

Sommaire

Liste des abréviations	vi
RESUME.....	vii
INTRODUCTION.....	1
I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	3
I.1. Salmonelles	3
I.1.1. Caractéristiques.....	3
I.1.2. Source de contamination de <i>Salmonella</i> chez la volaille.....	3
I.1.3. Toxi-infections alimentaires (TIA) provoquée par <i>Salmonella</i> spp.	4
I.1.4. Législation en vigueur sur les systèmes de surveillance des salmonelles	4
I.2. Traitements de décontamination des bactéries pathogènes	5
I.2.1. Traitement chimique à l'acide lactique.....	6
I.2.1.1. Modes d'action de l'acide lactique	6
I.2.1.2. Effets de rémanence	6
I.2.1.3. Législation en vigueur.....	7
I.2.2. Traitements thermiques.....	7
I.2.2.1. Modèles cinétiques ou modèles primaires	7
I.2.2.2. Modèles environnementaux ou modèles secondaires	8
I.2.2.3. Traitements thermiques de décontamination des carcasses	9
I.2.3. Traitements combinant un traitement thermique et un traitement à l'acide lactique	10
II. MATERIELS ET METHODES	11
II.1. Principe général des essais	11
II.2. Souche bactérienne	11
II.3. Peaux de poulet.....	12
II.4. Inoculation des peaux de poulet	12
II.4.1. Préparation de la solution d'inoculation.....	12
II.4.2. Dénombrement de la solution d'inoculation	12
II.4.3. Dispositif d'inoculation	13
II.5. Rinçage des peaux témoins.....	13
II.6. Traitements de décontamination.....	13
II.6.1. Traitement acide	13
II.6.2. Traitement thermique	13
II.6.2.1. Pilote.....	13
II.6.2.2. Protocole.....	14

II.6.3. Traitement combiné	14
II.6.4. Traitements acide rincé et combiné rincé	14
II.6.5. Découpe des peaux avant analyse immédiate ou avant stockage	14
II.6.6. Stockage à 4°C.....	14
II.7. Dénombrement des salmonelles	15
II.7.1. Dénombrement des salmonelles sur XLD	15
II.7.2. Dénombrement des salmonelles sur MSR/V par la méthode MPN	15
II.8. Identification des salmonelles	15
II.8.1. Coloration de Gram	16
II.8.2. Etat frais.....	16
II.8.3. Identification biochimique.....	16
II.8.3.1. Milieu Urée-indole (orange).....	16
II.8.3.2. Milieu Hajna-Kligler	16
II.8.3.3. Milieu citrate de Simmons.....	17
II.8.3.4. Milieu Mannitol mobilité.....	17
II.9. Calcul de la réduction bactérienne.....	17
II.10. Analyses statistiques.....	17
III. RESULTATS ET DISCUSSIONS.....	18
III.1. Effet d'un rinçage après inoculation sur la quantité de salmonelles fixées à la surface de la peau.	18
III.2. Traitements de décontamination 100°C, 8 secondes et/ou 5%, 1 minute	19
III.2.1. Effet du traitement acide (5% durant une minute)	20
III.2.2. Traitement thermique	21
III.2.2.1. Température de surface de la peau de volaille	21
III.2.2.2. Effet du traitement thermique	21
III.2.3. Effet du traitement combiné.....	22
III.2.4. Influence du rinçage post traitement acide sur l'effet des traitements acide et combiné	23
III. 2.5. Comparaison des différents traitements	23
CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	25
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	27
ANNEXE 1 : PRINCIPE DE LA COLORATION DE GRAM.....	30
ANNEXE 2 : MILIEUX	31
ANNEXE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX.....	33

Liste des tableaux

Tableau I	Modalité de la surveillance de <i>Salmonella</i> spp. Suivant le règlement 2160/2003 (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2003a).
Tableau II	Exigence minimale d'échantillonnage pour la surveillance de <i>Salmonella</i> spp. Suivant le règlement 2160/2003 (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2003a).
Tableau III	Etude comparative de traitement de décontamination de l'acide lactique sur les Salmonelles.
Tableau IV	Valeurs de D_T et de Z de <i>Salmonella</i> sur les différentes parties de volailles
Tableau V	Caractéristiques morphologiques et biochimiques de <i>Salmonella</i> .
Tableau VI	Concentration en <i>Salmonella</i> des peaux de poulet simplement inoculées et des peaux inoculées et rincées.
Tableau VII	Concentrations en <i>Salmonella</i> Enteritidis et réductions décimales observées à T0 et T7 après des traitements thermiques à 100°C pendant 8 s et/ou des traitements à l'acide lactique 5% pendant 1 min.
Tableau VIII	Concentrations en <i>Salmonella</i> Enteritidis et réductions décimales observées à T0 et T7 après des traitements à l'acide lactique 5% pendant 1 min et des traitements combinés (100°C pendant 8 s puis traitement à l'acide lactique 5% 1 min) suivis ou non d'un rinçage.
Tableau IX	Caractéristiques des essais effectués lors des traitements thermiques (valeur moyenne \pm écart-type).

Liste des figures

- Figure 1 Schéma du principe général des essais
- Figure 2 Porte-échantillon en acier inoxydable utilisé pour les essais : base pleine (A), système de fixation (B), échantillon à traiter (C), porte-échantillon complet (D)
- Figure 3 Dispositif d'inoculation de *Salmonella* sur la peau de poulet.
- Figure 4 Schéma du pilote de traitement thermique : enceinte (A), isolation thermique (B), tiroir (C), résistance de chauffage de l'enceinte (D), évacuation surplus de vapeur (E), régulateur des résistances (F), générateur de vapeur (G), tube de surchauffe (H), résistance de surchauffe de la vapeur (I), thermocouple (T) : température de surface, récupération du condensats (K).
- Figure 5 Principe de la méthode de dénombrement des salmonelles sur MSR/V selon la méthode MPN.
- Figure 6 Exemple de plaques à puits de milieu MSR/V, avant (gauche) et après (droite) incubation.
- Figure 7 Evolution de la température mesurée par un thermocouple placé à la surface de peau de poulet (trait noir gras) et lors d'un essai à vide (trait clair) lors d'un traitement thermique à 100°C durant 8 secondes

Liste des abréviations

AFSSA	Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
a_w	activité de l'eau
CE	Commission Européenne
CFU (UFC)	Colony Forming Unit, (Unité Formant Colonie)
CIRAD	Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement
AESA (EFSA)	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (European Food Safety Agency)
EM	Etats Membres
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points, Analyse des points critiques pour la maîtrise des dangers d'origine alimentaire
HSP	Heat Shock Protein, protéine de choc thermique
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
LVD	Laboratoire Vétérinaire Départemental
LRC	Laboratoire Communautaire de Référence
LSD	Least Significant Difference, plus petite différence significative
MPN	Most Probable Number, nombre le plus probable
MSRV	Modified Semi solid Rappaport Vassiliadis medium, milieu modifié semi solide Rappaport Vassiliadis
ONPG	orthonitrophényl-D-galactopyranoside
TDA	tryptophane-désaminase
TIA	Toxi Infection Alimentaire
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
TSP	Triphosphate de sodium
UE	Union Européen
XLD	Xylose Lysine Désoxycholate

RESUME

Les carcasses de volaille sont chargées en bactéries pathogènes notamment *Salmonella*, *Listeria* et *Campylobacter*. Afin de réduire la charge en *Salmonella*, deux méthodes de décontamination, thermique et acide sont étudiées séparément ou en combinaison sur des surfaces de peau de poulet inoculées avec une forte concentration en *Salmonella* Enteritidis de $9,2 \pm 0,5 \log_{10}$ CFU.cm⁻². Le traitement thermique consiste à mettre en contact la surface de peau de poulet inoculée avec de la vapeur sèche à 100°C durant 8 secondes. Il a conduit à une réduction bactérienne très significative de plus de 4 log₁₀ (immédiatement et après 7 jours de stockage). Le traitement acide qui utilise une solution d'acide lactique de 5% mise en contact avec la peau inoculée durant une minute, a peu d'effet immédiat sur la concentration bactérienne mais après 7 jours de stockage à 4°C entraîne une réduction bactérienne supérieure à 3 log₁₀. La combinaison des deux traitements a conduit à des réductions plus élevées de plus de 5 log₁₀. Les traitements combinés cumulent les avantages des deux traitements en présentant une forte réduction immédiate liée à l'effet thermique et un effet bactéricide durant le stockage lié à l'action de l'acide lactique. Une véritable synergie a été mise en évidence. Le rinçage, s'il était imposé par la législation réduirait l'efficacité du traitement acide après 7 jours de stockage du fait de l'élimination de l'acide. Par contre, pour le traitement combiné, il ne réduit ni l'efficacité immédiate ni l'effet de rémanence de l'acide.

ABSTRACT

Poultry carcasses are loaded into pathogenic bacteria including *Salmonella*, *Listeria* and *Campylobacter*. To reduce the burden of *Salmonella*, two methods of inactivation, thermal and acid are studied separately or in combination on surfaces of skin can let inoculated with a high concentration of *Salmonella* Enteritidis ($9.2 \pm 0.5 \log_{10}$ CFU.cm⁻²). The heat treatment consists in putting in contact the surface of chicken skin inoculated with dry steam at 100 °C for 8 seconds. It led to a very significant bacterial reduction more than 4 log₁₀ (immediately and after 7 days of storage). The acid treatment that uses a lactic acid solution of 5% applied one the inoculated skin for one minute, has little immediate effect on the bacterial concentration but after 7 days storage at 4 °C causes a bacterial reduction more than 3 log₁₀. The combination of both treatments has led to higher reductions more than 5 log₁₀. The combined treatments combine the advantages of both treatments with a high immediate reduction related to the thermal effect and a bactericidal effect during storage resulting from the action of lactic acid. A real synergy has been revealed. The rinsing, if it was imposed by the legislation would reduce the efficiency of the acid treatment after 7 days of storage because of the elimination of acid. On the other hand, for the combined treatment, it does not either the immediate efficiency or the effect of persistence of acid.

INTRODUCTION

Aujourd'hui, la viande de volaille constitue la deuxième source de consommation dans le monde. Cependant, les volailles sont sujettes à de nombreuses contaminations causées par des bactéries pathogènes (*Salmonella*, *Listeria*, *Campylobacter*). La filière avicole européenne est de plus confrontée à court terme au renforcement des normes microbiologiques. Cette filière occupe une place prépondérante à la Réunion, une île tropicale où les normes sanitaires européennes s'appliquent. Mais les conditions tropicales accentuent les risques de contamination des systèmes d'élevage de volailles. La volaille est la viande la plus consommée à la Réunion (34 kg/an/habitant contre 23 en Métropole). La demande croissante de spécialités locales comme la charcuterie 100% volaille peut également accroître le risque de contamination pour le consommateur en raison de l'utilisation de la peau (siège majeur de ces bactéries) comme source de gras pour la fabrication de ces produits.

Les questions liées à la sécurité sanitaire des aliments ont pris une importance croissante dans l'esprit des consommateurs. Pour assurer cette sécurité, les abattoirs sont soumis à la mise en place du système HACCP pour améliorer le niveau d'hygiène générale. Mais cette mesure trouve rapidement sa limite face à la prévalence des bactéries pathogènes. La contamination de la surface des carcasses lors des opérations d'abattage est devenue une préoccupation constante des industriels de la filière viande.

Une des solutions pour réduire la contamination des carcasses est de réaliser un traitement de décontamination post abattage. Or aucun traitement chimique n'est autorisé dans la Communauté Européenne mais cette technique est utilisée dans certains pays. Au sein de l'UE, les autorités sanitaires considèrent plutôt que la diminution de la prévalence des bactéries pathogènes doit être obtenue par une modification des pratiques d'élevage et d'abattage. En effet, elles pensent qu'un traitement de décontamination des carcasses risquerait de dissuader les éleveurs d'accomplir les efforts nécessaires pour mettre en place et maintenir les bonnes pratiques d'hygiène souvent contraignantes au niveau de leurs élevages. Cette prohibition des traitements chimiques de décontamination de produits alimentaires repose sur la présence de résidus et dérivés à risque (chlorés et cancérigènes) à la surface des produits traités. Mais cette position est susceptible de s'assouplir dans un avenir proche.

C'est dans ce contexte que le Centre Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD) et l'Institut National de Recherche Agronomique (INRA), en partenariat avec la société avicole Crête d'Or Entreprise, ont initié un projet de recherche sur la décontamination de surfaces de volaille. Il vise à évaluer l'efficacité de deux traitements sans risque pour la santé du consommateur, l'un par voie thermique et l'autre par voie chimique. Le traitement thermique est intéressant du fait de son image positive auprès des consommateurs par comparaison à d'autres méthodes comme l'irradiation. Le traitement chimique employé est basé sur la solution d'acide lactique. L'acide lactique est privilégié dans l'étude par rapport aux autres acides organiques tels que l'acide chlorhydrique et ses dérivés utilisés dans les pays d'Amérique du nord du fait de son origine alimentaire, de son emploi dans de nombreux produits, de son efficacité et de sa flaveur peu prononcée. Ces traitements sont appliqués dans des conditions suffisamment douces pour ne pas détériorer la qualité organoleptique des produits et une combinaison des deux traitements est réalisée afin de faire ressortir d'éventuelles synergies permettant d'assurer des niveaux de décontamination importants. L'intérêt de cette combinaison pour la décontamination de peaux de volaille inoculées avec *Listeria innocua* a été montré dans des travaux antérieurs qui ont fait l'objet d'une thèse.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité et l'intérêt de combiner les deux traitements pour la décontamination de *Salmonella*. Dans le cadre du respect de l'avis de l'Autorité Européenne de Sécurité des aliments (AESA) de janvier 2006 qui indique que l'application d'une substance chimique devrait être obligatoirement suivie d'un rinçage, l'impact d'un rinçage post traitement chimique a été évalué.

Ce mémoire est scindé en trois chapitres. L'étude bibliographique présente les caractéristiques et les programmes de lutte et de surveillance des salmonelles. Ensuite, les traitements de décontamination décrits sont constitués d'un traitement acide, d'un traitement thermique et d'une combinaison des deux traitements. Le deuxième chapitre est consacré à la partie matériels et méthodes qui précise les techniques de réalisation des traitements et celles de détection des salmonelles. Le troisième chapitre traite des résultats obtenus au cours des différents essais suivis d'une discussion explicative des différents effets observés.

I. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Salmonelles

Dans cette section, les caractéristiques des salmonelles et les sources de contamination sont abordées. Il sera question d'évoquer les programmes de lutte et de surveillance.

I.1.1. Caractéristiques

Depuis bien longtemps, il est connu que la volaille peut héberger de nombreux sérotypes de *Salmonella*. Cependant, l'émergence du sérotype Enteritidis a fortement attiré l'attention sur cette problématique, principalement parce qu'il est facilement transmissible à l'homme chez qui il peut causer des symptômes cliniques d'une grande sévérité. Les conséquences des infections à salmonelles sur le plan économique et en santé publique sont telles qu'il est apparu indispensable d'exercer une surveillance épidémiologique concernant les salmonelles isolées chez l'homme, en santé et production animales, dans les aliments et dans l'environnement (AFSSA, 2004).

Les salmonelles sont des entérobactéries bacilles à gram négatifs, non sporulant, mobiles grâce à leur flagelle péritriche (à l'exception de *Salmonella Gallinarum*), aéro-anaérobie facultatifs. Elles réduisent les nitrates en nitrites, peuvent utiliser le citrate comme seule source de carbone, fermentent le glucose mais pas le lactose ni le sucrose et produisent du gaz à partir du glucose (sauf *Salmonella Typhy*). La réaction au test à l'oxydase est toujours négative (ICMSF, 1996). Certaines colonies de salmonelles (*S. Enteritidis*) présentent un centre noir sur des milieux d'isolement constitués de citrate de fer et de thiosulfate de sodium (ex : XLD, Hektoen, SS). Des souches de *Salmonella* spp. ont été isolées dans des milieux très variés, elles sont capables de se multiplier dans des conditions aérobies ou anaérobies, dans une gamme de température très large (5°C- 46°C), bien que l'optimum de croissance se situe entre 35°C et 43°C, la croissance est faible à des températures inférieures à 15°C. Des valeurs de pH égales à 9 ou inférieures à 4 sont considérées comme bactéricides. La croissance est inhibée lorsque l'activité de l'eau (A_w) est inférieure à 0,94. Dans ces conditions, il n'est pas rare d'isoler des *Salmonella* dans des milieux très différents (AFSSA, 2002).

Les salmonelles sont réputées être peu thermorésistantes puisqu'elles sont tuées rapidement lorsque la température dépasse 70°C comme dans le processus de pasteurisation habituellement appliqué dans les entreprises agro-alimentaires. La thermorésistance des microorganismes est habituellement définie par deux facteurs essentiels, la valeur D et la valeur Z qui seront développées dans la partie décontamination.

I.1.2. Source de contamination de *Salmonella* chez la volaille

Salmonella Enteritidis a une affinité particulière pour les tractus digestif et génital de la volaille, ce qui explique la contamination des œufs et par conséquent son introduction dans la chaîne alimentaire. Comme elle se transmet verticalement dans les œufs, il constitue la cause principale de la pandémie de salmonellose non typhoïde qui est observée chez l'homme. En outre, la bactérie se transmet aussi horizontalement dans les exploitations de volaille. Une fois qu'un bâtiment a hébergé des poules contaminées, il est très difficile d'éliminer cette contamination par des mesures hygiéniques classiques. Chez les volailles saines, les muscles et les tissus situés en profondeur sont stériles. Au cours du processus d'abattage, particulièrement lors du plumage et de l'éviscération, les bactéries présentes sur les plumes et l'appareil intestinal peuvent coloniser la surface des carcasses.

I.1.3. Toxi-infections alimentaires (TIA) provoquée par *Salmonella* spp.

Les salmonelles non typhiques sont l'une des principales causes des syndromes gastro-entériques dans les pays industrialisés. Ces syndromes sont dus essentiellement à des toxi-infections alimentaires survenant parfois en collectivité. La contamination humaine se fait le plus souvent par la consommation d'aliments contaminés. Actuellement, les infections sont principalement dues à quelques sérovars dont *Salmonella* Enteritidis (AFSSA, 2002). En France, en 2001, *Salmonella* a été responsable de 57,7% des 2993 cas confirmés de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), répartis au sein de 272 foyers. Il est estimé que chaque individu est atteint au moins une fois par an de troubles digestifs et que dans un tiers des cas, l'aliment est directement incriminé (Daube et Van, 1997). *Salmonella* présente une recrudescence durant l'été en Europe et dans les régions tropicales. Dans la plupart des rapports sur les foyers de TIAC, les denrées alimentaires d'origines animales, comme la viande de bœuf, les produits laitiers, la dinde et la volaille, les œufs sont les responsables de salmonelloses humaines (Bean *et al.*, 1997).

Les principaux symptômes de la salmonellose comprennent des diarrhées non sanglantes (fé-tides), des douleurs abdominales, de la fièvre, des nausées et des vomissements. Ces symptômes apparaissent habituellement entre 12 à 36 heures après ingestion, mais cette période peut être plus longue (72 heures) en fonction de la quantité de cellules microbiennes ingérées, de la santé de l'hôte et des caractéristiques de la souche de *Salmonella*. Chez des adultes de condition physique normale, une gastro-entérite disparaît sans traitement après 3 à 5 jours en moyenne. Par contre, une antibiothérapie doit être prescrite chez les personnes âgées, les nourrissons, ou les personnes immunodéprimées chez qui l'infection peut être plus sévère ou mortelle. Dans des cas plus graves, *Salmonella* peut infecter le corps entier (bactériémie) (AFSSA, 2002).

L'importance économique de ces pathologies est considérable. En Europe, en considérant que 95% des salmonelloses ont une origine alimentaire, les économistes ont estimé les coûts annuels des salmonelloses à une valeur comprise entre 560 millions et 2,8 milliards d'euros. Un cas unique de salmonellose est estimé, quant à lui, à une valeur comprise entre 24 et 3,8 millions d'euros. Cette dernière estimation se réfère au cas où le patient décède des suites de l'infection. Ils ont tenu compte des coûts médicaux et des pertes de productivité (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2001).

La meilleure façon d'éviter les toxi-infections alimentaires consiste à adopter une hygiène appropriée et des pratiques de manipulation et de préparation sûres des aliments. Un programme de lutte contre les salmonelles doit être établi pour assurer la sécurité des consommateurs par rapport aux aliments dans lesquels elle peut être présente.

I.1.4. Législation en vigueur sur les systèmes de surveillance des salmonelles

Pour limiter le risque microbiologique des aliments, des plans de surveillance des salmonelles sont mis sur pied par la directive européenne dont l'objectif est d'assurer la sécurité du consommateur. En 1992, le conseil européen a approuvé la directive 92/177/CE qui propose de mettre en place un programme de surveillance et de prendre des mesures en cas de détection d'une infection à *S. Enteritidis* ou *Typhimurium* dans les exploitations de poules reproductrices. Des rapports nationaux sur l'état sanitaire de chaque Etat Membre (EM) doivent être envoyés au Laboratoire Communautaire de Référence (LRC) sur l'épidémiologie des zoonoses et les mesures prises pour informer la commission (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 1993). En pratique, toutefois, différents problèmes sont apparus. Il s'est avéré que la prise de mesure de la commission uniquement sur les troupeaux de volailles reproductrices ne

Tableau I : Modalité de la surveillance de *Salmonella* spp. Suivant le règlement 2160/2003 (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2003a)

Espèces animales	Stade de la chaîne alimentaire	Spéculation (stade de production)	Date pour la fixation des objectifs des plans nationaux	Date à laquelle des tests doivent avoir lieu lors d'échanges intracommunautaires
volailles	Production primaire	Poules reproductrices	12/12/2004	12/06/2006
		Poules pondeuses	12/12/2005	12/06/2007
		Poulets de chairs	12/12/2006	12/06/2008
dindes	Production primaire		12/12/2007	12/06/2009

Tableau II : Exigence minimale d'échantillonnage pour la surveillance de *Salmonella* spp. Suivant le règlement 2160/2003 (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2003a)

Espèces animales - spéculation	Stade de la spéculation	Phases de production devant être concernées par l'échantillonnage
Gallus gallus - troupeaux reproducteurs	Elevage	Poussins d'un jour Volaille de 4 semaines 2 semaines avant l'entrée en ponte
	Stade reproduction	1 semaine /2 pendant la période de ponte
Gallus gallus - poules pondeuses	Elevage	Poussins d'un jour Poulette 2 semaines avant l'entrée en ponte
	Stade ponte	Toutes les 15 semaines en période de ponte
Gallus gallus-poules de chair et Dindes		Avant abattage ¹

¹Les résultats doivent être connus avant que les animaux ne partent à l'abattage.

présente que très peu d'effet sur la prévalence des cas humains de salmonelloses. En 2000, bien que les cas humains soient en diminution, la commission a mis en place des mesures de contrôles à toutes les étapes de la chaîne alimentaire. A la suite de la publication du livre blanc sur la sécurité des aliments, d'après les experts de la commission, la nouvelle stratégie de contrôle des zoonoses doit pouvoir rencontrer les objectifs suivants : créer un système de surveillance des zoonoses fondé sur des règles harmonisées, produire des denrées saines à partir d'animaux sains, octroyer des garanties pour l'amélioration de la protection des consommateurs grâce à la mise en œuvre de programmes de réduction des agents pathogènes et contrôler la diffusion des agents zoonotiques dans le cadre des échanges d'animaux (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2001).

Fort de ces constats de carences et des nouveaux objectifs fixés, une nouvelle directive 2003/99/CE, qui abroge la directive 92/177/CEE, a vu le jour en 2003. Elle présente deux objectifs. Le premier est que la surveillance des zoonoses, des agents zoonotiques et la résistance antimicrobienne associée soient bien définies. Le deuxième est que les foyers de TIAC qui seraient survenus fassent l'objet d'une étude épidémiologique adéquate afin que les informations nécessaires puissent être recueillies dans la communauté en vue d'en évaluer les tendances et les sources (Parlement européen et conseil de l'Union européenne, 2003b).

Dans la foulée de cette directive, le règlement 2160/2003/CE a vu le jour. Il a pour objectif de prendre des mesures adaptées et efficaces pour détecter et contrôler les salmonelles et d'autres agents zoonotiques à tous les stades pertinents de la production, de la transformation et de la distribution, en particulier au niveau de la production primaire, y compris dans l'alimentation animale, de manière à réduire leur prévalence et le risque qu'elles présentent pour la santé publique. Il prévoit des objectifs communautaires en matière de prévalence qui doivent être atteints par les EM en respectant un échéancier (Tableaux I et II). La Commission Européenne (CE) décidera si les programmes de lutte nationaux qui doivent inclure un échantillonnage pour la détection des zoonoses et des agents zoonotiques sont acceptables. Les exigences d'échantillonnage minimales sont fixées (Tableau II) (Parlement Européen et Conseil de l'Union, 2003a). Ces deux textes législatifs constituent donc la pierre angulaire de la lutte contre les zoonoses en Europe. A partir de 2010, les viandes fraîches de volaille ne pourraient plus être vendues pour la consommation que lorsque l'absence de *Salmonella* dans 25 grammes pourrait être démontrée.

Toutefois, certains scientifiques prétendent qu'il serait très difficile de se débarrasser des salmonelles en filière de production avicole et que ce plan de destruction ou d'abattage n'offre aucun avantage économique, si aucune étape assainissante n'est spécifiquement mise en place au sein des abattoirs. Cependant, ils proposent que les œufs et les carcasses puissent éventuellement subir des traitements de décontamination (Alban, 2004).

I.2. Traitements de décontamination des bactéries pathogènes

Cette section présente le mécanisme d'action de l'acide lactique et la législation en vigueur concernant les traitements chimiques de décontamination. L'effet de la température sur les microorganismes, les techniques de décontamination thermique des carcasses et les avantages d'un traitement combinant un traitement à l'acide lactique et un traitement thermique sont abordés.

Tableau III : Etude Comparative de traitement de décontamination de l'acide lactique sur les Salmonelles

Milieu (tissu ou eau de lavage)	Méthode	Réduction bactérienne	Référence
Peau de poisson chat	2% en 5mn exposition	2 log ₁₀ CFU/peau	(Jangho et Douglas, 2000)
Ails de poulet	0,5% en 30 mn immersion	4,5 log ₁₀ CFU/ml	(Hwang et Beuchat, 1994)

I.2.1. Traitement chimique à l'acide lactique

I.2.1.1. Modes d'action de l'acide lactique

L'acide lactique est l'un des acides organiques les plus utilisés pour la décontamination de produits alimentaires. Il est un produit de fermentation microbienne ou de synthèse chimique. Du fait, de son degré de dissociation et de son pKa de 3,90, il est considéré comme étant un agent de décontamination plus efficace que l'acide acétique (Deumier, 2004). L'acide lactique agit comme un antibiotique bactériostatique notamment sur les bactéries pathogènes comme la salmonelle.

L'acide lactique joue un rôle important dans l'inhibition de la croissance bactérienne. L'acide lactique sous sa forme non dissociée peut diffuser passivement à travers la paroi cellulaire des bactéries. Une fois à l'intérieur de la cellule, le pH intracellulaire plus élevé provoque sa dissociation et la libération d'anions et de protons qui ne peuvent plus traverser la membrane en sens inverse. Les ions H^+ vont provoquer une baisse du pH interne qui est incompatible avec certaines catégories de bactéries qui ne tolèrent pas un gradient de pH transmembranaire important. Dans ce cas, un mécanisme de résistance à ce type de stress cellulaire va se mettre en marche et des protons (H^+) seront « pompés » hors de la bactérie par une pompe à ATP, ce qui consomme de l'énergie et épuise la bactérie. Donc en fonction du pH interne, les anions vont s'accumuler, modifier la pression osmotique interne et devenir toxiques pour la bactérie (arrêt de la glycolyse, de la synthèse d'acides nucléiques, blocage d'enzymes, perturbation du transport membranaire, etc.).

L'acide lactique est utilisé dans l'industrie alimentaire comme additif (numéro E270) en tant qu'antioxydant, acidifiant ou exhausteur de goût. Il se présente aussi sous forme de sels : sel de sodium (E325), de potassium (E326) et de calcium (E327).

L'efficacité d'un traitement de décontamination par une solution d'acide lactique dépend de la concentration de la solution d'acide, de la durée de traitement et de même du mode d'application du traitement (Tableau III).

I.2.1.2. Effets de rémanence

La rémanence désigne l'effet antimicrobien du produit chimique persistant. Cet effet antimicrobien est dû à une quantité résiduelle très faible du produit chimique. Ces faibles quantités résiduelles peuvent suffire à exercer une certaine activité bactériostatique sur les bactéries ayant survécu au traitement de décontamination chimique. Cet effet de rémanence du traitement peut permettre de prolonger la date limite de consommation des produits, même dans le cas d'un stockage en froid positif.

Bon nombre de travaux scientifiques soulignent l'importance de cet effet. Ainsi, au cours du traitement d'ailes de poulet par immersion dans un mélange d'acide lactique à 0,5% et de benzoate de sodium à 0,05%, après 8 jours de stockage à 4°C, une réduction bactérienne de l'ordre de 1,2 \log_{10} pour *Listeria* spp., supérieure à 2 \log pour *Salmonella* spp. et *Campylobacter* spp. est observée. De même la croissance des bactéries psychrotrophes est retardée de manière significative (Hwang et Beuchat, 1995). Une réduction du nombre de *Salmonella* Typhimurium de 1,14 \log et de *Listeria monocytogenes* de 2,54 \log_{10} est notée sur des muscles de bœuf traités à l'acide lactique et stockés 5 jours à 4°C alors que les réductions immédiates sont très faibles de l'ordre de 0,7 et 1,09 respectivement (Gonzalez-Fandos *et al.*, 2006).

Certaines études scientifiques ont montré que l'effet de rémanence ne permet pas d'avoir un effet de protection vis-à-vis d'éventuelles recontaminations ultérieures au traitement. Par exemple Van Netten *et al.* (1998,1997) ont suivi l'évolution du nombre de bactéries pathogènes de peaux de porc ayant subi un traitement à l'acide lactique à 2% ou un traitement témoin (rinçage à l'eau) puis inoculées avec des bactéries pathogènes. Ils montrent que les évolutions des peaux traitées et des peaux témoins sont semblables à partir du premier jour de conservation et ce quelle que soit la température de stockage (4°C ou 12,5°C).

I.2.1.3. Législation en vigueur

L'utilisation de l'acide lactique et de ses sels pour la conservation de viandes et des produits de charcuterie-salaison est largement praticable et autorisée à 1 gramme par kilogramme de produit.

Actuellement, le règlement 853/2004/CE, qui a fixé les règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale, ne donne pas la possibilité de recourir à d'autres substances que l'eau potable pour éliminer de la contamination de la surface des produits d'origine animale, sauf si l'utilisation de cette substance a été approuvée. Cette formulation du règlement permet d'envisager l'utilisation possible de certaines substances permettant de décontaminer la surface des carcasses. En France des antécédents existent comme l'arrêté du 3 juin 1999 qui autorisait l'emploi du phosphate trisodique comme auxiliaire technologique pour la décontamination des carcasses de volailles sous certaines conditions, mais qui fut contesté par la Commission Européenne (car contraire aux dispositions de la directive 71/118/CEE relative à des problèmes sanitaires en matière de production et de mise sur le marché de viande fraîche de volaille) (Refrégier-Petton *et al.*, 2003).

En janvier 2006, l'AESA a publié un avis des substances pouvant être autorisées : le dioxyde de chlore, le chlorite de sodium acidifié, le phosphate trisodique et les peroxyacides. Mais l'AESA interdit l'application simultanée ou consécutive de plus d'une substance. Elle précise que le rinçage après l'application est obligatoire avant le refroidissement et que les produits concernés doivent faire l'objet d'un étiquetage spécifique (AFSSA, 2007). Ces quatre substances sont déjà autorisées aux Etats-Unis pour le traitement des produits de volailles et les viandes rouges (bœuf, porc et mouton) mais la Commission Européenne reste réticente à l'emploi de ces substances (Brulhet, 2007). De plus, l'AFSSA considère que la prévalence de *Salmonella* dans les filières poulets de chair et dindes ne justifie pas le recours au traitement antimicrobien sauf dans le cas d'actions ponctuelles et ciblées. Par contre, la prévalence d'autres microorganismes pathogènes (comme *Campylobacter*) et leurs outils de maîtrise n'étant pas établis, le recours à la décontamination chimique des carcasses de volailles pourrait être envisagé à condition que l'innocuité des substances antimicrobiennes et leur efficacité sur les principaux microorganismes pathogènes soit validée et que les déséquilibres de la microflore induits par le traitement soient pris en compte (AFSSA, 2007).

I.2.2. Traitements thermiques

I.2.2.1. Modèles cinétiques ou modèles primaires

Les traitements thermiques sont de nos jours très communément employés afin de garantir la sécurité microbiologique des produits alimentaires. Les études sur les procédés de désinfection par les agents chimiques et l'eau chaude, ont conduit à remarquer que le nombre de germes décroît exponentiellement en fonction du temps. Cette équation s'écrit :

$$N_t = N_0 * e^{-kt} \quad (\text{Eq1})$$

Où N_0 est la population initiale de bactéries viables et N_t le nombre total de bactéries survivantes au temps t , k est le taux de destruction, t le temps de traitement. Il est noter que le nombre de bactéries survivantes au temps « t » est fonction du niveau d'infection initiale, ainsi que du taux de destruction et de la durée de traitement. Ce modèle prend comme hypothèse que l'ensemble des individus d'une même population possède la même thermorésistance. Exprimée en logarithme décimal (Eq2) cette équation fait intervenir la durée de réduction décimale (D) qui correspond au temps de traitement nécessaire pour diviser la population survivante d'un facteur 10.

$$\log N_t = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad (\text{Eq2})$$

En effet, depuis toujours, c'est la cinétique d'ordre un qui fait figure de référence et c'est d'ailleurs la seule utilisée pour les calculs de barèmes de pasteurisation / stérilisation en industrie. A partir de là, la thermorésistance des microorganismes peut donc être exprimée par la valeur de D , la durée de réduction décimale, ou par la valeur de k , le taux de destruction. Ces deux valeurs sont liées par la relation :

$$D = \frac{\text{Ln}10}{k} \quad (\text{Eq3})$$

Ces valeurs varient avec les conditions environnementales et ces variations sont décrites par les modèles secondaires.

I.2.2.2. Modèles environnementaux ou modèles secondaires

La modélisation secondaire s'est longtemps limitée à la prise en compte de la température comme seul facteur influençant la thermorésistance des microorganismes. Son impact est décrit par deux modèles monofactoriels d'égales performances :

Le modèle d'Arrhenius (1889) décrit l'influence de la température de traitement sur la valeur k du taux de destruction :

$$k = B \times e^{-\frac{Ea}{RT}} \quad (\text{Eq4})$$

Où k est le taux de destruction, T la température absolue, B est une constante empirique, Ea l'énergie d'activation, R est la constance des gaz parfaits. Ce modèle présente le paramètre B , dénué de sens physique, ayant un ordre de grandeur difficilement appréhendable. C'est pourquoi il est plutôt présenté sous sa forme re-paramétrée :

$$k = k^* \times e^{-\frac{Ea}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T^*} \right)} \quad (\text{Eq5})$$

Où k^* représente la valeur du taux de destruction à la température de référence T^* généralement $121,1^\circ\text{C}$.

Le modèle de Bigelow décrit l'influence de la température sur la durée de réduction décimale.

$$D_T = D_T^* \times 10^{\frac{T-T^*}{z}} \quad (\text{Eq6})$$

Tableau IV : Valeurs de DT et de Z de Salmonella sur les différentes parties de volailles

Produits	D _T (mn)	Z (°C)	Référence
Muscle du Canard	D ₆₀ = 6,79±0,41	5,82	(Murphy <i>et al.</i> ,2003)
	D ₇₀ = 0 ,11±0,01		
Peau du canard	D ₆₀ =4,30±0,39	7,01	
	D ₇₀ = 0,17±0,01		
Filet (ou blanc) de dinde	D ₆₀ = 5,20±0,41	6,23	
	D ₇₀ = 0,12±0,01		
Blanc du poulet	D ₆₀ = 3,83±0,75	6,26	
	D ₇₀ = 0,10±0,03		

Où D_T est la durée de réduction décimale à la température T , D_T^* est la durée de réduction décimale à la température de référence T^* ($121,1^\circ\text{C}$) et Z correspond à l'élévation de la température qu'il faudrait appliquer pour diviser par 10 la durée de réduction décimale D_T .

On peut donc caractériser la thermorésistance d'un microorganisme par les valeurs de D^* et Z qui lui sont associées. D^* représente sa résistance à la température de référence et Z sa sensibilité aux variations de températures. Quelques valeurs de D_T et de Z mesurées sur les salmonelles dans les différentes conditions sont présentées dans le tableau IV.

Il faut noter également que beaucoup de facteurs influencent la résistance des bactéries à la destruction thermique. Parmi ces facteurs, on peut citer le taux de matière grasse dans les échantillons à décontaminer, le pH des échantillons ou encore la durée du chauffage.

I.2.2.3. Traitements thermiques de décontamination des carcasses

Lorsque les bactéries ne sont plus en suspension dans un liquide, mais fixées à la surface d'un produit alimentaire, leur réponse aux traitements thermiques se modifie fortement (changement de physiologie, biofilms, etc). Par exemple, *Salmonella* spp. et *Listeria* spp. sont significativement plus résistantes à un même traitement thermique lorsqu'elles sont inoculées dans un broyat de poulet que lorsqu'elles sont en suspension dans un bouillon nutritif (Murphy *et al.*, 2000). De même les bactéries fixées à la surface des aliments sont plus résistantes que dans les broyats. Orta-Ramirez *et al.* (2005) ont montré que *Salmonella* spp. est beaucoup plus résistante lorsqu'elle est fixée à la surface de muscles de bœuf que lorsqu'elle est inoculée sur un broyat du même muscle.

Lors des traitements de décontamination par l'eau chaude, la réduction bactérienne due à l'effet thermique (destruction bactérienne), s'accompagne d'une action de nettoyage des souillures et donc des bactéries qui adhèrent à ces souillures. Lorsque le traitement est effectué par jet d'eau, l'effet mécanique de frottement sur la surface est important et peut conduire au décrochage des bactéries qui adhèrent à même la surface. Ce phénomène augmente avec la pression et la vitesse du jet (Crouse *et al.*, 1988 cité par Lecompte (2008)). Ces traitements entraînent également des risques de contaminations croisées.

L'utilisation de la vapeur d'eau est démontrée surtout compte tenu de ses avantages. Ainsi Morgan *et al.* (1996) cités par Lecompte (2008) ont montré que lorsqu'il n'y a pas de condensats à la surface d'un produit alimentaire, la vapeur d'eau, sous forme de gaz, peut accéder plus facilement aux parties du produit qui ne sont pas atteintes lors de traitements à l'eau chaude, comme la partie interne des carcasses ou les follicules de la peau. Au début du traitement, la température du produit est inférieure à celle de la vapeur, qui se condense à la surface en libérant une grande quantité d'énergie. Le coefficient de transfert de chaleur est donc très important, ce qui explique la grande efficacité du traitement à la vapeur, par rapport aux traitements à l'air chaud. La vapeur peut être produite à pression atmosphérique. Dans ce cas, les températures de surface obtenues ne peuvent pas dépasser 100°C . Il est possible de repousser cette limite en utilisant de la vapeur sous pression, ce qui permet de traiter les produits avec une vapeur saturée en eau, ou en produisant de la vapeur à pression atmosphérique et en la surchauffant. Le coefficient de transfert de chaleur est alors moins élevé, mais cette méthode pose moins de problèmes de sécurité. Kondjayan et Portanguen (2008) ont utilisé cette méthode. Ils ont montré l'efficacité de la vapeur sèche sur des peaux de poulets inoculées avec *Listeria innocua* CLIP 20-595.



I.2.3. Traitements combinant un traitement thermique et un traitement à l'acide lactique

Sur des peaux de volaille inoculées avec *Listeria innocua*, Lecompte (2008) montre que le traitement combiné cumule les avantages des deux traitements puisqu'il permet une réduction immédiate importante due à la partie thermique et un effet de rémanence du fait du traitement acide. Il observe même dans certains cas que le traitement combiné est plus efficace que les traitements appliqués seuls. De même, une étude sur des carcasses de porc indique que les flores mésophiles et psychrophiles indigènes sont réduites de 0,7 et 1,3 log₁₀ respectivement après un traitement à la vapeur (température de la vapeur 90 à 95°C, durée de traitement estimée à 0,013s) suivi d'une pulvérisation d'acide lactique à 2% (à 45°C). Après 5 jours de stockage à 4°C, ces réductions bactériennes sont respectivement de 1,5 et 3 log₁₀ (Pipek *et al.*, 2006). L'ordre d'application des traitements a plus ou moins d'importance selon les auteurs mais Ozdemir *et al.* (2006), cités par Lecompte (2008) observent qu'un traitement à l'eau chaude suivi d'un traitement lactique à 2%, entraîne une réduction de la flore de 3,84 log₁₀ CFU/g tandis qu'elle n'est que de 2,86 log₁₀ CFU/g si les traitements sont réalisés dans l'ordre inverse.

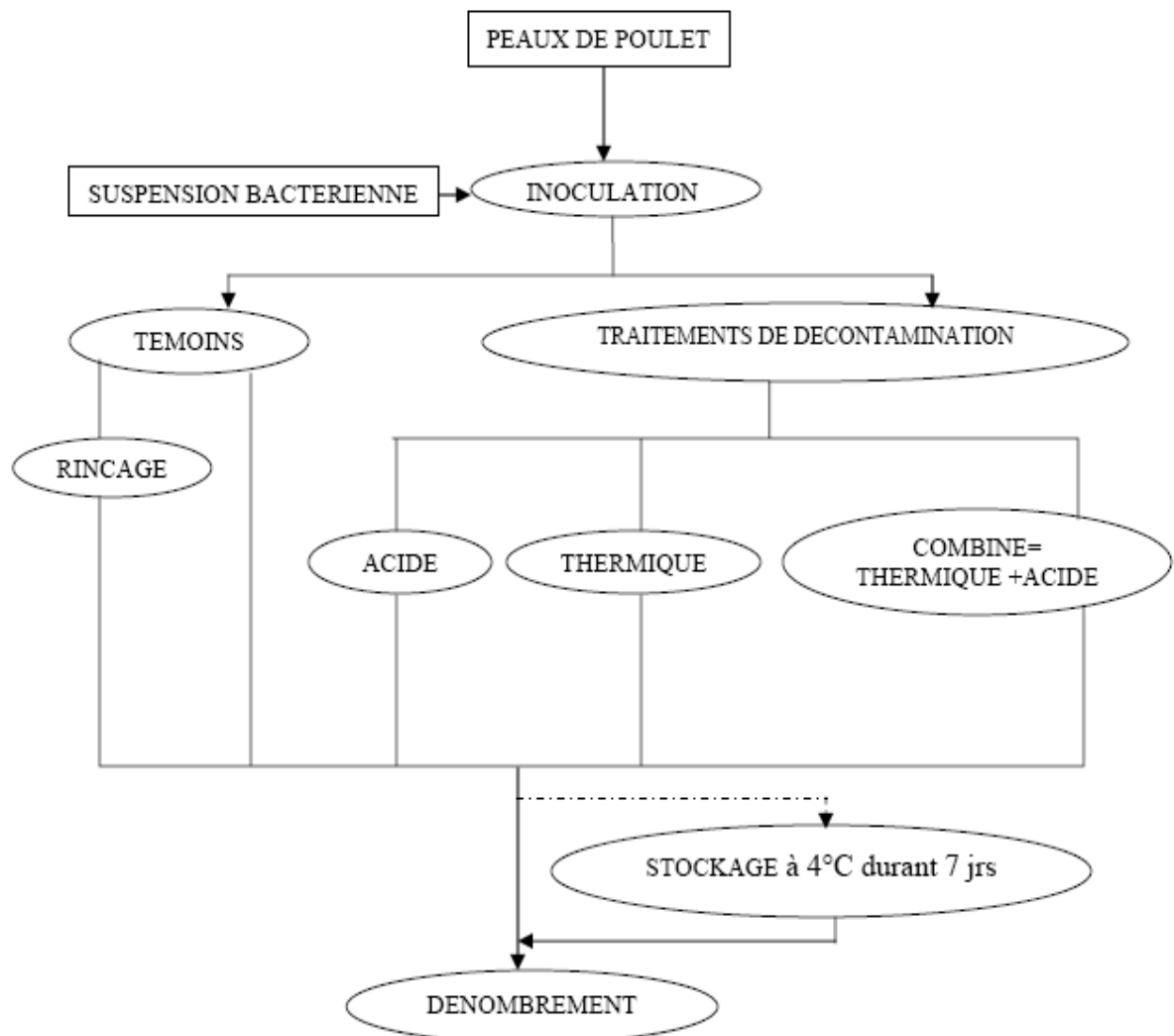


Figure 1 : Schéma du principe général des essais

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Principe général des essais

Le protocole de la manipulation est schématisé et présenté Figure 1. Les surfaces externes de peaux de volaille sont inoculées avec une suspension bactérienne de *Salmonella enterica enterica* Enteritidis (CIP 82.97). Ces surfaces de peaux sont ensuite traitées et les bactéries survivantes sont dénombrées.

Les traitements de décontamination sont constitués d'un traitement chimique (consistant à la mise en contact d'une solution acide avec la surface de peau inoculée), d'un traitement thermique (la surface de peau est mise en contact avec de la vapeur sèche durant quelques secondes) et d'une combinaison des deux traitements (traitement thermique puis un traitement acide). Les bactéries survivantes sont ensuite dénombrées sur ces surfaces traitées. Le dénombrement est réalisé, soit immédiatement après traitement, soit après un stockage de sept jours à 4°C qui permet de mettre en évidence les phénomènes de multiplication bactérienne ou de rémanence du traitement.

Puisque la charge bactérienne des carcasses de volaille est plus importante sur la peau, les concentrations bactériennes et les traitements de décontamination sont ramenés à l'unité de surface de peau de volaille. Ainsi la réduction décimale bactérienne de la décontamination rapportée à la surface de peau est exprimée en \log_{10} CFU.cm⁻².

Pour cela, des dispositifs spécifiques (Figure 2) sont utilisés pour justifier avec précision de la superficie de peau inoculée et traitée.

Des témoins (surface de peau inoculée mais non traitée) sont réalisés afin de calculer la réduction bactérienne relative à chaque traitement. Dans le cas du traitement thermique, le témoin doit être simplement inoculé. Pour les traitements acide et combiné, le témoin doit être inoculé puis mis en contact avec la même quantité de solution que celle utilisée par le traitement acide mais en remplaçant l'acide par de l'eau. Afin de voir s'il est possible d'alléger le protocole opératoire en faisant un seul type de témoin, les dénombrements des témoins simplement inoculés et ceux des témoins inoculés puis rincés à l'eau sont comparés. Les résultats de cette mise au point du protocole sont présentés dans la première partie des résultats.

Pour comparer l'efficacité des différents traitements de décontamination, une série de 10 répétitions pour chaque traitement sont effectuées. Chaque essai comprend systématiquement la production d'un témoin, d'un traitement acide, d'un traitement thermique et d'un traitement combiné. Les résultats de ces essais sont présentés dans la deuxième partie des résultats.

Des nouvelles conditions réglementaires à venir pourraient imposer un rinçage des carcasses après un traitement chimique. Aussi, un autre plan expérimental est réalisé afin d'évaluer l'effet d'un rinçage post traitement acide. Ce plan comprend 9 répétitions de chacun des traitements suivants : un témoin, un traitement acide simple, un traitement acide rincé, un traitement combiné simple et un traitement combiné rincé. Les résultats de ces essais sont présentés dans la troisième et dernière partie des résultats.

II.2. Souche bactérienne

La souche de salmonelle utilisée est *Salmonella enterica subsp. enterica* sérovar Enteritidis CIP 82.97. Elle est issue des collections de l'Institut Pasteur. Elle est conservée en milieu gly-



Figure 2 : Porte-échantillon en acier inoxydable utilisé pour les essais : base pleine (A), système de fixation (B), échantillon à traiter (C), porte-échantillon complet (D).

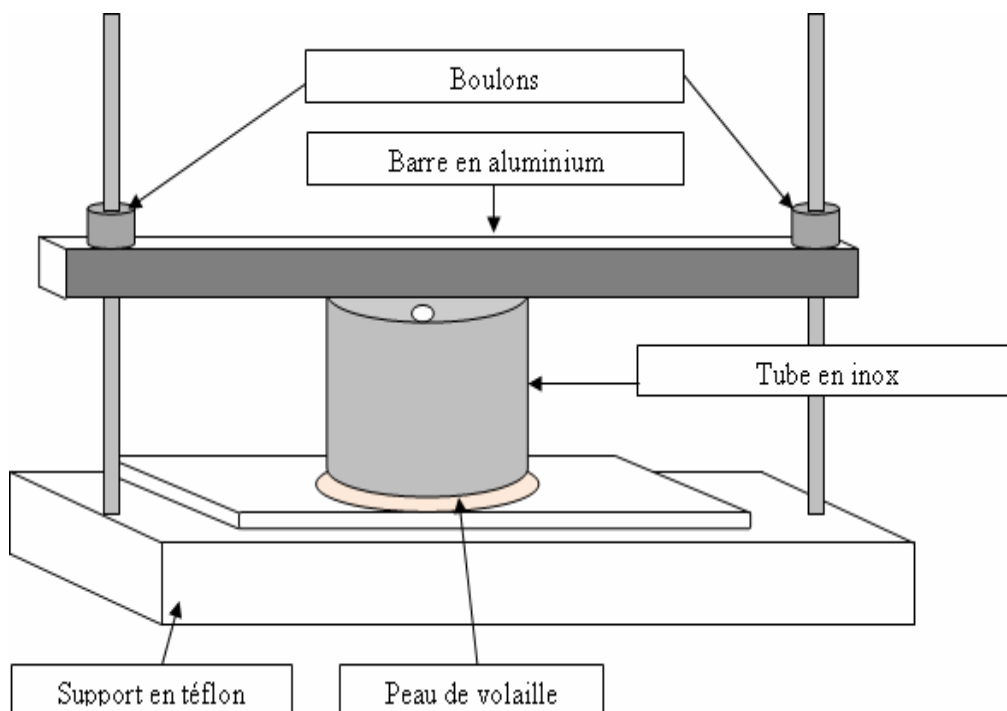


Figure 3 : Dispositif d'inoculation de *Salmonella* sur la peau de poulet.

cérolé sur cryobilles à -80°C . Cette méthode de conservation permet d'éviter les modifications morphologiques et physiologiques de la bactérie.

Avant le début des essais, la souche est envoyée au Laboratoire Vétérinaire Départemental (LVD) pour confirmation de son identité. Elle est identifiée en tant que *Salmonella enterica subsp enterica* sans spécification du sérovar car le LVD ne dispose pas du matériel nécessaire pour cette vérification mais la conclusion de la fiche est « possibilités S. Enteritidis ». Cette analyse est effectuée afin de s'assurer de la conservation des caractéristiques de la souche.

II.3. Peaux de poulet

Dans des travaux précédents réalisés au laboratoire, les peaux de volaille de même lot, congelées et conservées à -18°C , sont utilisées. Les résultats des traitements thermiques ont montré une plus grande efficacité sur les peaux congelées que les peaux fraîches (Lecompte, 2008). Pour rester dans les mêmes conditions qu'à l'abattoir, il est décidé de réaliser les traitements sur des peaux fraîches.

Les peaux fraîches utilisées sont détachées des hauts de cuisses de poulet de marque « Ti'Gayar », de la société Crête d'Or, Z.I. les Sables, Etang Salé, la Réunion. Les hauts de cuisses de poulet sont achetés en grande surface et sont conservés à $+4^{\circ}\text{C}$ jusqu'à leur utilisation. Les essais sont effectués entre la date d'emballage et la date limite de consommation (qui est de 7 jours après abattage).

Les essais sont effectués sur des peaux de volaille réfrigérées de différents lots. Il est à noter que les essais présentent une variabilité des peaux de volaille en termes de composition, d'épaisseur et de flore indigène.

II.4. Inoculation des peaux de poulet

II.4.1. Préparation de la solution d'inoculation

Dans un erlenmeyer de 500 ml stérile, cinq cryobilles de *Salmonella enterica enterica* Enteritidis CIP 82.97 sont mises en culture dans 300 ml d'eau peptonée à 37°C sous agitation (100 rpm) durant 48 heures ce qui représente le temps nécessaire pour atteindre la phase stationnaire de croissance (Lecompte, 2008).

La solution bactérienne est ensuite centrifugée à 5000 g pendant 20 minutes dans six tubes de centrifugation stériles. Les culots, séparés du surnageant, sont remis en suspension dans l'eau physiologique stérile à 9 g.L^{-1} de NaCl. Lors de la détermination de la densité optique (DO) à 600 nm, la suspension est complétée avec de l'eau physiologique de manière à obtenir une solution d'inoculation de concentration bactérienne constante. Pour les essais effectués, la DO_{600} est de $2,0 \pm 0,2$ unités correspondant à une solution d'inoculation d'environ $9,2 \pm 0,5$ log CFU.mL⁻¹.

II.4.2. Dénombrement de la solution d'inoculation

Une dilution décimale de la suspension bactérienne jusqu'à 10^{-10} est réalisée. Des aliquotes de 100 μl de chaque dilution sont déposés et étalés avec un râteau stérile sur milieu XLD (Annexe 2) (Xylose-Lysine-Désoxycholate, Oxoid, France) dans des boîtes de Pétri. Sur ce milieu les salmonelles poussent sous forme de colonies noires. Les boîtes sont incubées à 37°C . Au bout de 24 heures, les boîtes dont le nombre de colonies est compris entre 30 et 300 sont comptées.

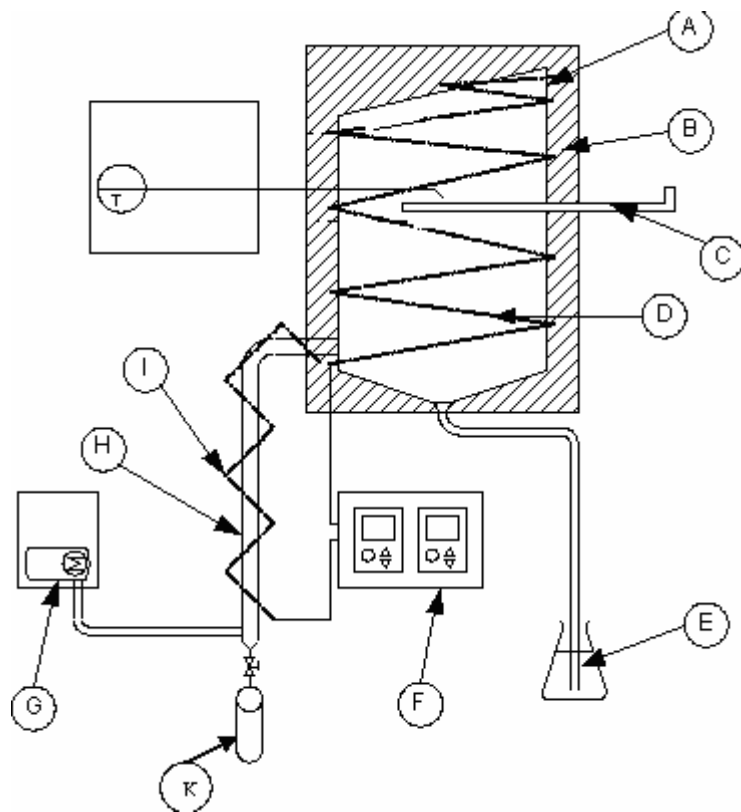


Figure 4. Schéma du pilote de traitement thermique : enceinte (A), isolation thermique (B), tiroir (C), résistance de chauffage de l'enceinte (D), évacuation surplus de vapeur (E), régulateur des résistances (F), générateur de vapeur (G), tube de surchauffe (H), résistance de surchauffe de la vapeur (I), thermocouple (T) : température de surface, récupération du condensats (K).

II.4.3. Dispositif d'inoculation

Une peau de poulet est étalée sur un papier sulfurisé (Figure 2C). Elle est découpée suivant la forme du support métallique (Figure 2B). La peau découpée et fixée au support est ancrée sur un deuxième support métallique (Figure 2A).

L'ensemble (Figure 2D) est ramené sous la hotte et déposé sur une plaque en téflon. Un tube en inox de diamètre interne 44,6 mm (soit un diamètre légèrement inférieur à celui du trou du porte-échantillon) est disposé sur la peau et fixé par une barre en aluminium (Figure 3).

Un volume de 10 mL de solution d'inoculation est introduit dans le tube. Après une minute de contact avec la peau à température ambiante, la solution d'inoculation est éliminée en renversant le système et la peau, toujours fixée, est laissée pendant 10 minutes à la température ambiante pour permettre la fixation des bactéries et le séchage de la surface.

II.5. Rinçage des peaux témoins

Après inoculation, un nouveau tube en inox est appliqué sur la peau toujours fixée au support. La peau est mise en contact avec 25 ml d'eau physiologique. Après une minute, l'eau physiologique est éliminée.

II.6. Traitements de décontamination

II.6.1. Traitement acide

13,9 ml d'acide lactique de pureté 80% sont introduits dans 236,1 ml d'eau distillée stérilisée pour obtenir une solution d'acide lactique à 5% v/v.

Après l'inoculation, un nouveau tube en inox est disposé sur la peau toujours fixée au support. 25 ml de la solution d'acide lactique sont introduits. Au bout d'une minute de contact avec la peau, la solution acide est éliminée.

II.6.2. Traitement thermique

II.6.2.1. Pilote

Le pilote de traitement thermique (Figure 4) est basé sur le principe de la cloche à vapeur. Il est conçu de manière à être suffisamment compact pour pouvoir être placé dans un poste de sécurité microbiologique. Un générateur à vapeur (Philips, France) produit de la vapeur à 100°C à pression ambiante. Cette vapeur est introduite dans une enceinte fermée via un tube de surchauffe en acier inoxydable entouré d'une résistance chauffante régulée. L'enceinte, isolée avec de la laine de roche, est entourée de deux résistances chauffantes régulées. Les résistances du tube de surchauffe et de l'enceinte permettent d'éviter la condensation au sein de l'enceinte. Le surplus de la vapeur et les condensats sont évacués et barbotent dans un erlenmeyer contenant une substance bactéricide afin d'éviter toute contamination de l'air ambiant par les bactéries pathogènes.

Lors de la conception de ce dispositif, un soin particulier est apporté afin d'éviter la formation de condensats sur les parois de l'enceinte et leur projection sur l'échantillon :

- Isolation efficace,

- Maintien des parois de l'enceinte à une température légèrement supérieure au point de rosée,
- Inclinaison importante de l'enceinte permettant l'écoulement des condensats le long de la paroi,
- Tiroir, aussi petit que possible et pourvu de joints assurant l'étanchéité,
- Intérieur maintenu en très légère surpression.

Les résistances sont allumées et réglées à 100°C durant 1 heure 30 minutes afin d'augmenter la température à l'intérieur de l'enceinte et ainsi d'éviter la condensation. Le générateur à vapeur est allumé 30 minutes avant le début des traitements. Entre chaque traitement, une période de mise à l'équilibre d'une heure est observée. A la fin des traitements, l'ensemble du pilote est porté à 200°C pendant 20 minutes afin d'éliminer les micro-organismes qui sont infiltrés dans l'enceinte.

II.6.2.2. Protocole

Le porte-échantillon en acier inoxydable sur lequel est fixée la peau de poulet inoculée est introduit dans le tiroir. Un thermocouple de type K connecté à une centrale d'acquisition est positionné à la surface de la peau. Lors de la fermeture du tiroir, la surface de la peau est instantanément mise en contact avec de la vapeur à 100°C durant 8 secondes. A la fin du traitement, le tiroir est ouvert et la peau est immédiatement refroidie par le jet d'air d'un générateur d'air comprimé (température d'environ 20°C) durant 1 minute.

II.6.3. Traitement combiné

Le traitement combiné est une combinaison du traitement thermique suivi du traitement acide. A la fin du traitement thermique, la peau toujours fixée dans le porte-échantillon est recouverte d'un nouveau tube en inox et 25 ml de la solution d'acide lactique y sont introduits. Après une minute de contact avec la peau, la solution acide est éliminée.

II.6.4. Traitements acide rincé et combiné rincé

Après le traitement acide, un nouveau tube en inox est disposé sur la peau toujours fixée au support. 25 ml d'eau distillée stérile y sont introduits. L'ensemble est agité pendant 30 secondes puis l'eau est éliminée.

Après le premier rinçage, 25 ml d'eau distillée stérile y sont introduits pour une deuxième fois. Au bout de 30 secondes d'agitation et de contact avec la peau, l'eau est de nouveau éliminée.

II.6.5. Découpe des peaux avant analyse immédiate ou avant stockage

Avant l'analyse immédiate ou le stockage, un disque de 7,35 cm² de superficie est découpée dans chacune des peaux (témoins et traitées).

II.6.6. Stockage à 4°C

Chaque peau découpée est placée dans une boîte de pétri stérile. Chaque boîte est scellée avec du parafilm (Grosseron, France). Les boîtes scellées sont ensuite stockées dans une chambre froide à 4°C durant 7 jours.

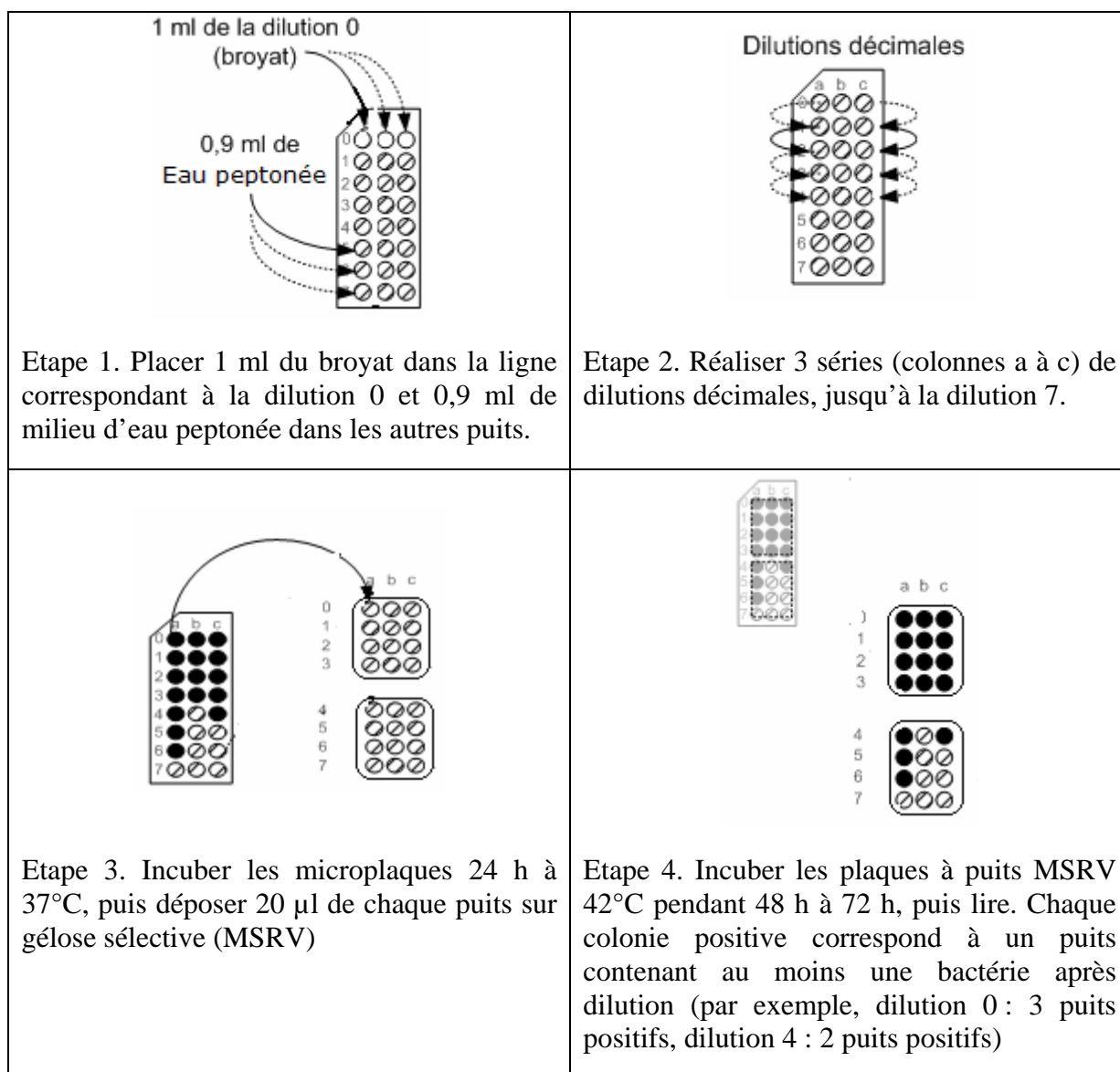


Figure 5 : Principe de la méthode de dénombrement des salmonelles sur MSR/V selon la méthode MPN.

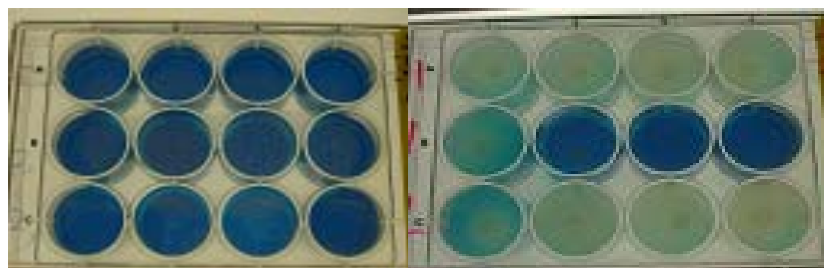


Figure 6 : Exemple de plaques à puits de milieu MSR/V, avant (gauche) et après (droite) incubation.

II.7. Dénombrement des salmonelles

Les salmonelles sont dénombrées soit immédiatement après l'essai, soit après 7 jours de stockage. Pour des raisons pratiques, le dénombrement des bactéries immédiatement après traitement et le dénombrement après 7 jours de conservation seront désignés respectivement par « dénombrement à T0 » et « dénombrement à T7 ».

II.7.1. Dénombrement des salmonelles sur XLD

Dans le cas des essais visant à comparer les peaux inoculées simplement et les peaux inoculées rincées, les salmonelles sont dénombrées immédiatement sur XLD (Annexe 2). Les peaux découpées sont broyées au stomacher dans 25 ml d'eau peptonée tamponnée (Biokar Diagnostics, France) durant 5 minutes.

Une dilution décimale du broyat jusqu'à 10^{-12} est réalisée. Des aliquotes de 100 μ l de chaque dilution sont déposés et étalés avec un râteau stérile sur milieu XLD dans des boîtes de Pétri. Les boîtes sont incubées à 37°C. Au bout de 24 heures, le nombre de colonies des boîtes compris entre 30 et 300 sont comptées.

II.7.2. Dénombrement des salmonelles sur MSR/V par la méthode MPN

Les peaux (témoins et traitées) découpées sont broyées au stomacher dans 25 ml d'eau peptonée tamponnée (Biokar Diagnostics, France) durant 5 minutes. Pour diminuer autant que possible le seuil de détection de *Salmonella*, la méthode MPN (Most Probable Number) est exploitée. Le seuil de détection est de 0,05 \log_{10} CFU.cm⁻² tandis que le seuil de détection sur XLD est de 3,1 \log_{10} CFU.cm⁻².

Pour chaque peau, 3 séries de dilutions sont réalisées dans une microplaque (plaque deepwell, Eppendorf, USA) dont chaque puits est préalablement rempli de 0,9 ml d'eau peptonée. Les microplaques sont incubées pendant 24 heures à 37°C. Ensuite, 20 μ l de chaque puits de la microplaque sont déposés sur milieu MRSV (Biokar Diagnostics, France) dans des plaques à puits (Promédical, France). Les plaques de MSR/V (Annexe 2) sont ensuite incubées 48 à 72 heures à 42°C avant lecture (Figure 5).

Salmonella pousse sous forme de colonies blanches opaques sur la gélose semi-solide. Les salmonelles mobiles migrent et forment un halo blanc-jaune autour de la colonie blanche (Figure 8). Les colonies blanches ayant migré pour chaque dilution sont comptées.

Le calcul de la concentration bactérienne est obtenu selon la méthode du nombre le plus probable à l'aide du logiciel MPN calculator (MPN calculator build 23, Myke Curiale). Le nombre le plus probable (NPP) est une estimation statistique du nombre de bactéries par unité de volume (CFU.ml⁻¹). L'utilisation de la table NPP permet de transformer les données de la méthode d'isolement sur MSR/V qui sont qualitatives en données quantitatives.

II.8. Identification des salmonelles

Sur MSR/V, les salmonelles poussent sous forme de colonies blanches. Les salmonelles mobiles migrent autour de la colonie blanche. Au cours des lectures, nous nous sommes confrontés à des cas de colonies blanches sans migration. Des tests d'identification ont été réalisés afin de voir si ces colonies blanches sont bien des salmonelles mais qui ont perdu leur capacité de migration sur MSR/V.

Tableau V : Caractéristiques morphologiques et biochimiques de *Salmonella*

Milieux	Caractères biochimiques	<i>Salmonella</i>
Milieu Hajna-Kligler	Glucose	+
	lactose	-
	gaz	+
	H ₂ S	+
ONPG	ONPG	-
Milieu urée-indole	urée	-
	indole	-
Milieu citrate de Simmons	Citrate de Simmons	+
Milieu mannitol mobilité	mannitol	+
	mobilité	+

La coloration de Gram est une technique qui permet de mettre en évidence les caractères morphologiques (forme et taille) des bactéries. La souche de *Salmonella* peut être confondue avec certaines Entérobactéries, de par la similitude de certains de leurs caractères biochimiques. Ce sont *Citrobacter*, *Edwardsiella tarda*, *Proteus vulgaris et mirabilis*. Des tests de présomption sont donc effectués dans le but d'identifier les caractères de genre de *Salmonella*.

Les caractéristiques morphologiques et d'identification biochimiques qui conduisent à une suspicion de *Salmonella* sont résumées dans le tableau V.

II.8.1. Coloration de Gram

Des frottis sont réalisés avec une colonie migrante sur MSR/V sur des lames propres et sèches. Sur ces frottis, le réactif violet de gentiane est ajouté durant quelques secondes puis rincé à l'eau. Par la suite la lame est recouverte de quelques gouttes de réactif lugol pendant 1 minute. L'excès de lugol est rincé à l'alcool. Enfin, la lame est recouverte de quelques gouttes de fuchsine durant 1 minute. Après rinçage à l'eau, séchage à la flamme et ajout de quelques gouttes d'huile à immersion, la lame est observée au microscope optique, à objectif 100. Le détail du protocole est présenté en annexe 1.

La coloration rose des bactéries et leur forme en bacille indique qu'il y a présence de bactéries bacilles Gram négatif.

II.8.2. Etat frais

L'état frais est une étape qui permet de mettre en évidence le type de mobilité et la forme des bactéries. Pour cela, une goutte d'eau distillée est déposée sur une lame porte objet. Une partie de la colonie est prélevée et déposée puis bien étalée sur la lame à l'aide d'une anse. La lame est recouverte d'une lamelle couvre-objet et l'observation est faite au microscope optique avec les objectifs 10 puis 40. L'apparition de bacille mobile indique la présence des bactéries mobiles.

II.8.3. Identification biochimique

Pour effectuer cette identification du genre, nous avonsensemencé une galerie de quatre milieux d'identification : Hajna-Kligler, Urée Indole, Citrate de Simmons et Mannitol mobilité.

II.8.3.1. Milieu Urée-indole (orange)

1 ml de ce milieu (Annexe 2) est introduit dans un tube à hémolyse stérile. Une partie d'une colonie est prélevée et dispersée. La lecture se fait après incubation à 37°C durant 24 heures. La couleur du milieu reste inchangée pour les souches uréase négatives. Dans le cas contraire, il vire au rose.

Pour mettre en évidence la production d'indole, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées. La dégradation du tryptophane est marquée par l'apparition d'un anneau jaune, pour les salmonelles qui sont indole négatif. Dans le cas contraire, un anneau rouge apparaît.

II.8.3.2. Milieu Hajna-Kligler

La gélose (Annexe 2) estensemencée à partir de la colonie, par piqûre centrale dans le culot et par stries d'épuisement au niveau de la pente. Le tube est incubé à 37°C pendant 24 heures. La décoloration de la pente, la coloration du culot en jaune, la mobilité du milieu et

l'apparition de colorations noires indiquent que la colonie présente les caractéristiques de lactose -, glucose +, gaz + et H₂S+ respectivement.

II.8.3.3. Milieu citrate de Simmons

Cette gélose (Annexe 2) est ensemencée comme dans le cas de Hajna-Kligler. Le virage de l'indicateur de pH du vert au bleu indique qu'il y a eu alcalinisation du milieu et donc que la souche est citrate +.

II.8.3.4. Milieu Mannitol mobilité

Cette gélose est ensemencée à partir de la colonie, par piqûre centrale à l'aide d'une cœse. Le tube est incubé 24 heures à 37°C. La coloration du milieu en jaune et l'apparition d'un trouble mobile indiquent respectivement que la souche est mannitol + et mobilité +.

II.9. Calcul de la réduction bactérienne

A partir des concentrations bactériennes mesurées pour une condition expérimentale donnée (type de traitement, durée de conservation) et exprimées en log cfu.cm⁻², une concentration bactérienne moyenne est calculée.

La réduction bactérienne (R_t) calculée après traitement à l'instant t est la différence entre la concentration bactérienne déterminée sur les peaux témoins à l'instant t (C_{0t}) et la concentration bactérienne déterminée sur les peaux traitées à l'instant t (C_t), selon l'équation (Eq6).

$$R = C_{0t} - C_t \quad (\text{Eq6})$$

C , la concentration bactérienne (log₁₀ CFU.cm⁻²)

t peut prendre les valeurs suivantes :

$t=T0$: dénombrement immédiatement après traitement

$t=T7$: dénombrement après 7 jours de stockage.

A partir des réductions bactériennes pour une condition expérimentale donnée (type de traitement, durée de conservation) et exprimées en log cfu.cm⁻², une réduction bactérienne moyenne est calculée.

II.10. Analyses statistiques

Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Statgraphics centurion XV (StatPoint, inc.). L'analyse de variance ANOVA permet de savoir s'il y a un effet significatif des traitements sur la concentration bactérienne à la surface de la peau.

Si les traitements ont un effet significatif, la comparaison des différents traitements entre eux est réalisée selon la procédure de la plus petite différence significative de Fisher (LSD, least Significant Difference), avec un seuil de confiance de 95%.

Tableau VI : Concentration en *Salmonella* des peaux de poulet simplement inoculées et des peaux inoculées et rincées.

Echantillons	Nombre de répétitions	Concentration bactérienne (log ₁₀ CFU.cm ⁻²) (Moyenne ± écartype)	
		MSRV	XLD
Peaux de poulet simplement inoculées	4	> 10,6	7,2 ± 0,3
Peaux de poulet inoculées puis rincées	4	7,1 ± 0,4	6,3 ± 0,4

III. RESULTATS ET DISCUSSIONS

Dans une première partie, les résultats de l'étude sur l'effet d'un rinçage après inoculation seront présentés et discutés.

La deuxième partie visera à présenter et discuter les effets d'un traitement thermique à 100°C pendant 8 secondes, d'un traitement avec de l'acide lactique à 5% (1 minute de mise en contact) et d'un traitement combinant les deux. L'efficacité de ces trois types de traitements sera mesurée immédiatement après traitement et après 7 jours de conservation et en évaluant l'impact d'un rinçage post traitement acide sur l'efficacité des traitements acide et combiné.

Enfin, l'efficacité des différents traitements et l'intérêt de combiner les deux traitements seront évaluées.

III.1. Effet d'un rinçage après inoculation sur la quantité de salmonelles fixées à la surface de la peau.

Cette étude est réalisée dans le but de comparer la concentration en salmonelles des peaux simplement inoculées et celle des peaux inoculées et rincées. En effet, dans les essais à venir, des traitements de décontaminations constitués d'un traitement thermique, d'un traitement acide et d'une combinaison des deux traitements seront effectués. Dans le cas du traitement thermique, le témoin doit être une peau simplement inoculée. Pour les traitements acide et combiné, le témoin doit être une peau inoculée puis mise en contact avec de l'eau en quantité égale à la quantité de solution acide utilisée pour les traitements acide et combiné. L'objectif est de voir s'il est possible d'alléger le protocole opératoire en faisant un seul type de témoin.

8 échantillons de peaux de poulet sont inoculés de suspension bactérienne de *Salmonella* Enteritidis. Quatre de ces échantillons sont rincés à l'eau physiologique. Ils sont dénombrés sur deux milieux différents (XLD et MSRV). Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau VI.

Les dénombrements sur le milieu XLD montrent que les peaux de poulet simplement inoculées présentent une concentration en *Salmonella* moyenne de $7,2 \pm 0,3 \log_{10}$ CFU.cm⁻². Celle-ci est donc supérieure à la concentration bactérienne des peaux de poulet inoculées puis rincées ($6,3 \pm 0,4 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) mais la différence reste inférieure à 1 log₁₀.

Les résultats des dénombrements sur le milieu MSRV sont très différents de ceux issus des dénombrements sur le milieu XLD notamment pour les peaux de poulet simplement inoculées dont la charge bactérienne, dénombrée sur MSRV, est supérieure à $10,6 \log_{10}$ CFU.cm⁻². Celle des peaux de poulet inoculées puis rincées est de $7,1 \pm 0,4 \log_{10}$ CFU.cm⁻² (résultat conforme à ceux de Lecompte (2008) sur des peaux inoculées et rincées selon le même protocole et dont la concentration a été déterminée par dénombrement sur le milieu MSRV) soit une concentration supérieure à celle trouvée par dénombrement sur le milieu XLD.

La différence des résultats obtenus selon le type de dénombrement peut s'expliquer par le fait que le dénombrement sur MSRV, du fait du passage par un bouillon nutritif pendant 24h à 37°C, permet de restaurer le pouvoir de multiplication des bactéries stressées après le rinçage alors que ce n'est pas le cas pour le dénombrement avec XLD pour lequel aucune étape de pré enrichissement n'est réalisée.

Le rinçage a donc peu d'effet sur la concentration bactérienne des peaux de poulet inoculées lorsque celle-ci est dénombrée sur XLD. Le faible effet du rinçage pourrait s'expliquer par le fait que le rinçage n'élimine que les bactéries accrochées superficiellement à la surface de la peau de poulet alors que celles qui sont dans les follicules restent intactes.

Par contre, il diminue d'au moins $3,5 \log_{10}$ la concentration bactérienne des peaux inoculées lorsque celle-ci est dénombrée sur MSR.V. Le rinçage éliminerait donc principalement les flores stressées qui ont perdu leur capacité de se multiplier et d'adhérer. On entend par bactéries stressées, des bactéries ayant perdu leur potentiel de multiplication et d'adaptation au milieu ; dès lors que les bactéries sont « revivifiées », elles retrouvent notamment le pouvoir de développer des pili qui lui permettent de se fixer plus solidement au milieu qui les environne.

L'effet du rinçage sur la quantité de *Salmonella* fixée juste après inoculation étant faible, il est donc possible de réaliser un seul type de témoins. De plus, afin de ne pas surestimer l'efficacité immédiate des traitements, il paraît plus judicieux de calculer leurs effets à partir de témoins pour lesquels les bactéries qui ont perdu leur capacité d'adhésion et de multiplication ont été éliminées. Il a donc été décidé de réaliser uniquement des témoins inoculés/rincés dans la suite des expériences.

Cependant, il est probable que dans ces conditions, l'effet du traitement thermique après 7 jours de conservation soit sous estimé. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait nécessaire de réaliser des dénombrements sur XLD et MSR.V de témoins inoculés et inoculés/rincés après 7 jours de conservation.

III.2. Traitements de décontamination 100°C, 8 secondes et/ou 5%,1 minute

Afin d'évaluer l'efficacité des traitements de décontamination de la surface de peau de volaille inoculée par *Salmonella* Enteritidis, deux plans expérimentaux sont menés.

Le premier plan consiste à effectuer les traitements thermiques à 100°C durant 8 secondes, les traitements chimiques à l'acide lactique de concentration 5% v/v durant une minute de contact avec la surface de la peau de volaille. Les traitements combinés ne sont que la combinaison des deux premiers traitements. Ce plan est réalisé afin de quantifier l'effet bactéricide de l'acide lactique et l'effet du traitement thermique et leur éventuel effet d'interaction au niveau du traitement combiné.

Dans des travaux antérieurs, le traitement thermique de 10 secondes à 100°C a montré, face aux salmonelles, une efficacité telle que les concentrations bactériennes après traitement sont inférieures au seuil de détection. Dans ces conditions, il est impossible de quantifier une éventuelle action complémentaire de l'acide lactique dans le cas du traitement combiné. De plus, McCann *et al.* (2006) ont noté qu'un traitement thermique de 10 secondes à 100°C ou plus entraîne des effets indésirables sur la surface de la viande (apparence de viande cuite).

Lecompte (2008) a montré que des peaux de poulet mises en contact avec des solutions d'acide lactique de concentrations de 2% durant une minute ou 2% durant 30 minutes ou 10% durant une minute présentent des teneurs résiduelles en acide lactique égale à celles de peaux non traitées ($90 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-2}$) et non perceptibles par un jury de dégustateurs. Pour un traitement à 10% durant 30min, la teneur résiduelle est plus élevée et devient perceptible. De plus, Battista *et al.* (1996) ont montré qu'une concentration en acide lactique élevée (< 4,25%) a provoqué la décoloration de la peau des carcasses de dinde et a entraîné des réactions d'oxydations.

Tableau VII : Concentrations en *Salmonella* Enteritidis et réductions décimales observées à T0 et T7 après des traitements thermiques à 100°C pendant 8 s et/ou des traitements à l'acide lactique 5% pendant 1 min.

Traitements	Nombre de répétitions		Concentration bactérienne (valeur moyenne \pm écartype) à la surface de la peau (\log_{10} CFU*cm ⁻²)		Réduction décimale moyenne (\log_{10} CFU.cm ⁻²)		Nombre de répétitions inférieures au seuil de détection (sur 10 répétitions)	
	T0	T7	T0	T7	T0	T7	T0	T7
Témoin	10	10	7,1 \pm 0,4 ^a	7,3 \pm 0,8 ^a	-	-	0	0
Acide (5%, 1min)	10	10	5,7 \pm 0,7 ^b	4,3 \pm 2,1 ^c	1,5 \pm 0,7 ^f	3,1 \pm 2,1 ^g	0	1
Thermique (100°C, 8s)	10	10	2,7 \pm 1,3 ^d	3,5 \pm 2,4 ^{cd}	4,5 \pm 1,3 ^h	3,8 \pm 2,4 ^{gh}	0	1
Combiné (100°C, 8 s ; 5%, 1min)	10	10	0,9 \pm 0,9 ^e	0,7 \pm 1,6 ^e	6,2 \pm 0,9 ⁱ	6,6 \pm 1,6 ⁱ	4	6

Des valeurs suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (au seuil de 5%).

Tableau VIII : Concentrations en *Salmonella* Enteritidis et réductions décimales observées à T0 et T7 après des traitements à l'acide lactique 5% pendant 1 min et des traitements combinés (100°C pendant 8 s puis traitement à l'acide lactique 5% 1 min) suivis ou non d'un rinçage.

Traitements	Nombre de traitements		Concentration bactérienne (valeur moyenne \pm écart-type) à la surface de la peau (\log_{10} CFU.cm ⁻²)		Réduction décimale moyenne (\log_{10} CFU.cm ⁻²)		Nombre de répétitions inférieures au seuil de détection (sur 10 répétitions)	
	T0	T7	T0	T7	T0	T7	T0	T7
Témoin	9	9	6,9 \pm 0,5 ^a	7,2 \pm 0,7 ^a	-	-	0	0
Acide (5%, 1min)	9	9	5,3 \pm 1,0 ^b	2,7 \pm 2,1 ^c	1,7 \pm 1,0 ^e	4,5 \pm 2,1 ^f	0	1
Acide rincé (5%, 1min)	9	9	5,2 \pm 1,5 ^b	4,5 \pm 2,2 ^b	1,7 \pm 1,5 ^e	2,7 \pm 2,2 ^e	0	1
Combiné (100°C, 8 s, 5%, 1min)	9	9	0,7 \pm 0,7 ^d	0,6 \pm 0,7 ^d	6,2 \pm 0,7 ^g	6,6 \pm 0,7 ^g	3	5
Combiné rincé (100°C, 8 s ; 5%, 1min)	9	9	1,1 \pm 1,2 ^d	1,4 \pm 1,6 ^d	5,8 \pm 1,2 ^{fg}	5,8 \pm 1,6 ^{fg}	2	3

Des valeurs suivies d'une lettre différente sont significativement différentes (au seuil de 5%).

Aussi, dans le souci de ne pas réaliser des traitements thermiques et acides trop drastiques qui, d'une part, auraient une efficacité telle qu'ils ne permettraient pas d'observer de bénéfices liés à la combinaison des deux et, d'autre part, entraîneraient des modifications des propriétés organoleptiques, il est décidé d'effectuer un traitement thermique de 8 secondes à 100°C et /ou un traitement avec de l'acide lactique à une concentration de 5% avec 1 minute de mise en contact.

Dans l'objectif de suivre les exigences de l'AESA, un deuxième plan est réalisé. Il consiste à effectuer des traitements acides et combinés rincés à l'eau distillée stérile sans modifier les différentes conditions de traitements du premier plan.

Les concentrations bactériennes et les réductions bactériennes obtenues pour les différents traitements sont résumées dans les tableaux VII et VIII. L'ensemble des résultats expérimentaux est présenté en annexe 3.

III.2.1. Effet du traitement acide (5% durant une minute)

Les résultats montrent qu'immédiatement après le traitement acide, la concentration bactérienne des peaux de poulet ($5,7 \pm 0,7 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) est significativement inférieure à celle des peaux témoins ($7,1 \pm 0,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$). La réduction bactérienne obtenue ($1,5 \pm 0,7 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) est plus élevée que celle obtenue sur *Listeria* dans les mêmes conditions ($0,71 \pm 0,14 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) (Lecompte, 2008). Cette différence pourrait être en partie liée aux méthodes de dénombrement. En effet, dans le cas de *Salmonella*, le passage par un bouillon nutritif pendant 24h à 37°C, permet de restaurer le pouvoir de multiplication des bactéries stressées alors que le dénombrement de *Listeri*, ne comprend pas d'étape équivalente. De plus, la différence d'efficacité des traitements acides sur des genres différents a été mise en évidence par plusieurs auteurs. Handin et al. (1995) et Dubal et al. (2004), cités par Annang et al. (2007), ont montré que *Salmonella* spp est plus résistante que *E Coli*. Pour un même genre, Kanellos et Burriel (2005) montrent que *S. Enteritidis* résiste plus longtemps que les deux autres sérotypes testés (*S. Typhimurium* and *S. Indiana*) à un traitement à l'acide lactique 1,5%.

Après 7 jours de stockage à 4°C, la réduction bactérienne obtenue $3,1 \pm 2,1 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$, est significativement supérieure à celle observée immédiatement après le traitement. Ces résultats montrent que dès le premier jour, l'effet inhibiteur de l'acide lactique sur les salmonelles est très faible. Il faut donc du temps pour que l'acide lactique pénètre à travers la cellule bactérienne. A l'intérieur, le pH intracellulaire provoque la dissociation de l'acide et entraîne une augmentation des ions H⁺ qui, au cours du temps de stockage, entraînent la baisse du pH interne. Ce pH interne n'est pas favorable à la croissance des bactéries pathogènes et induit leur réduction.

Cet effet de rémanence du traitement acide a été confirmé par plusieurs auteurs sur différentes bactéries. Ainsi Özdemir *et al.* (2006) cités par Annang *et al.* (2007) ont observé une réduction bactérienne immédiate de $0,70 \log_{10}$ sur la viande de bœuf inoculée avec *S. Typhimurium* après un traitement à l'acide lactique 2% de durée de traitement très courte que la durée traitement minimum (10 minutes) utilisée par Annang *et al.*(2007). Après 5 jours de stockage à 4°C, ils indiquent une augmentation de la réduction bactérienne de $1,14 \log_{10}$. Avec des peaux de poulet inoculées avec *Listeria innocua* puis traitées avec une solution d'acide lactique à 5% durant une minute, Lecompte (2008) a observé une augmentation de la réduction bactérienne au cours du stockage (elle atteint $2,54 \pm 0,72 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ après 7 jours).

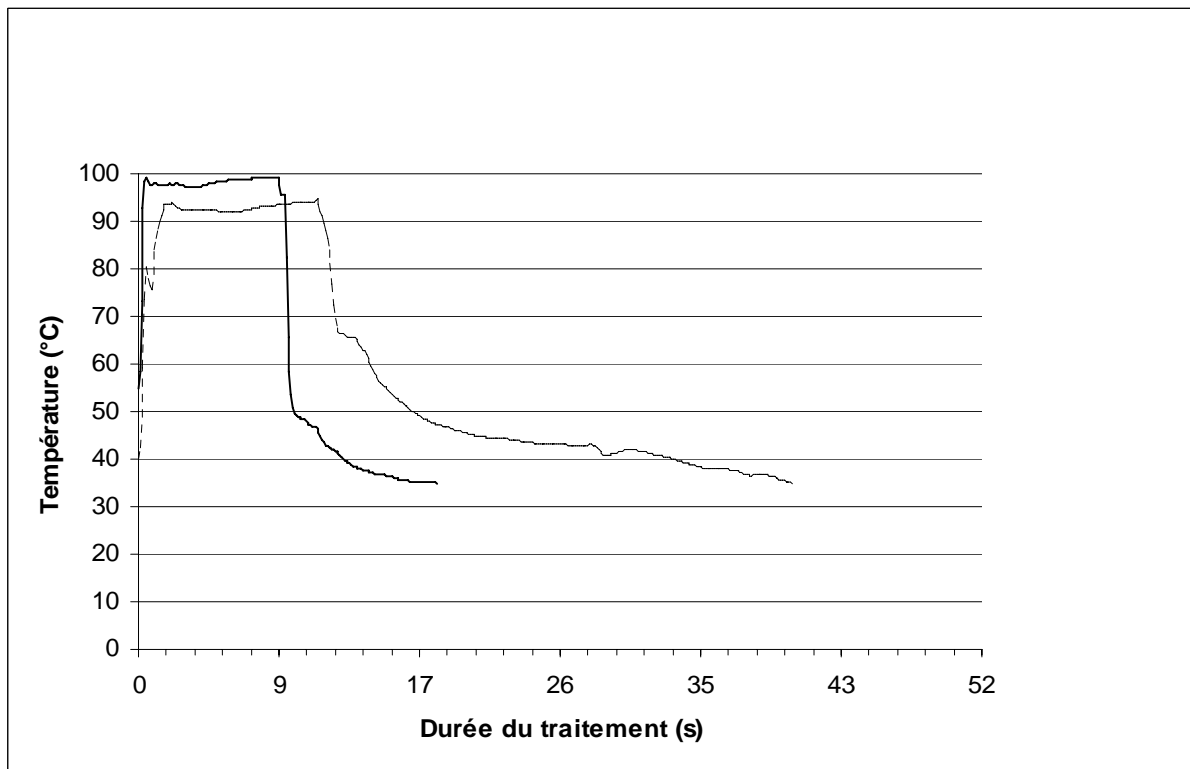


Figure 7 : Evolution de la température mesurée par un thermocouple placé à la surface de peau de poulet (trait noir gras) et lors d'un essai à vide (trait clair) lors d'un traitement thermique à 100°C durant 8 secondes.

Tableau IX : Caractéristiques des essais effectués lors des traitements thermiques (valeur moyenne \pm écart-type).

Nombres d'essais	Température maximale atteinte (°C)	Durée traitement thermique (secondes)	Durée du refroidissement (secondes)
40	90,5 \pm 7,0	12,0 \pm 2,8	2,5 \pm 2,2

III.2.2. Traitement thermique

III.2.2.1. Température de surface de la peau de volaille

Sur 40 essais effectués, les données obtenues à partir de l'acquisition de la température de surface lors des traitements thermiques à 100°C durant 8 secondes (Figure 7 et Tableau IX) ont permis de caractériser le dispositif. En effet, la moyenne de la température maximale atteinte est de $90,5 \pm 7,0^\circ\text{C}$. Cette valeur dépend de la profondeur atteinte par le thermocouple lorsque celui-ci est piqué dans la peau, paramètre non contrôlable avec notre dispositif, et de la formation de gouttes de condensats. Aussi, elle présente une variation élevée mais les essais réalisés à vide (thermocouple à la même localisation mais sans contact avec aucune surface) (Figure 7) montrent que l'échantillon est bien exposé à une température de 100°C dès lors qu'il est introduit dans l'enceinte. La durée du traitement thermique est de $12,0 \pm 2,8$ secondes.

La durée de refroidissement (temps mis pour atteindre une température inférieure à 55°C à partir du moment où l'échantillon est sorti de l'enceinte) est de $2,5 \pm 2,2$ secondes. Là encore, une variabilité importante est mesurée du fait de la difficulté de mesure de la température de surface de la peau.

III.2.2.2. Effet du traitement thermique

Le traitement thermique de 8 secondes à 100°C effectué permet d'enregistrer une réduction bactérienne significative au regard de *Salmonella* fixée à la surface de la peau de poulet. Un traitement de 8 secondes permet de diminuer immédiatement la concentration bactérienne de $7,1 \pm 0,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à $2,7 \pm 1,3 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ soit une réduction bactérienne de $4,5 \pm 1,3 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$.

L'efficacité de cette réduction bactérienne est liée au couple de temps-température du traitement. Cette réduction est légèrement supérieure à celle obtenue par Lecompte (2008). Il observe une réduction bactérienne immédiate de $3,7 \pm 1,1 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ pour des peaux de poulet inoculées avec la même souche de *Salmonella* Enteritidis pour la même température de traitement mais une durée de traitement de 10 secondes. Dans le cas de *Listeria innocua*, après un traitement de 10 secondes à 98°C, il observe une réduction de $4,1 \pm 0,8 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ et la concentration bactérienne est inférieure au seuil de détection dans 4 cas sur 10. Il souligne également que cette réduction décimale est plus importante que celle décrite dans la littérature par Kondjoyan et Portanguen (2007) avec la même souche bactérienne et dans les mêmes conditions expérimentales. Il faut noter qu'elle est inférieure de 1 \log_{10} à celle obtenue par Mc Cann *et al.* (2006). Ces derniers ont observé une réduction immédiate de la concentration bactérienne de 7-8 $\log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à $1,9 \pm 0,8 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ sur la surface de peau de poulet inoculée avec *Salmonella* Typhimurium DT104 et une réduction plus faible dans le cas de *E.coli* O157:H7 ($3,91 \pm 0,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) pour un traitement de 30 secondes à 87°C avec de la vapeur à 100°C.

Les écart-types plus importants obtenus avec le traitement thermique peuvent être expliqués par le fait que l'efficacité du traitement en vapeur sèche peut être corrélés à l'épaisseur de la peau dans le cas d'un traitement court ($\leq 10\text{s}$) (Kondjoyan et Portanguen, 2007 cités par Lecompte (2008)). Ils ont observé que dans le cas d'un traitement de 30s l'inactivation la moins importante correspondait à la peau la plus épaisse (1,9 mm) sans que ce facteur ne se traduise par une différence de température de surface (Lecompte, 2008).

Après la conservation à 4°C, la concentration bactérienne est significativement réduite de $7,3 \pm 0,8 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à $3,5 \pm 2,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$. Il faut noter que la réduction bactérienne obtenue le jour du traitement n'est pas significativement différente de la réduction bactérienne après le 7^{ème} jour de stockage ($3,8 \pm 2,1 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$). Toutefois, le nombre de répétitions présentant des concentrations bactériennes inférieures au seuil de détection est augmenté de 1/10 au cours du stockage. Dans les mêmes conditions de stockage, Lecompte (2008) a observé également que la concentration bactérienne est significativement diminuée de $6,9 \pm 0,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à $4,6 \pm 0,8 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ suite à un traitement de 10 secondes à 100°C. Au cours du stockage, il observe également que la charge bactérienne n'a pas augmenté de manière significative par rapport à celle du jour du traitement. Cette faible croissance en *Salmonella* non significative peut être expliquée par la température de stockage de 4°C alors que les salmonelles sont des germes mésophiles qui se multiplient dans une gamme de température très large (5°C-46°C) avec un optimum de croissance qui se situe entre 35°C et 43°C (AFSSA, 2002).

Dans le cas général, une croissance bactérienne durant le stockage après un traitement thermique est décrite dans la littérature. James *et al.* (2000) observent une réduction de la concentration bactérienne de $5-6 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à $1,7 \pm 1,1 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ sur la peau de poulet inoculée avec *E.coli* O 80 suite à un traitement thermique de 10 secondes à 100°C. Ils constatent que cette différence reste inchangée au cours des 3 premiers jours de stockage à 3 ± 1°C. Au bout du 5^{ème} jour de stockage la charge bactérienne sur les peaux traitées n'est plus significativement différente de celle des peaux témoins mais les peaux traitées ne présentent aucun signe de détérioration organoleptique alors que les peaux de volaille non traitées se détériorent rapidement bien qu'elles soient dans les mêmes conditions de stockage. Des explications peuvent être avancées pour clarifier cette croissance bactérienne après le traitement thermique au cours du stockage. Certains expliquent que chez la plupart des espèces microbiennes, un traitement thermique de courte durée à des températures supérieures à l'optimum de croissance peut induire la synthèse de protéines spécifiques, appelées protéines de choc thermique (HSP). Ces protéines sont impliquées dans les mécanismes de réparation des dégâts causés par les chocs thermiques (Lecompte, 2008). De plus, Clark et Bailey (1968) et Thomson et Cox (1987), cités par James *et al.* (2000) indiquent que les traitements thermiques sur les viandes peuvent entraîner des modifications de la structure et de la surface de la viande et créer un environnement propice à la multiplication des bactéries et une détérioration rapide de la viande.

III.2.3. Effet du traitement combiné

Après le traitement combiné sur *Salmonella* Enteritidis (traitement thermique de 8 secondes à 100°C suivi d'un traitement acide de 1minute à 5%) la concentration bactérienne est significativement réduite de $7,1 \pm 0,4$ à $0,9 \pm 0,9 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ soit une réduction bactérienne de ($6,2 \pm 0,9 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$).

L'effet de traitements thermiques et acides combinés appliqués à des produits alimentaires est beaucoup moins étudié que l'effet des traitements appliqués séparément. Lecompte (2008) a observé une réduction bactérienne de $0,93 \pm 0,62$ à $5,7 \pm 0,6 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ à la surface de peaux de poulet inoculées avec *Listeria innocua* pour un traitement thermique de 15 secondes à 70°C suivi d'un traitement avec une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute. Sur des peaux inoculées avec *Salmonella* Enteritidis, il observe une réduction bactérienne de $2,99 \pm 0,51 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$ après un traitement de 10 secondes à 100°C suivi d'un rinçage à l'acide lactique 5% pendant 1 minute. Mais ces réductions bactériennes sont très inférieures à celle obtenue dans notre étude. Cette différence de la réduction décimale peut être liée aux diffé-

rences de conditions opératoires (utilisation de peau congelée, probable mutation de la souche de *Salmonella* Enteritidis évoquée, traitement de 8 secondes) dans les essais de Lecompte (2008).

Au bout de 7 jours de conservation, on observe une réduction bactérienne de $6,6 \pm 1,6 \log_{10}$ CFU.cm⁻² qui n'est pas significativement différente de celle obtenue le jour du traitement. Nos résultats sont conformes à ceux de Lecompte (2008) qui n'observe pas non plus de différence significative entre la réduction bactérienne observée le jour du traitement ($3,0 \pm 0,5 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) et celle observée après 7 jours de stockage ($3,7 \pm 1,6 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) dans des conditions proches (seule la durée de traitement est de 10s au lieu de 8s dans notre étude). Par contre, dans le cas de *Listeria innocua*, la réduction bactérienne diminue de $0,93 \pm 0,6$ à $4,3 \pm 0,9 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) au cours du stockage pour un traitement thermique de 15 secondes à 70°C suivi d'un traitement avec une solution d'acide lactique à 5% durant 1 minute.

III.2.4. Influence du rinçage post traitement acide sur l'effet des traitements acide et combiné

Les concentrations bactériennes à la surface des témoins et des peaux ayant subi un traitement acide ou combiné (Tableau VIII), sont identiques aux résultats précédents (Tableau VII) que ce soit à T0 ou à T7.

Pour les analyses effectuées le jour du traitement, les résultats montrent que la réduction décimale bactérienne suite au traitement acide simple ($1,7 \pm 1,0 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) n'est pas significativement différente de celle obtenue après le traitement acide rincé ($1,7 \pm 1,5 \log_{10}$ CFU.cm⁻²).

De même, la réduction bactérienne suite au traitement combiné ($6,2 \pm 0,7 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) n'est pas significativement différente de celle issue du traitement combiné rincé ($5,8 \pm 1,2 \log_{10}$ CFU.cm⁻²).

A T0, le rinçage n'a donc pas d'effet sur la réduction bactérienne suite aux différents traitements acide et combiné.

Après 7 jours de conservation à 4°C, la réduction bactérienne après le traitement acide ($4,5 \pm 2,1 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) est significativement supérieure à celle obtenue avec le traitement acide rincé ($2,7 \pm 2,2 \log_{10}$ CFU.cm⁻²).

Par contre la réduction bactérienne obtenue avec le traitement combiné ($6,6 \pm 0,7 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) n'est pas significativement différente de celle réalisée suite au traitement combiné rincé ($5,8 \pm 1,6 \log_{10}$ CFU.cm⁻²).

III. 2.5. Comparaison des différents traitements

Immédiatement après traitement, la réduction bactérienne obtenue avec le traitement combiné ($6,2 \pm 0,9 \log_{10}$ CFU.cm⁻²) est supérieure à celle du traitement thermique simple ($4,5 \pm 1,3 \log_{10}$ CFU.cm⁻²), lui-même plus efficace que le traitement acide pour lequel une réduction de $1,5 \pm 0,7 \log_{10}$ CFU.cm⁻² a été obtenue. La réduction bactérienne observée avec le traitement combiné provient donc essentiellement de la partie thermique mais, contrairement à ce que Lecompte (2008) et Koutsomanis et al. (2004) avaient trouvé avec *Listeria innocua*, il semble que l'exposition à un choc thermique entraîne une plus grande efficacité du traitement acide. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que le traitement thermique provoque l'ouverture des pores épithéliaux et permette ainsi une forte pénétration de l'acide.

Après 7 jours de stockage à 4°C, la réduction bactérienne obtenue avec le traitement combiné ($6,6 \pm 1,6 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) est significativement supérieure de celles obtenues avec le traitement thermique ($3,8 \pm 2,4 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$), et acide simple ($3,1 \pm 2,1 \log_{10} \text{CFU.cm}^{-2}$) effectués séparément. Elle reste identique à celle observée immédiatement après traitement mais le nombre de répétitions inférieures au seuil de détection passe de 4 à T0 à 6 à T7. Le traitement acide n'est pas plus efficace que le traitement thermique puisque les réductions bactériennes relatives à ces deux traitements ne sont pas significativement différentes. Cependant, on note une augmentation significative de la réduction bactérienne au cours du stockage dans le cas du traitement acide alors qu'elles sont égales dans le cas du traitement thermique. Il semble donc que l'effet du traitement combiné provienne essentiellement de la partie acide du traitement. Au-delà, on observe là encore un véritable effet de synergie puisque l'effet du traitement combiné est supérieur à celui des traitements réalisés seuls.

L'effet de rémanence de l'acide observé au cours du stockage est diminué par le rinçage du fait sans doute de l'élimination de résidus d'acide lactique. Cependant, le rinçage n'a pas d'influence significative sur l'effet de rémanence de l'acide du traitement combiné même si la réduction bactérienne est légèrement plus faible dans le cas du traitement combiné rincé que dans le cas du traitement combiné. La persistance de l'effet de rémanence dans le cas du traitement combiné rincé peut s'expliquer par le fait que l'acide pénètre mieux dans les pores épithéliaux suite à l'effet du traitement thermique. Il faut noter que la densité de l'acide lactique (1,20) est légèrement supérieure à celle l'eau. Bien qu'il soit dilué, il reste surnagé par l'eau de rinçage à l'intérieure des pores. Lors de l'élimination de l'eau de rinçage, les pores retiendraient alors quelques résidus d'acide.

Le traitement combiné, même rincé, reste le plus efficace après 7 jours de conservation.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer l'efficacité de traitements thermique et / ou acide sur la décontamination de peaux de poulet. Pour cela, des peaux ont été inoculées avec une forte concentration en *Salmonella* Enteritidis ($9,2 \pm 0,5 \log \text{CFU.mL}^{-1}$) et traitées à la vapeur sèche et / ou à l'acide lactique.

Les traitements acides réalisés ne permettent pas d'obtenir une forte réduction bactérienne immédiate mais leur intérêt réside dans un effet de rémanence. Ainsi un traitement acide à 5% durant une minute permet d'obtenir après 7 jours de conservation à 4°C une réduction en *Salmonella* supérieure à $3 \log_{10}$.

La décontamination à la vapeur saturée à 100°C durant 8 secondes est très efficace et permet d'obtenir une réduction en *Salmonella* de plus de $4 \log_{10}$.

Les traitements thermiques et acides sont complémentaires. La vapeur saturée permet une réduction bactérienne immédiate de la peau de volaille mais, bien que la repousse de bactéries survivantes observée ne soit pas significative, il est certain que le traitement thermique n'assure pas de diminution supplémentaire au cours du stockage contrairement au traitement acide.

Le traitement combiné cumule les avantages de deux traitements : une forte décontamination immédiate liée à la partie thermique du traitement et un effet bactériostatique ou bactéricide durant le stockage lié à l'action de l'acide. Au-delà, il existe un véritable effet de synergie entre les traitements thermique et acide que ce soit immédiatement après traitement ou après 7 jours de stockage.

Le rinçage diminue de façon significative l'efficacité du traitement acide au cours du stockage mais ne modifie pas celle du traitement combiné.

Ces observations nous amènent à faire l'hypothèse que le traitement thermique provoquerait l'ouverture des pores épithéliaux permettant ainsi une forte pénétration de l'acide d'où la plus grande efficacité du traitement combiné par rapport aux traitements thermique et acide seuls. L'acide étant alors moins facilement éliminable, cette hypothèse pourrait expliquer que le traitement combiné rincé soit aussi efficace que le traitement combiné.

Une mesure des teneurs résiduelles en acide lactique des peaux traitées à l'acide puis rincées et des peaux ayant subi un traitement combiné puis un rinçage permettrait de vérifier ou non cette hypothèse.

Des observations en microscopie électronique pourraient permettre de vérifier que le traitement thermique a bien un effet sur la structure de la peau qui permettrait une plus importante pénétration de l'acide dans les follicules.

Dans les conditions industrielles, la maîtrise de la décontamination des peaux de volaille par un traitement combiné (à la vapeur sèche à 100°C durant 8 secondes et suivi d'une solution d'acide lactique à 5% pendant une minute) et/ou suivi d'un rinçage présente un grand intérêt du fait de la rapidité des traitements.

L'efficacité du traitement proposé reste à vérifier sur d'autres bactéries pathogènes, comme *Campylobacter* par exemple et sur la flore naturellement présente sur la carcasse qui pourrait montrer plus de résistance que les souches inoculées.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2004). Inventaire du réseau Salmonella sérotypage et sensibilité aux antibiotiques.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2002). Salmonella spp *Fiche Sécurité Alimentaire d'un Micro-Organisme*.
- Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (AFSSA) (2007). Avis sur un projet de règlement relatif à la décontamination des carcasses de volailles. Saisine n°2006-SA-0125.
- Alban L. (2004). Use of veterinary epidemiology to improve food safety along the food chain- an industry perspective. In: Smulders, F.J.M. and Collins, J.D. (Eds) International conference: Veterinary Public Health and Food Safety. Towards a Risk Based Chain Control. Rome, 22-23 October 2004. *Istituto Zooprofilattico Sperimentale, Rome*, 27-28.
- Anang D.M, G.Rusul, Bakar Jamilah, Ling Foo H., (2007) Effects of lactic acid and lauricidin on the survival of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritidis and *Escherichia coli* O157:H7 in chicken breast stored at 4°C. *Food Control* **18**: 961-969.
- Bautista D.A., Sylvester N., Barbut S., Griffiths M. W. (1996). The determination of efficacy of antimicrobial rinses on turkey carcasses using response surface designs. *International Journal of Food Microbiology* **34**:279-292.
- Bean N., Goulding J., Daniels M., Angulo F. (1997). Surveillance for foodborne disease outbreaks- United States, *J. Food Prot.*, 1265-1286.
- Brulhet B. (2007). La décontamination des carcasses de volailles face aux traitements antimicrobiens. Les professionnels de la filière demeurent vigilants, 133-134.
- Commission Européenne, Direction générale de la santé et de la protection des consommateurs (2005), Règlement (CE) n°853/2004 du Parlement Européen et du Conseil de l'Union Européenne du 29 avril 2004 sur l'hygiène des denrées alimentaires d'origine animales. *Guidance_doc_853-2004_fr UE.pdf*. 21 décembre 2005, 21.
- Daube G. Van Loock F. (1997). Surveillance des toxi infections d'origine alimentaire en Belgique. *Arch. Public Health*, 351-361.
- Deumier François (2004). Pulsed-vacuum immersion of chicken meat and skin in acid solutions. Effects on mass transfers, colour and microbial quality. *International Journal of Food Science and Technology*, 277-286.
- Gonzalez-Fandos, E., Dominguez J. L. (2006). Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage *Journal of Applied Microbiology* **101**: 1331-1339.
- Hwang C., Beuchat L. R. (1995), Efficacy of lactic acid/ sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw chicken. *International Journal of food Microbiology* **27**: 91-98.
- International Commission on Microbiological specifications for foods (ICMSF), (1996), Microorganismes in foods. Characteristics of microbial pathogens. *Blackie Academic & professional 5: London* , 217-264.
- James C. Göksoy E.O., Corry J.E.L., James S.J. (2000). Surface pasteurisation of poultry meat using steam at atmospheric pressure. *Journal of Food Engineering* **45**:111-117.
- Jangho K. Douglas L. M. (2000). Lactic acid inactivation of *Salmonella typhimurium* attached to catfish skin, *Journal of Food Safety*, **20**, 53-64.

- Kanellos T. S., Burriel A. R. (2005). The in vitro bactericidal effects of the food decontaminants lactic acid and trisodium phosphate. *Food Microbiology* **22**: 591-594.
- Kondjoyan A. Portanguen S. (2008). Prediction of surface and under surface temperatures on poultry muscle and poultry skin subjected to jet of superheated steam. *Food Research International* **41**:16-30.
- Koutsmanis K.P., Kendall P.A, Sofos J.N. (2004). Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and a_w limits for growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* **104**:83-91.
- Lecompte JY. (2008). Décontamination de peaux de volailles par utilisation d'une solution d'acide lactique et de la vapeur d'eau. Thèse, Université de la Réunion, France.
- Mc Cann M.S., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair I.S. (2006). Effects of steam pasteurisation on Salmonella Typhimurium DT104 and Escherichia coli O157:H7 surface inoculated onto beef, pork and chicken. *Journal of Food Engineering* **76**:32-40.
- Murphy R.Y., Duncan L.K., Beard B.L., Driscoll K.H. (2003). D and Z values of *Salmonella*, *Listeria innocua*, and *Listeria monocytogenes* in fully cooked poultry products. *Journal of Food Science* **68**, 1443-1447.
- Murphy R.Y., Marks B.P., Johnson E.R., Johnson M.G. (2000). Thermal inactivation kinetics of Salmonella and Listeria in ground chicken breast meat and liquid medium. *Journal of Food Science* **65**: 706-710.
- Orta-Ramirez A., Marks B.P., Warsow C.R., Booren A.M., Ryser E.T. (2005). Enhanced thermal resistance of salmonella in whole muscle compared to ground beef. *Journal of Food Science* **70**: 359-362.
- Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne (1993). Directive 92/177/CEE du conseil du 17 décembre 1992 concernant les mesures de protection contre certaines zoonoses et certains agents zoonotiques chez les animaux et les produits d'origine animale, en vue de prévenir les foyers d'infection et d'intoxication dus à des denrées alimentaires. *J. Off. Comm. Eur.*, 15 mars 1993, L062, 38-48.
- Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne (2001). Report to the European Parliament and to the Council on the measures to be put in force for the control and prevention of Zoonoses – Proposal for a directive of the European Parliament and of the Council on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents, amending Council Decision 90/424/EEC and repealing Council Directive 92/117/EEC- Proposal for Regulation of the European parliament and of the Council on the control of Salmonella and other foodborne zoonotic agents and amending Council Directives 64/432/EEC, 72/462/EEC and 90/539/EEC, COM. 452 Final, 01.08.2001.
- Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne (2003a). Règlement (CE) n°2160/2003 du conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire. *J. Off. Comm. Eur.*, 12 décembre 2003, L325, 1-15.
- Parlement Européen et Conseil de l'Union Européenne (2003b), Directive 2003/99/CE du conseil du 17 septembre 2003 sur la surveillance des zoonoses et des agents zoonotiques, mo-

diffiant la décision 90/424/CEE du conseil et abrogeant la directive 92/177/CEE du conseil. *J. Off. Comm. Eur.*, 12 décembre 2003, L325, 31-40.

Pipek Petr, Hous Ka M., Hoke K., Kova J.J., Ky hos K., S ikulova M. (2006) Decontamination of pork carcasses by steam and lactic acid. *Journal of food Engineering* **74**: 224-231.

Refrégier-Petton J., Kere K.G., Nebout J.M., Allo J.C., Salvat G.s (2003). Décontamination des carcasses de dindes à l'abattoir : effets sur les carcasses d'un traitement par immersion avec du chlorite de sodium acidifié et impacts sur la qualité microbiologique des pièces de découpe, Cinquième Journée de la Recherche Avicole, Tours.

Van Netten P., Valentijn A. Mossel D.A.A., Huis In't J.H.J. (1997). Fate of low temperature and acid-adapted *Yersinia enterocolitica* and *Listeria monocytogenes* that contaminate lactic acid decontaminated meat during chill storage. *Journal of Applied Microbiology* **82**: 769-779.

Van Netten P., Valentijn A. Mossel D.A.A., Huis In't J.H.J. (1998). The survival and growth of acid-adapted mesophilic pathogens that contaminate meat after lactic acid decontamination. *Journal of Applied Microbiology* **84**:559-567.

ANNEXE 1 : PRINCIPE DE LA COLORATION DE GRAM

La coloration s'effectue en deux ou trois temps.

Dans un premier temps, les bactéries sont colorées en violet par un colorant basique tel que le violet de gentiane puis par une solution de lugol (mordançage).

Dans un deuxième temps (étape de différenciation), les bactéries sont soumises à l'action de l'alcool (éthanol). Les bactéries se répartissent en deux catégories : celles qui conservent la coloration violette et qui sont qualifiées de bactéries à Gram positif et celles qui sont décolorées qui sont à Gram négatif.

Dans un troisième temps, afin de mieux visualiser les bactéries décolorées, on procède à un traitement par la fuchsine ou par la safranine. Les bactéries à Gram positif apparaissent alors violettes et les bactéries à Gram négatif se recolorent en rouge ou en orange.

Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram négatif, la paroi, riche en lipides laisse passer l'alcool (éthanol) qui décolore le cytoplasme alors que chez les bactéries à gram positif, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet.

ANNEXE 2 : MILIEUX

Milieu Hajna-Kligler

Le milieu Hajna-Kligler a une couleur rouge carmin. Ce milieu est sélectif des germes fermentaires. Il entre dans le cadre de l'étude du métabolisme glucidique et permet l'exploitation de quatre paramètres :

- La fermentation du glucose : en anaérobiose, la souche fermente le glucose. il y a formation d'acides organiques qui acidifient le milieu et entraînent le virage du culot du rouge au jaune.
- La fermentation du lactose (sur la pente) : elle se traduit aussi par une coloration jaune du milieu. Cette fermentation témoigne de la production d'une β -galactosidase qui hydrolyse le lactose en galactose et en glucose qui est ensuite utilisé comme source d'énergie. Les souches qui ne produisent pas de β -galactosidase (lactose (-)) ne peuvent acidifier le milieu, par conséquent ne peuvent faire virer la couleur de la pente qui reste rouge. Pour les souches lactose (-), il est nécessaire de faire le test à l'ONPG (ortho nitrophenyl-galactoside) pour confirmer qu'elles ne sont pas productrices de bêta-galactosidase. En effet certaines souches apparemment lactose (-) au vu de la couleur de la pente, peuvent être en réalité des souches lactose (+) qui n'arrivent pas à faire virer la couleur du milieu parce que le lactose ne peut pénétrer dans la cellule bactérienne et réagir avec l'enzyme. Le test de l'ONPG (analogue de lactose) a pour objectif de faire éclater les bactéries par choc osmotique dans l'eau distillée stérile. Dans ces conditions, l'enzyme qui y est présente dans la bactérie est libérée dans le milieu et réagit avec l'ONPG entraînant un changement de couleur. Dans le cas contraire un test négatif confirme que la souche est effectivement dépourvue de β -galactosidase.
- Production de gaz : dans le processus fermentaire du glucose, la décarboxylation du pyruvate est à l'origine d'un dégagement de dioxyde de carbone (CO_2) dont la pression dans le tube décolle la gélose. La souche est dite gaz (+). Par contre les bactéries dites gaz (-) ne produisent aucune trace de gaz.
- Production d'hydrogène sulfuré H_2S : elle est marquée par une coloration noire de la gélose issue de sa combinaison avec les ions ferriques. L'absence de production de H_2S ne provoque pas de coloration noire du milieu.

Milieu citrate de Simmons

Le milieu citrate de Simmons a une couleur verte. Il contient le citrate comme seule source de carbone. Les bactéries qui seront capables d'utiliser cette source de carbone, vont croître sur cette gélose et entraîner une variation de pH entraînant une coloration du milieu en bleu. La gélose reste verte pour les souches dites citrate (-).

Milieu Urée-indole

Le milieu urée-indole ou milieu urée tryptophane est milieu liquide orange. Il est constitué d'urée et de tryptophane. Il permet de rechercher trois activités enzymatiques du métabolisme protéique. Ces enzymes sont : l'uréase, la tryptophanase et la tryptophane désaminase.

- L'uréase hydrolyse l'urée pour donner du carbonate et de l'ammoniac responsables de l'alcalinisation du milieu qui vire au rose. La couleur jaune demeure pour les souches qui ne possèdent pas d'uréase active (uréase (-)). Ce milieu permet de distinguer le genre *Salmonella* (uréase négative donc pas de changement de coloration) du genre *Proteus* qui possède une uréase active et fait virer le milieu au rose.
- La tryptophanase dégrade le tryptophane pour donner l'indole. Après addition du réactif du Kovacs, le diméthyl-amino-4 benzaldéhyde qu'il contient réagit avec l'indole et forme un composé coloré en rouge (anneau rouge). Les souches incapables de provoquer une telle réaction sont dépourvues de tryptophanase et sont dites indole (-).
- La tryptophane désaminase (TDA) dégrade le tryptophane en acide indole pyruvique qui réagit avec le perchlorure de fer III ajouté pour donner un précipité brun foncé.

Milieu mannitol mobilité

Le milieu a une couleur rouge. Il contient le mannose comme source de carbone. Les bactéries qui dégradent le mannose en mannitol sont dites mannitol (+). Les bactéries très mobiles peuvent se déplacer dans la gélose molle. Elles sont dites mobilité (+).

Milieu MSR/V (milieu modifié semi-solide de Rappaport-Vassiliadis)

Le milieu MSR/V est une gélose verte semi-solide très molle. Sur cette gélose sont déposées les gouttes de milieu d'enrichissement sans être étalées et incubées à 42°C pendant 24-72 h en position non inversée. Ce milieu contient des peptones comme source de carbone et d'azote pour permettre la croissance et la reproduction des *Salmonella* qui ont subi un stress. Le chlorure de magnésium sert à augmenter la pression osmotique. La novobiocine (un supplément sélectif qui permet d'inhiber les contaminants Gram + et les proteus) et le vert de malachite inhibent la croissance des microorganismes qui ne sont pas des salmonelles. Le pH acide du milieu en association avec la novobiocine, le vert de malachite et le chlorure de magnésium de même que la température élevée d'incubation et l'utilisation de la mobilité des salmonelles permettent de sélectionner les souches de *Salmonella*.

Milieu XLD (Xylose Lysine Désoxycholate)

XLD est un milieu sélectif et différentiel utilisé pour l'isolement et l'identification des espèces *Salmonella* et *shigella*. Son pouvoir sélectif est attribué au désoxycholate de sodium (0,25%) qui inhibe la plupart des bactéries Gram positif et plusieurs bactéries intestinales. Son caractère différentiel est assuré par la présence de divers substrats : le thiosulfate de sodium, trois sucre (lactose, le xylose et le sucrose) et la lysine. Les *Salmonella* et les *Shigella* fermentent le xylose et décarboxylent la lysine. La production d'hydrogène sulfuré permet de différencier les *Salmonella* des *Shigella*. Le sulfure d'hydrogène réagit avec les ions ferriques du citrate ferrique pour produire un point noir au centre de la colonie.

ANNEXE 3 : RESULTATS EXPERIMENTAUX

Résultats expérimentaux relatifs à la partie sur l'étude de l'influence du rinçage sur la quantité de *Salmonella* fixée

DENOMBREMENT DES SAL-MONELLES SUR XLD

Témoins rincés

Description	Concentration bactérienne (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	6,57
Tem2	6,01
Tem3	6,72
Tem4	5,83
MOYENNE	6,28
ECARTYPE	0,43

Témoins non rincés

Description	Concentration bactérienne (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem nr1	7,18
Tem nr2	7,01
Tem nr3	6,95
Tem nr4	7,53
MOYENNE	7,17
ECARTYPE	0,26

DENOMBREMENT DES SAL-MONELLES SUR MSRV

Témoins rincés

Description	Concentration bactérienne (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	6,74
Tem2	7,57
Tem3	6,74
Tem4	7,21
MOYENNE	7,06
ECARTYPE	0,41

Témoins non rincés

Description	Concentration bactérienne (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem nr1	10,62
Tem nr2	10,62
Tem nr3	10,62
Tem nr4	10,62
MOYENNE	10,62
ECARTYPE	0

Résultats expérimentaux relatifs à la partie sur l'étude des effets des traitements thermiques (100°C, 8s) et / ou acide (5%, 1 min)

DENOMBREMENT A T0

TEMOIN T0	
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	6,94
Tem2	7,21
Tem3	6,94
Tem4	7,57
Tem5	7,58
Tem6	6,45
Tem7	6,94
Tem8	7,57
Tem9	6,90
Tem10	7,21
MOYENNE	7,13
ECARTYPE	0,37

DENOMBREMENT A T7

TEMOIN T7	
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	7,20
Tem2	7,95
Tem3	6,90
Tem4	5,47
Tem5	7,95
Tem6	7,03
Tem7	8,04
Tem8	7,95
Tem9	7,2
Tem10	7,54
MOYENNE	7,32
ECARTYPE	0,78

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT THERMIQUE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Th1	4,12	2,82
Th2	2,85	4,36
Th3	3,87	3,07
Th4	2,87	4,70
Th5	2,13	5,45
Th6	0,89	5,55
Th7	2,94	4,00
Th8	3,73	3,84
Th9	2,16	4,74
Th10	0,43	6,78
MOYENNE	2,60	4,53
ECARTYPE	1,22	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT THERMIQUE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Th1	6,74	0,47
Th2	2,28	5,67
Th3	0,74	6,16
Th4	1,89	3,58
Th5	3,54	4,41
Th6	0,05	6,98
Th7	6,94	1,10
Th8	5,94	2,01
Th9	3,54	3,66
Th10	3,54	4,00
MOYENNE	3,52	3,80
ECARTYPE	2,4	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT COMBINE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Comb1	0,43	6,51
Comb2	1,94	5,27
Comb3	0,19	6,75
Comb4	0,51	7,06
Comb5	1,40	6,19
Comb6	0,05	6,40
Comb7	1,09	5,85
Comb8	0,19	7,38
Comb9	1,20	5,71
Comb10	0,05	7,16
MOYENNE	0,70	6,43
ECARTYPE	0,66	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT COMBINE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Comb1	0,82	6,38
Comb2	0,05	7,9
Comb3	0,05	6,85
Comb4	5,2	0,27
Comb5	0,05	7,9
Comb6	0,05	6,98
Comb7	0,19	7,85
Comb8	0,05	7,9
Comb9	0,06	7,14
Comb10	0,51	7,03
MOYENNE	0,70	6,62
ECARTYPE	1,60	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT ACIDE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Ac1	7,21	-0,27
Ac2	5,45	1,76
Ac3	4,74	2,20
Ac4	5,63	1,95
Ac5	5,73	1,85
Ac6	5,02	1,43
Ac7	5,54	1,40
Ac8	6,45	1,13
Ac9	4,94	1,96
Ac10	5,94	1,27
MOYENNE	5,66	1,47
ECARTYPE	0,74	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT ACIDE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Ac1	5,2	2
Ac2	4,45	3,5
Ac3	0,05	6,85
Ac4	5,2	0,27
Ac5	5,2	2,74
Ac6	6,74	0,29
Ac7	6,2	1,83
Ac8	4,54	3,41
Ac9	1,36	5,84
Ac10	3,54	4
MOYENNE	4,25	3,07
ECARTYPE	2,09	

Résultats expérimentaux relatifs à la partie sur l'étude d'un rinçage post traitement acide sur l'efficacité des traitements acide et combiné

DENOMBREMENT A T0

TEMOINS T0	
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	6,57
Tem2	6,91
Tem3	7,57
Tem4	6,95
Tem5	6,95
Tem6	6,20
Tem7	6,91
Tem8	7,57
Tem9	6,53
MOYENNE	6,91
ECARTYPE	0,45

DENOMBREMENT A T7

TEMOINS T7	
Description	Concentration à la surface de la peau (log ₁₀ cfu.cm ⁻²)
Tem1	7,95
Tem2	6,95
Tem3	7,95
Tem4	5,95
Tem5	6,20
Tem6	7,57
Tem7	7,53
Tem8	7,38
Tem9	7,45
MOYENNE	7,21
ECARTYPE	0,71

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT COMBINE RINCE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Combr1	2,74	3,84
Combr2	0,13	6,78
Combr3	0,06	7,51
Combr4	0,57	6,37
Combr5	2,95	4,00
Combr6	0,05	6,15
Combr7	1,53	5,38
Combr8	1,53	6,04
Combr9	0,05	6,48
MOYENNE	1,07	5,84
ECARTYPE	1,17	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT COMBINE RINCE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
Combr1	0,05	7,90
Combr2	0,05	6,90
Combr3	3,95	4,00
Combr4	3,89	2,05
Combr5	0,05	6,15
Combr6	1,66	5,91
Combr7	1,89	5,64
Combr8	0,76	6,61
Combr9	0,05	7,40
MOYENNE	1,37	5,84
ECARTYPE	1,61	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT COMBINE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
comb1	0,53	6,04
comb2	0,05	6,86
comb3	1,74	5,83
comb4	0,05	6,90
comb5	0,05	6,90
comb6	0,87	5,33
comb7	0,95	5,97
comb8	1,88	5,69
comb9	0,06	6,47
MOYENNE	0,69	6,22
ECARTYPE	0,73	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT COMBINE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
comb1	0,36	7,59
comb2	0,05	6,90
comb3	1,28	6,67
comb4	0,67	5,28
comb5	0,05	6,15
comb6	1,75	5,82
comb7	0,05	7,48
comb8	1,37	6,01
comb9	0,05	7,40
MOYENNE	0,63	6,59
ECARTYPE	0,67	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT ACIDE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
ac1	5,53	1,04
ac2	5,89	1,02
ac3	6,91	0,66
ac4	3,95	3,00
ac5	5,53	1,41
ac6	5,20	1,00
ac7	4,95	1,97
ac8	4,76	2,81
ac9	4,53	2,00
MOYENNE	5,25	1,66
ECARTYPE	0,86	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT ACIDE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
ac1	0,05	7,90
ac2	1,20	5,74
ac3	5,89	2,05
ac4	1,68	4,27
ac5	4,95	1,26
ac6	1,52	6,05
ac7	4,53	3,00
ac8	0,76	6,61
ac9	3,74	3,71
MOYENNE	2,70	4,51
ECARTYPE	2,10	

DENOMBREMENT A T0

TRAITEMENT ACIDE RINCE T0		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
acr1	4,89	1,68
acr2	6,20	0,71
acr3	5,45	2,13
acr4	6,53	0,41
acr5	5,53	1,41
acr6	5,87	0,33
acr7	4,95	1,97
acr8	1,61	5,96
acr9	5,89	0,64
MOYENNE	5,21	1,69
ECARTYPE	1,45	

DENOMBREMENT A T7

TRAITEMENT ACIDE RINCE T7		
Description	Concentration à la surface de la peau (\log_{10} cfu.cm ⁻²)	Réduction décimale (\log_{10} cfu.cm ⁻²)
acr1	3,20	4,74
acr2	4,20	2,74
acr3	6,16	1,78
acr4	6,12	0,18
acr5	0,05	6,15
acr6	7,57	-
acr7	5,20	2,33
acr8	2,95	4,43
acr9	5,53	1,91
MOYENNE	4,56	2,66
ECARTYPE	2,12	

Caractéristiques des traitements thermiques (valeur moyenne \pm écart-type)

Répétitions	T° max (°C)	Durée de traitement	Durée de refroidissement	Durée totale
r1	87,6	9,2	8,6	0,6
r2	85,8	17,2	9,3	7,9
r3	99,4	9,9	8,4	1,5
r4	86,6	11,3	8,1	3,2
r5	94,7	16,4	9,8	6,6
r6	96,3	12	9,8	2,2
r7	80,7	18,2	14,2	4
r8	86,6	10,3	8,8	1,5
r9	94,1	13,9	9,7	4,2
r10	95,4	16,9	14	2,9
r11	95,7	11	8,5	2,5
r12	97,8	14,9	10,9	4
r13	89,4	11,2	9,5	1,7
r14	94,5	10,9	10,3	0,6
r15	88,8	17,4	8,6	8,8
r16	99,9	9,9	9,6	0,3
r17	90,6	12,8	8,7	4,1
r18	81,3	11,5	9,7	1,8
r19	78,2	11,7	9,3	2,4
r20	88,1	13,1	9,3	3,8
r21	98,2	9,5	7,6	1,9
r22	94,4	9,5	7,7	1,8
r23	93,7	9,7	8,3	1,4
r24	93,5	19,4	12,2	7,2
r25	92,5	15,5	10,6	4,9
r26	87,4	12,8	10,6	2,2
r27	96,4	11,3	9,1	2,2
r28	89,5	12,1	9,7	2,4
r29	88,5	10	8,5	1,5
r30	86,2	8,9	10,8	-1,9
r31	86,8	10,5	8,5	2
r32	93,4	9,1	8,1	1
r33	96,8	9,9	9,5	0,4
r34	82,2	10,6	7,8	2,8
r35	91,7	11,2	8,8	2,4
r36	88,9	10,8	8,4	2,4
r37	86,5	9,8	9,2	0,6
r38	94,9	9,8	9,2	0,6
r39	70,7	9,7	9,4	0,3
r40	94,4	9,8	9	0,8
MOYENNE	90,4525	11,99	9,45	2,5375
ECARTYPE	6,1971	2,836	1,44	2,18159

