 47-49. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2018.03.013>.
- Skarin, H., A. Tevell Åberg, C. Woudstra, T. Hansen, C. Löfström, M. Koene, L. Bano, M. Hedeland, F. Anniballi, D. De Medici et E. Olsson Engvall. 2013. "The Workshop on Animal Botulism in Europe." *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 11 (S1): S183-S190. <https://doi.org/10.1089/bsp.2012.0076>.
- Smart, J. L., T. A. Roberts, K. G. McCullagh, V. M. Lucke et H. Pearson. 1980. "An outbreak of type C botulism in captive monkeys." *Vet Rec* 107 (19): 445-6. <https://doi.org/10.1136/vr.107.19.445>.
- Snow, D. M., R. R. Cobb, J. Martinez, I. Finger-Baker, L. Collins, S. Terpening, E. S. Syar, N. Niemuth, D. Kobs, R. Barnewall, S. Farr-Jones, J. D. Marks et M. T. Tomic. 2021. "A Monoclonal Antibody Combination against both Serotypes A and B Botulinum Toxin Prevents Inhalational Botulism in a Guinea Pig Model." *Toxins* 13 (1): 31.
- Souillard, R., D. Grosjean, T. Le Gratiot, T. Poezevara, S. Rouxel, L. Balaine, S. Macé, L. Martin, F. Anniballi, M. Chemaly, S. Le Bouquin et C. Le Maréchal. 2021. "Asymptomatic Carriage of *C. botulinum* Type D/C in Broiler Flocks as the Source of Contamination of a Massive Botulism Outbreak on a Dairy Cattle Farm." *Frontiers in Microbiology* 12 (1753). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679377>.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, S. Rouxel, D. Leon, L. Balaine, T. Poezevara, E. Houard, B. Robineau, C. Robinault, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2017. "Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France." *Avian Pathol* 46 (2): 195-201. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1240355>.
- Souillard, R., C. Woudstra, C. Le Maréchal, M. Dia, M. H. Bayon-Auboyer, M. Chemaly, P. Fach et S. Le Bouquin. 2014. "Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013." *Avian Pathology* 43 (5): 458-464. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.957644>.

- Tehran, D. A. et M. Pirazzini. 2018. "Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip." *Toxins* 10 (5): 190.
- Tonello. 2001. "Les équipements." Dans *Traitements ionisants et hautes pressions des aliments* édité par M. Federighi et Jean-Luc Tholozan, 151-160. Paris: Polytechnica.
- van Asselt, E. D. et M. H. Zwietering. 2006. "A systematic approach to determine global thermal inactivation parameters for various food pathogens." *Int J Food Microbiol* 107 (1): 73-82. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.014>.
- Wachnicka, E., S. C. Stringer, G. C. Barker et M. W. Peck. 2016. "Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance." *Appl Environ Microbiol* 82 (19): 6019-29. <https://doi.org/10.1128/aem.01737-16>.
- Wapen, B. D. et L. Gutmann. 1974. "Wound Botulism: A Case Report." *JAMA* 227 (12): 1416-1417. <https://doi.org/10.1001/jama.1974.03230250040030>.
- Weingart, O. G., T. Schreiber, C. Mascher, D. Pauly, M. B. Dorner, T. F. Berger, C. Egger, F. Gessler, M. J. Loessner, M. A. Avondet et B. G. Dorner. 2010. "The case of botulinum toxin in milk: experimental data." *Appl Environ Microbiol* 76 (10): 3293-300. <https://doi.org/10.1128/aem.02937-09>.
- Woudstra, C., H. Skarin, F. Anniballi, L. Fenicia, L. Bano, I. Drigo, M. Koene, M.-H. Bâyon-Auboyer, J.-P. Buffereau et D. De Medici. 2012. "Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe." *Applied and environmental microbiology* 78 (9): 3120-3127.
- Zhang, S., F. Lebreton, M. J. Mansfield, S. I. Miyashita, J. Zhang, J. A. Schwartzman, L. Tao, G. Masuyer, M. Martínez-Carranza, P. Stenmark, M. S. Gilmore, A. C. Doxey et M. Dong. 2018. "Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus faecium*." *Cell Host Microbe* 23 (2): 169-176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.018>.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2019-SA-0114



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo
Tel : 01 49 55 42 34

à

mus.dgal@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Directeur Général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard
75732 PARIS CEDEX 15

Paris, 25 JUIN 2019

Objet : Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et des sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives au risque lié à la consommation des produits à base d'œufs et de viande et à la manipulation de sous-produits animaux potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière avicole.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevage de volailles sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté. Par ailleurs, depuis l'émergence de cette maladie (type E) en 1997, en élevage avicole, une surveillance continue est nécessaire afin d'identifier l'éventuelle survenue d'un nouveau type de toxine ou d'une éventuelle source de contamination d'origine alimentaire.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin : C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée (C, D, E, A, ou B). Une évaluation du risque liée à la consommation de certains produits (œufs, viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement l'aide à la décision pour la gestion proportionnée de cas de botulisme aviaire de type C, D ou mosaïque C et D.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de soumettre les questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents.

Cette évaluation concerne le botulisme aviaire de type C, D, mosaïque C et D ou E et tout autre sérotype qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique dans cette filière. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2^e temps.

- Quel est le risque pour l'homme lié à la consommation des produits à base d'œufs et de viande selon les process de transformation et les formes de conditionnement. L'évaluation intégrera notamment la consommation des abats (foies, gésiers...) provenant d'animaux issus de lots atteints ou en période d'incubation. Comment l'état de santé des animaux (phase d'incubation, phase clinique, ...) influence-t-il le risque pour le consommateur final ?
- La manipulation de carcasses en abattoir issues d'un animal d'un élevage atteint de botulisme mais dépourvue de signes cliniques (l'animal malade étant bien évidemment exclu), présente-t-elle un risque pour les employés de contracter le botulisme ? Comment le maîtriser ?
- Quel processus de transformation appliqué sur les produits à base d'œufs et de viande peuvent-ils être considérés comme assainissants ?
- Quelles seraient les conditions et les moyens nécessaires pour diminuer le risque de contamination croisée à l'abattoir puis au cours de la transformation des viandes ou d'œufs ?
- Dans le cas où un traitement serait nécessaire, quelles seraient les mesures à prévoir pour la valorisation des sous-produits animaux habituellement destinés à l'alimentation d'animaux (plumes, sang, pattes, tête, viscères dont grappe intestinale)

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 1^{er} mai 2021



Le Directeur Général de l'Alimentation

Bruno FERREIRA

Annexe 2 : Description et analyse des publications sur les cas humains de botulisme de type C associés à la consommation de volailles

- **Maupas, P.; Lamagnere, J.P.; Lamisse, F.; Laugier, J. Botulisme de type C. Intérêt de la recherche de toxémie. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1976, 6, 207–210**

Description du cas

- 4 personnes déjeunent le 8 octobre : grand-mère, fille et gendre, petite -fille
- 11 octobre : hospitalisation de la fille, du gendre et de la petite-fille pour suspicion de botulisme
- 12 octobre : hospitalisation de la grand-mère en réanimation après avoir présenté une diplopie le 11 au soir. Présente des comorbidités.
 - o 14 et 16 octobre : aggravation de l'état de la grand-mère
 - o 27 octobre : régression du ptosis, pas d'autonomie respiratoire
 - o 21 octobre : fistule trachéo-oesophagienne, décès
- 11 octobre : hospitalisation de la petite-fille après apparition de troubles neurologiques le 10. Clinique modérée et atypique. Un prélèvement effectué le 11 donne un résultat positif à 4 DMM²⁵/ml de sérum
 - o 13 octobre : le tableau se complète, asthénie, entrée au service de réanimation
 - o 19 octobre : coma vigile, convulsion, intubation : hyponatrémie sans explication valable. Toxémie de 2 DMM/ml
 - o 15 novembre : début de récupération
 - o 17 novembre : toxémie négative
 - o 24 novembre : respiration autonome puis les jours suivants en rééducation
- Parents : 8 jours d'hospitalisation avec simplement une diplopie et un ptosis transitoire
- Toxémie de type C précisée par séroneutralisation
- Aliment incriminé non analysé.

Interprétation

- Utilité de prélever le sérum
 - Botulisme de type C confirmé chez la petite-fille (11 ans)
 - Faible clinique chez les parents, comorbidités chez la grand-mère
 - Publication : Médecine et maladies infectieuses
 - Botulisme clinique chez les parents probable, mais non démontré formellement pour le type
 - Grand-mère : botulisme confirmé et décès lié à son état général de santé
 - Poulet fumé suspecté mais non analysé, toxinogénèse *in vivo* discutée, considérant que la toxinogénèse serait nulle à 37°C
 - 1 foyer, 4 cas, 2 cas confirmés de botulisme de type C, denrée d'origine aviaire suspectée, mais non confirmée
-
- **Martrenchar, A.; Djossou, F.; Stagnetto, C.; Dupuy, C.; Brulez, E.; Attica, C.; Egmann, G.; Gruenfeld, J.; Fontanella, J.M.; Popoff, M.R. Is botulism type C transmissible to human by consumption of contaminated poultry meat? Analysis of a suspect outbreak in French Guyana. *Anaerobe* 2019, 56, 49–50.**

Description du cas :

- Épisode de botulisme dans un élevage de type familial : 50 poulets/100, 17 canards/20, 10 dindes/12.
- Le propriétaire tue les volailles paralysées et les cuisine, garde les restes au freezer.

²⁵ DMM : Dose Minimale Mortelle

- Troubles de la vision 24h plus tard, hospitalisé le 2 juillet
- Guérison au bout de 12h sans traitement
- Prélèvements le 3 juillet au domicile : sérum et tube digestif d'un poulet malade
- Les 2 sérums prélevés à 6 jours et fèces chez le propriétaire donnent un résultat négatif pour BoNT ou *C. botulinum* 4 jours plus tard : tous les poulets sont morts. : prélèvements sur 3 sujets malades
- PCR : résultats négatifs sur les oiseaux, résultats sur sérums négatifs sauf 2 poulets et un canard : type C

Interprétation :

- Botulisme de type C dans un petit élevage familial sans biosécurité
- Atteinte botulique légère et très transitoires : non typé
- Pas de mise en évidence chez le patient ou dans les restes de repas, informations parcellaires sur la préparation du repas
- Consommation de poulets malades, mode de contamination non éclairci

- **Rey M., Diop Mar I., Baylet R., Armengaud M., Michel R., Bon-Nardot R. et Sow M.. -1964 Du botulisme en pays Serer, à propos de six cas hospitalisés. *Bulletin de la Societe Medicale d'Afrique Noire de Langue Francaise*, 1964, 9, 34-44**

Description :

Quatre foyers de botulisme impliquant 8 cas ont été enregistrés en pays Serer²⁶ de 1961 à 1963. Le diagnostic a été posé par exclusion : troubles oculaires, de la déglutition, constipation sur les premiers cas principalement, quatre décès. Pas de diagnostic de laboratoire sur les malades. Pas d'aliment suspects analysés après enquête. Des analyses ont été réalisées sur des prélèvements pris au hasard. Aucune toxine n'a été mise en évidence directement sur les prélèvements alimentaires. Présence de *Clostridium* ayant des caractères de *C. botulinum* sur des boules de néré²⁷ fermenté (nététou) produisant une toxine neutralisée par le sérum anti-B. Une toxine peu active neutralisée par les sérums anti-B et anti-C produite par des *Clostridium* isolés de poissons du marigot où poussent des nénuphars dont les enfants mangent les racines ou les efflorescences. À la même période, morts suspectes de bovins comparables à la « maladie des forages » qui seraient un botulisme bovin dans la région du Ferlo, et de poulets ; deux malades ont consommé un poulet mort spontanément et bouilli.

Interprétation : pas de relation établie avec un aliment ou un type de *C. botulinum*.

4 foyers, 8 cas, aucune confirmation

Publications portant sur des primates :

Les cas de botulisme C chez les primates permettent de compléter cette liste.

- **Smart, J.L., Roberts, T.A., McCullagh, K.G., Lucke, V.M., Pearson, H., 1980. An outbreak of type C botulism in captive monkeys. *The Veterinary record* 107, 445-446.**

Description du cas :

- Élevage de primates : août 1979
- En 6 jours, mort de 14 sujets avec des signes de botulisme en 23 à 72 h. Les autopsies et analyses bactériologiques classiques n'ont pas permis d'identifier l'agent étiologique.
- Repas de poulet : les poulets sont découpés et préparés à l'état frais puis conditionnés en paquets de 2 à 5 kg et congelés. Les colis sont décongelés la veille à température ambiante. Il ne semble pas y avoir eu de différence notable de mode de préparation avec les autres jours. La cuisson consiste en une ébullition de courte durée.

²⁶ Région couvrant le centre-ouest du [Sénégal](#), du sud de la [région de Dakar](#) jusqu'à la frontière [gambienne](#)

²⁷ Arbre fruitier de la famille des mimosacées

- Seuls les singes ayant consommé les poulets provenant de 2 colis ont développé la maladie. Les analyses des restes de repas et du sang de 9 singes ont mis en évidence la toxine C. Le titre de la toxine n'a pu être mesuré correctement.

Interprétation :

- Diagnostic cohérent entre l'analyse du repas et les sérums prélevés.
- La décongélation à température ambiante en plein été, couplée à une cuisson peut-être insuffisante, pourrait expliquer cet événement.
- Comme dans le cas décrit par Martrenchar *et al.* (2019), il n'est pas facile d'obtenir les détails de la préparation du repas.

Silva, R. O. S., Martins, R. A., Assis, R. A., Junior, C. A. O., Lobato, F. C. F. (2018). Type C botulism in domestic chickens, dogs and black-pencilled marmoset (*Callithrix penicillata*) in Minas Gerais, Brazil. *Anaerobe*, 51, 47-49.

Description du cas : Foyer de botulisme de type C affectant simultanément poulets, chiens et primates

Interprétation :

Le rapprochement des cas observés en Guyane, sur les primates et les chiens (espèces considérées comme peu sensibles à ces toxines) montre qu'en cas de manquements manifestes aux bonnes pratiques d'hygiène et en particulier lors des étapes de décongélation, manipulation, découpe et stockage des poulets, la consommation d'animaux malades est susceptible d'engendrer des quantités significatives de toxine, en particulier durant les saisons chaudes.

Annexe 3 : Analyse des incertitudes

Un recensement des sources d'incertitudes liées au *corpus* de connaissances a été réalisé dans le GT socle, en se basant sur les recommandations proposées par le groupe de travail « Méthodologie en évaluation des risques » (Anses 2017).

Le tableau suivant présente les principales sources d'incertitudes liées à la méthode d'évaluation (données sélectionnées, méthodes d'intégration des données et interprétation des résultats) et les modalités de leur prise en compte par le GT.

Thématique de l'expertise	Sources d'incertitudes	Prise en compte/ appréciation par le GT	Impact sur les résultats de l'évaluation	
			Direction	Amplitude
Présence et concentration dans les produits et tissus animaux	<p>Pathogénèse du botulisme aviaire : la dose de <i>C. botulinum</i> nécessaire pour initier un foyer, les conditions propices à la croissance de la bactérie <i>in vivo</i> et à la production de toxines sont inconnues</p> <p>Cinétique de la toxine dans l'organisme (animal) / interaction toxine/hôte</p> <p>Peu de données relatives à des recherches dans les prélèvements autres que le foie, le sérum et le contenu du TD, en particulier pour des animaux sans signes cliniques</p> <p>Incertitudes sur les caractéristiques et la qualité des méthodes analytiques utilisées dans certaines études expérimentales en botulisme aviaire</p> <p>Manque de données récentes sur la prévalence des types C et D dans les DAOA.</p> <p>Pas de données sur les œufs</p>	Évaluation qualitative de la probabilité de présence dans les tissus sur la base des données disponibles et l'avis des experts du GT	Sur-estimation	Non qualifiable
Évaluation des mesures de maîtrise dans les DAOA	Manque de données sur la possibilité d'une bactériémie post abattage	La bactériémie ne peut être exclue mais si elle intervient, il s'agit d'un événement particulièrement rare.	Non qualifiable	Non qualifiable
	<p>Manque de données récentes sur l'impact de l'ensemble des procédés de préservation des aliments sur les types C et D.</p> <p>Les incertitudes associées aux valeurs de D (temps de réduction décimale) retrouvées dans la littérature.</p>	En l'absence de données, prise en compte des données disponibles pour les types A et B de <i>C. botulinum</i> ou d'autres bactéries (formes végétatives ou sporulées)	Non qualifiable	Non qualifiable
	Manque d'informations concernant l'inactivation des toxines (pas de consensus précis pour définir le couple temps-température par exemple, en fonction de la méthodologie d'analyse)	Couple temps/température retenu pour l'inactivation totale des toxines C et D : 90 °C/ 2 min (supérieur à ce qui est préconisé pour les toxines de types A et B 70 °C/ 2 min)	Sur-estimation	Non qualifiable
Efficacité des procédés de valorisation en Alimentation animale	Pas d'informations sur les procédés utilisés par les industriels (méthode 7)	Évaluation sur la base des barèmes mentionnés dans la réglementation	Non qualifiable	Non qualifiable

Notes



anses

Connaître, évaluer, protéger

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr