



Réduction de la contamination des carcasses par l'application d'un gel sur le cuir

Etude de l'application d'un gel antibactérien sur le cuir de gros bovins après abattage afin de réduire le transfert de contamination du cuir vers la carcasse.

Mots clés : viande bovine, abattoir, sécurité sanitaire, gel antibactérien

Auteurs : Chloé Desmousseaux¹, Pierre Ledormand¹, Paul Tribot-Laspière^{1,2}, Mathilde Hazon¹, Mickael Fleury¹, Nathalie Desmasure², Marion Dalmasso², Christophe Denoyelle¹ and Marina Cretien²

- 1) Service Qualité des Carcasses et des Viandes, Institut de l'Élevage, France
 - 2) UR 4651 ABTE Aliments, Bioprocédés, Toxicologie, Environnements Université de Caen, Esplanade de la paix, 14000 Caen, France
- Coordonnées de l'auteur correspondant : pierre.ledormand@idele.fr

L'application d'un gel antibactérien a été testée en abattoir sur le cuir de bovins (source majeure de contaminations de la viande) afin de limiter le transfert de micro-organismes du cuir vers la carcasse et ainsi améliorer la maîtrise de la sécurité sanitaire en début d'abattage.

Résumé

La sécurité sanitaire est un enjeu crucial en abattoir bovin et doit être maîtrisée dès la chaîne d'abattage. La contamination des carcasses provenant majoritairement du cuir de l'animal, cette étude a expérimenté l'application d'un gel antibactérien pour réduire le transfert de contamination du cuir vers la carcasse. Réalisé à partir d'éthyl lauroyl arginate (LAE®), le potentiel inhibiteur du gel sur les bactéries a été testé en laboratoire *in vitro* et s'est révélé très prometteur pour les essais en abattoir puisqu'une diminution de la concentration microbienne allant jusqu'à 7 log UFC/ml a été observée. Lors des essais *in situ*, la concentration microbienne a été réduite d'un log sur le cuir et la carcasse, ce qui est similaire à d'autres moyens de décontamination actuellement employés. Ce résultat est encourageant mais la réflexion autour de la méthodologie d'application doit être poursuivie pour améliorer l'effet décontaminant du gel sur le cuir des animaux. En parallèle des essais terrain, une analyse métagénomique a été effectuée pour caractériser le microbiote du cuir bovin et celui de la carcasse. Celle-ci a montré que les deux microbiotes présentaient une diversité complexe et semblable, confirmant ainsi que l'origine de la contamination de la carcasse provient principalement du cuir.

Abstract: Reducing carcass contamination by applying a gel to the hide

Food safety is a crucial issue in cattle slaughterhouses and must be controlled from the slaughtering line onwards. As carcass contamination mainly originates from the animal's hide, this study experimented the application of an antibacterial gel to reduce the transfer of contamination from the hide to the carcass. Made from ethyl lauroyl arginate (LAE®), the gel's inhibitory potential on bacteria was tested *in vitro* in the laboratory and proved to be very promising for slaughterhouse trials, with a reduction in microbial concentration of up to 7 log CFU/ml. During *in situ* trials, microbial concentration was reduced by 1 log both on the hide and the carcass, which is similar to other decontamination methods currently employed. This result is encouraging, but further consideration on the application methodology is needed to improve the decontaminating effect of the gel on the animals' hides. Alongside the field trials, a metagenetic analysis was conducted to characterize the microbiota of the bovine hide and of the carcass. This analysis showed that both microbiotas exhibited a complex and similar diversity, thus confirming that the primary source of carcass contamination is the hide.

La maîtrise de la sécurité sanitaire est un sujet incontournable en industrie agroalimentaire, notamment en industrie carnée. En 2022, 1924 toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) ont été signalées en France (Santé Publique France, 2024). Ces dernières peuvent entraîner l'hospitalisation des personnes concernées et conduire à leur décès dans les cas les plus graves. La viande (hors volaille) est un aliment pouvant être contaminé par des bactéries pathogènes telles que *Escherichia coli*, *Salmonella sp.* ou *Listeria monocytogenes* (Cartier, 2009). Elle est à l'origine de 14% des infections alimentaires devant le poisson (10%), la viande de volaille (9%) et les œufs (5%) (Santé Publique France, 2024). De plus, la part de consommation de viande hachée ne cesse d'augmenter, or il s'agit d'un produit sensible car potentiellement contaminé à cœur et pouvant être consommé par des personnes fragiles (enfants, femmes enceintes, personnes âgées) (Interbev, 2022). Le risque d'intoxication peut être évité en apportant une cuisson suffisante à cœur.

La principale source de contamination de la viande provient du cuir des animaux qui présente une charge microbienne très importante. L'opération de dépouille ou d'habillage (retrait du cuir de l'animal) sur la chaîne d'abattage constitue donc, avec l'éviscération (retrait de l'appareil digestif), les opérations les plus à risques. Les contaminations par le cuir peuvent être directes (retournement du cuir sur la carcasse mise à nu, dépôt de poils, etc.) ou indirectes via les opérateurs et leurs outils (Cartier, 2009).

Pour limiter le risque de contamination par des pathogènes, les professionnels appliquent rigoureusement les bonnes pratiques d'hygiène et mettent en place des plans de surveillance de la qualité des produits avec des actions correctives en cas d'écart. Dans les abattoirs, les animaux doivent être propres à l'entrée de l'abattoir, afin de limiter le niveau de contamination initial des carcasses (accord interprofessionnel du 22 mars 2017 relatif à « l'achat et l'enlèvement des bovins de 8 mois ou plus destinés à l'abattage »). Différentes méthodes ont également été mises au point pour diminuer la charge bactérienne sur les carcasses en fin de chaîne d'abattage comme le VapoVac© (utilisation de vapeur) pour traiter les zones souillées ou le traitement à l'acide lactique sur la carcasse entière (Fleury, 2018). Ces traitements sont souvent des mesures curatives dont l'efficacité peut s'avérer limitée (réduction de l'ordre de 1 à 2 log/cm² pour le VapoVac© et 0,7 log/cm² pour l'acide lactique). Pour limiter le transfert de contamination du cuir vers la viande, l'idée de piéger les bactéries sur le cuir à l'aide d'un gel a déjà été expérimentée et a donné des résultats intéressants (Antic *et al.*, 2010). Dans l'étude d'Antic *et al.*, le gel était réalisé à partir de gomme Shellac et avait permis d'obtenir une diminution significative de la contamination des cuirs

après application de la solution pendant 5 minutes (6,6 log pour la flore totale, 2,9 log pour *Escherichia coli* et 4,8 log pour les *Enterobacteriaceae*). Plus tard, une nouvelle étude a permis d'évaluer l'effet du traitement sur la contamination des carcasses. En moyenne, les carcasses dont le cuir avait été traité par le gel présentaient une réduction de 1,7 log UFC/cm² (Antic, Blagojevic and Buncic, 2011). Les objectifs de cette nouvelle étude présentée ici sont similaires à cette dernière.

Aujourd'hui, de nouveaux produits aux propriétés antibactériennes font leur apparition sur le marché comme le MIRENAT®-NSF, vendu comme conservateur alimentaire. Il se compose de LAE (Ethyl Lauroyl Arginate Hydrochloride) et de pectine (Vedeqsa, 2023). Le LAE est classé comme additif dans le règlement de la Commission européenne (UE) N°506/2014, avec le numéro E243. Ainsi, il est autorisé dans les produits à base de viande traités thermiquement (à l'exception des saucisses émulsionnées, des saucisses fumées et du pâté de foie) à la dose maximale de 160 mg/kg. Outre l'Union Européenne, le LAE est autorisé aux Etats-Unis, au Canada et dans d'autres pays. Ce conservateur est approuvé par le Codex Alimentarius pour une grande variété d'applications (fromage, boissons, légumes, etc.) à une dose limite de 200 mg/kg. Le LAE est un antimicrobien sans danger pour la consommation humaine car il est rapidement hydrolysé dans le tractus digestif en composés naturellement retrouvés dans le régime alimentaire humain (acide laurique, L-arginine et éthanol). Les principaux mécanismes antimicrobiens du LAE altèrent les membranes cellulaires des bactéries mais ne provoquent pas directement de lyse cellulaire, d'autres modes d'action entreraient alors en jeu pour agir sur des cibles intracellulaires et entraîner la létalité des bactéries. Ces derniers sont actuellement à l'étude (Ma *et al.*, 2020). Une fois solubilisé, le LAE forme un gel de faible consistance.

Dans cette étude, la possibilité d'utiliser ce type de produit en abattoir a été investiguée. L'idée était de pulvériser le gel sur le cuir de l'animal étourdi, afin de diminuer la charge bactérienne de ce dernier et ainsi limiter le transfert de contamination du cuir vers la carcasse lors de la dépouille. Par conséquent, cette méthode constituerait un moyen de maîtrise sanitaire dès la chaîne d'abattage. Pour cela, des essais *in vitro* d'inhibition de souches bactériennes ont d'abord été effectués en laboratoire afin d'étudier le pouvoir antibactérien du gel sur des bactéries communément retrouvées dans la viande bovine. Dans un second temps, le gel a été testé en conditions réelles en abattoir. Enfin, une analyse métagénomique a été réalisée parallèlement aux essais terrain afin de caractériser le microbiote du cuir bovin et celui de la carcasse en lien avec un traitement par le gel.

I. MATERIELS ET METHODES

II.1. Le gel antibactérien

Le MIRENAT®-NSF est une poudre composée de pectine et de LAE, un dérivé d'éthyl lauroyl arginate. Le gel est reconstitué en ajoutant progressivement la poudre soluble dans de l'eau chaude (50°C) sous agitation. Dans

le cadre des essais, différentes concentrations de gel ont été testées (1%, 1,5% et 3%), ainsi que plusieurs temps d'application (15 min, 30 min et 1h30) en s'appuyant sur les recommandations du fabricant.

II.2. Essais *in vitro* d'inhibition de souches bactériennes

Avant de tester le gel en abattoir, son pouvoir antimicrobien a été préalablement évalué sur différentes souches bactériennes communément retrouvées dans les produits carnés. Des essais d'inhibition de croissance bactérienne *in vitro* ont été réalisés en laboratoire sur 9 souches présentées dans le Tableau 1. Certaines sont

considérées comme faisant partie de la flore d'altération comme *Pseudomonas psychrophila*, *Brochothrix thermosphacta*, *Psychrobacter faecalis*, *Lactococcus piscium* ou *Hafnia alvei*. Les autres bactéries utilisées sont des pathogènes (Cartier, 2009 ; Salifou *et al.*, 2013; Saraoui *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Souches utilisées pour les essais *in vitro*

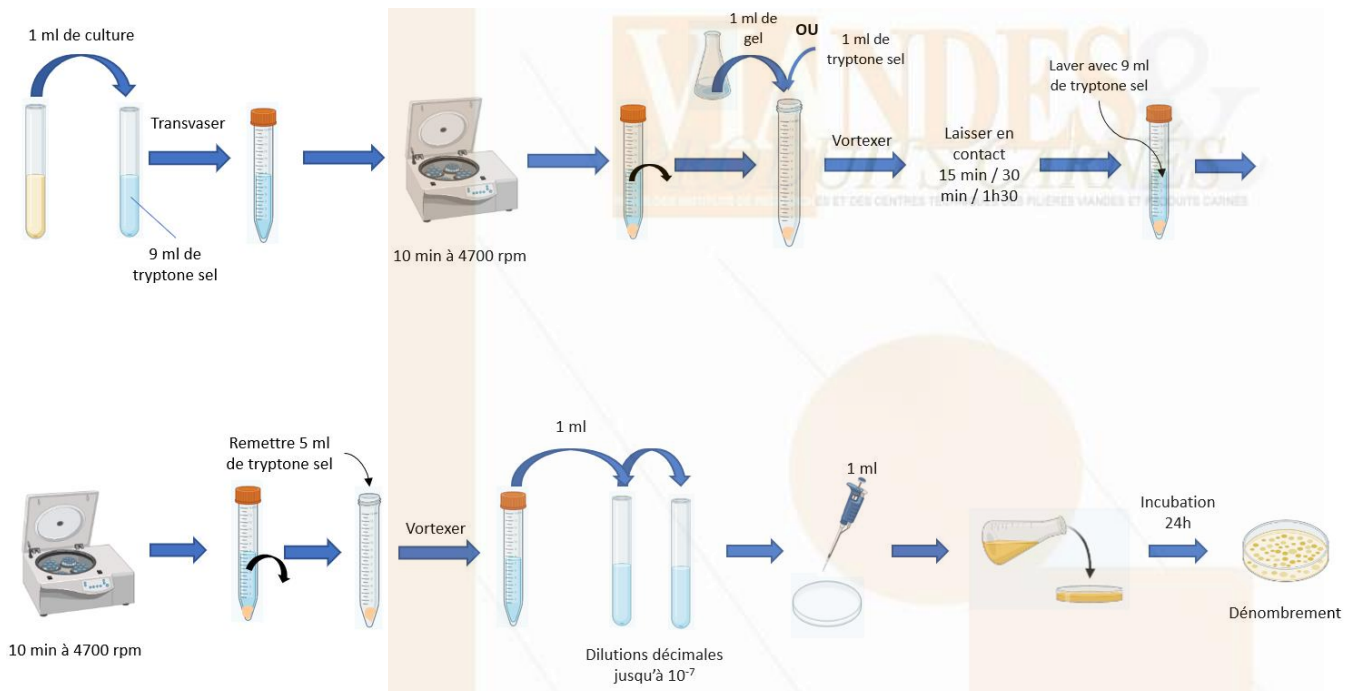
Numéro de souche	Espèce	Source	Température d'incubation (°C)
UCMA 14205	<i>Hafnia alvei</i>	Isolée de dessus de palette de bœuf, flore d'altération	37
UCMA 18319	<i>Pseudomonas psychrophila</i>	Isolée de bavette d'ailloyau, flore d'altération	25
UCMA 18331	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	Isolée de cote à l'os, flore d'altération	25
UCMA 8684	<i>Psychrobacter faecalis</i>	Isolée de lait cru, flore d'altération	25
UCMA 18063	<i>Lactococcus piscium</i>	Isolée de dessus de palette, flore d'altération	25
UCMA 7279	<i>Listeria monocytogenes</i>	Isolée de Lait cru, pathogène	37
UCMA 10632	<i>Enterococcus faecalis</i>	Pathogène, souche de référence DSMZ 13591	37
UCMA 12999	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Typhimurium	Pathogène, souche de référence LMG 7233 ^T	37
UCMA 6835	<i>Escherichia coli</i>	Pathogène, souche de référence CIP 53.126	37

Après avoir mis en culture la souche à expérimenter pendant 24h, le protocole illustré sur la Figure 1 a été appliqué. Tout d'abord, une dilution décimale de la culture est réalisée avec du tryptone sel puis la culture diluée est ensuite centrifugée 10 min à 4700 rpm. Le surnageant est retiré et remplacé par 1 ml de gel dosé à 10, 15 ou 30 g/L, ou bien 1 ml de tryptone sel pour les tubes témoins. Un temps de contact de 15 minutes, 30 minutes ou 1h30 est appliqué. Un lavage est effectué en ajoutant 9 ml de tryptone sel dans les tubes et en passant une nouvelle fois ces derniers à la centrifugeuse. Le surnageant est vidé et

substitué par 5 ml de tryptone sel. Une série de dilutions décimales allant de 10⁻¹ à 10⁻⁷ est ensuite réalisée. Finalement, un millilitre de chaque culture est ensemencé en masse sur boîte de Petri coulée avec du TSA YE (Biokar, Grosseron). Après 24h d'incubation à température optimale de croissance de la souche, les colonies sont dénombrées.

Les essais ont été conduits une première fois à la réception du MIRENAT®-NSF, puis une deuxième fois avant d'effectuer les essais en abattoir, soit 8 mois plus tard.

Figure 1 : Protocole de réalisation des essais in vitro d'inhibition de souches bactériennes



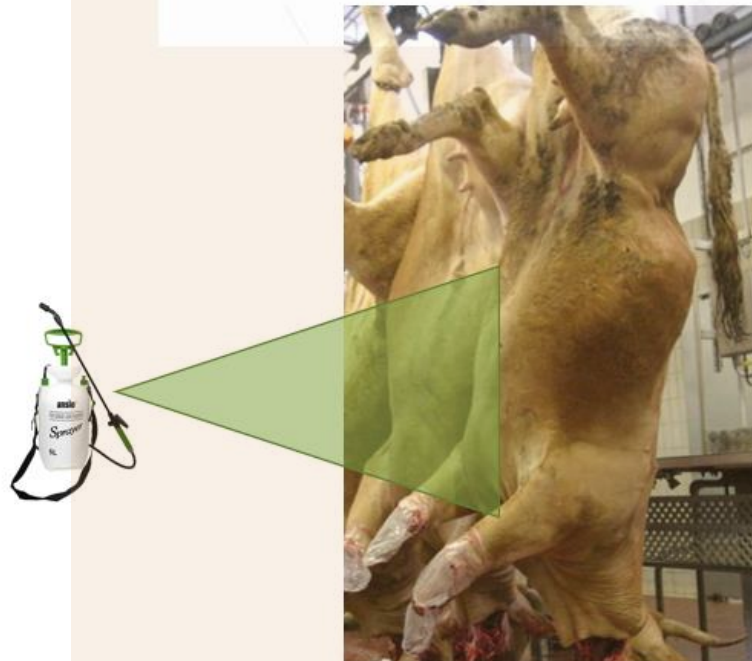
II.3. Essais en abattoir

II.3.1. Essai par pulvérisation douce et couvrante

Afin de tester l'efficacité du gel sur le terrain, 60 animaux ont été suivis en abattoir lors de ce premier essai. L'effectif a été réparti en 30 témoins (ne recevant pas de gel) et 30

expérimentaux (avec gel). L'essai a été fait en 3 fois, il y avait donc 20 animaux suivis par visite, avec 10 témoins et 10 expérimentaux à chaque répétition.

Figure 2 : Zone de pulvérisation du gel



Le gel a été appliqué à la fin de l'égouttage sur la parfente sternale des animaux expérimentaux à l'aide d'un pulvérisateur de type désherbant, ayant une pression de 3 bars (Figure 2) afin que le gel soit apporté de manière douce et couvrante. Afin de couvrir la région souhaitée, le

gel a été pulvérisé en allant de gauche à droite et de haut en bas. Il avait été préparé avant d'aller en abattoir afin qu'il ait le temps de refroidir avant utilisation et ainsi mieux adhérer au cuir. Le temps d'application du gel sur le cuir était de 15 minutes avant que celui-ci ne soit retiré.

Figure 3 : Zone de prélèvements



Trois prélèvements ont été effectués par animal (Figure 3). Les deux premiers sur le cuir ont été réalisés à l'aide d'une chiffonnette et le troisième sur la carcasse par excision. Le premier a été fait sur le sternum côté gauche à la fin de l'égouttage, avant l'application du gel le cas échéant (animaux expérimentaux), et a permis de déterminer le niveau de contamination initial du cuir de l'animal. Le second a été effectué avant l'arrache-cuir sur le sternum côté droit de l'animal, pour éviter de prélever une zone déjà frottée. Ainsi, l'effet du gel sur la charge microbienne du cuir a pu être évalué. Ces deux premiers prélèvements ont été réalisés par la même personne afin de limiter les biais dus à l'opérateur. Les prélèvements à la chiffonnette ont été conduits sur une zone de 30x30 cm, en effectuant 3 tours dans un sens puis dans l'autre avec une pression constante. Enfin, le dernier prélèvement a été réalisé par excision sur le gros bout de poitrine (zone de 5x5 cm) juste après dépouille de l'animal afin d'apprécier la contamination de la carcasse par le cuir avant les autres étapes de la chaîne d'abattage.

Arrivés au laboratoire d'analyse, les échantillons ont été traités selon les modalités suivantes. Dans les sachets

contenant les chiffonnettes (avant et après traitement), 100 ml d'eau peptonée avec glycérol (10%) ont été ajoutés. Les échantillons ont ensuite été passés au Stomacher (Smasher AES Laboratoires, 120 s, fréquence fast). Pour les chiffonnettes « avant traitement », 30 ml ont été conservés pour les analyses microbiologiques et 70 ml pour les analyses de métagénomique. Ces analyses permettent d'étudier la diversité bactérienne présente dans les échantillons par séquençage haut débit de l'ADNr 16S. Pour les chiffonnettes « après traitement », il n'y a pas eu de métagénomique sur ces échantillons donc seuls les 30 ml pour la microbiologie ont été gardés. Enfin, 25 ml d'eau peptonée avec glycérol (10%) ont été ajoutés dans les sacs contenant les excisions. Ils ont ensuite été passés au Stomacher (120 s, fréquence fast) et 10 ml ont servi pour la microbiologie et le reste (15 ml) pour la métagénomique. Les analyses microbiologiques effectuées furent les suivantes : flore totale (norme NF V08-011), entérobactéries (norme NF V08-054), *Pseudomonas* (norme NF EN ISO 13720 : 2010), bactéries lactiques mésophiles (norme NF V04-503) et PCA à 22°C pour la flore lactique psychrotrophe (Bièche-Terrier *et al.*, 2019).

II.3.2. Essai comparatif de méthodes d'application du gel

Un essai simplifié a été réalisé dans le but de tester un autre type de pulvérisateur ayant une pression appliquée de 120 bars (pistolet à peinture). Seule la réduction de la charge bactérienne a été étudiée pour cet essai. Pour cela, le gel a été pulvérisé sur 10 animaux dont la moitié a également été brossée après application afin de vérifier une amélioration potentielle des résultats. L'objectif du

brossage était d'optimiser la pénétration du gel dans le poil et non d'éliminer les souillures. Deux prélèvements sur le cuir ont été effectués à la chiffonnette : avant application du gel et après 15 minutes de contact (juste avant le retrait du cuir). Celui sur la carcasse n'a pas été réitéré pour cet essai. La flore totale des différents échantillons a été dénombrée.

II.3.3. Essai final : application du gel par pulvérisation et brossage

Enfin, un essai final a été conduit de façon à valider l'efficacité sanitaire du processus appliqué lors de l'essai simplifié, c'est-à-dire obtenir des carcasses moins contaminées en début de process grâce à l'application d'un gel sur le cuir. Le pistolet à peinture a donc été de nouveau utilisé et le cuir des animaux était brossé après l'application du gel. Comme pour les premiers essais, trois prélèvements ont été effectués par animal : avant et après application du

gel sur le cuir avec une chiffonnette, et après dépouille de l'animal (muscle) par excision au niveau de la parfente sternale. Sur les 30 animaux suivis, 10 ont servi de témoins et n'ont pas reçu de gel et 20 ont été traités. La flore totale, les entérobactéries présumées et les bactéries lactiques mésophiles ont été dénombrées. Tous les échantillons de cuir (avant traitement) et de muscle ont également été utilisés pour l'analyse métagénomique.

II.4. Analyse métagénomique

Les échantillons provenant du cuir ont été filtrés dans des unités de filtration sur filtre de 30 µm de rétention pour éliminer les poils, le sang et autres débris organiques. Ils ont ensuite été centrifugés (4700 rpm, 10 minutes) avec les autres échantillons issus de la carcasse puis les culots cellulaires ont été congelés à -20°C pour pouvoir réaliser l'extraction d'ADN dans les semaines suivantes.

Pour l'analyse, une sélection de 120 échantillons a été retenue : 60 issus du cuir (avant traitement) et 60 provenant de la carcasse, correspondant ainsi à 60 animaux. Tous les animaux de l'essai final (soit 30 animaux avec 10 témoins et 20 expérimentaux), ont été échantillonnés ainsi que 30 animaux de l'essai initial (20 témoins et 10

expérimentaux). Ainsi, il y a autant d'animaux témoins que d'expérimentaux. L'ADN des échantillons a été extrait à l'aide du kit NucleoSpin Soil (MACHEREY-NAGEL). La quantité d'ADN a été mesurée à l'aide du Quantus™ Fluorometer (Promega). Le séquençage de la région V3-V4 du gène de l'ARNr 16S a été réalisé en Illumina 2x300 pb par Eurofins Genomics (France). Les données de séquençage ont été analysées avec FROGS sur Galaxy (Escudé *et al.*, 2018). Brièvement, le clustering a été fait avec Swarm et les chimères ont été supprimées avec VSEARCH. L'analyse statistique a été réalisée avec le package Phyloseq de R implémenté dans FROGS (FROGSSTAT).

II.5. Analyses statistiques

Les résultats ont été analysés par un tests de Student (ou test t) lorsqu'un seul facteur était analysé et par une analyse de variance (ANOVA) lorsque plusieurs facteurs étaient testés simultanément. Concernant les analyses de métagénomique, les analyses statistiques ont été réalisées sur les indices de diversité (Shannon, Chao1) par une analyse multivariée de la variance (MANOVA) et des analyses en coordonnées principale (PCoA) basée sur une matrice des distance de Bray-Curtis ont été effectuées pour analyser la distribution des différents échantillons.

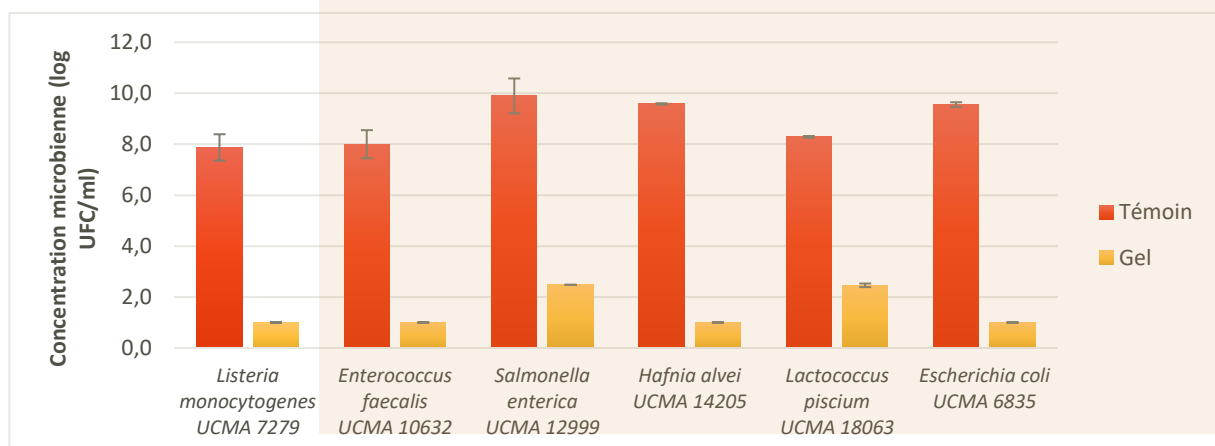
II. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Essais *in vitro* d'inhibition des souches bactériennes

Les premiers essais *in vitro* d'inhibition de croissance bactérienne ont d'abord été effectués selon les recommandations du fabricant du gel et les contraintes d'un abattoir. Ainsi, une concentration de 15 g/L et un temps de contact de 15 minutes ont été appliqués. Les résultats sont présentés sur la Figure 4. En moyenne, la

concentration bactérienne des cultures témoins est de 8 à 10 log UFC/ml. Après application du gel, celle-ci est fortement réduite de 6 à 8 log démontrant ainsi une très bonne activité antimicrobienne du gel sur différentes bactéries dans les conditions testées.

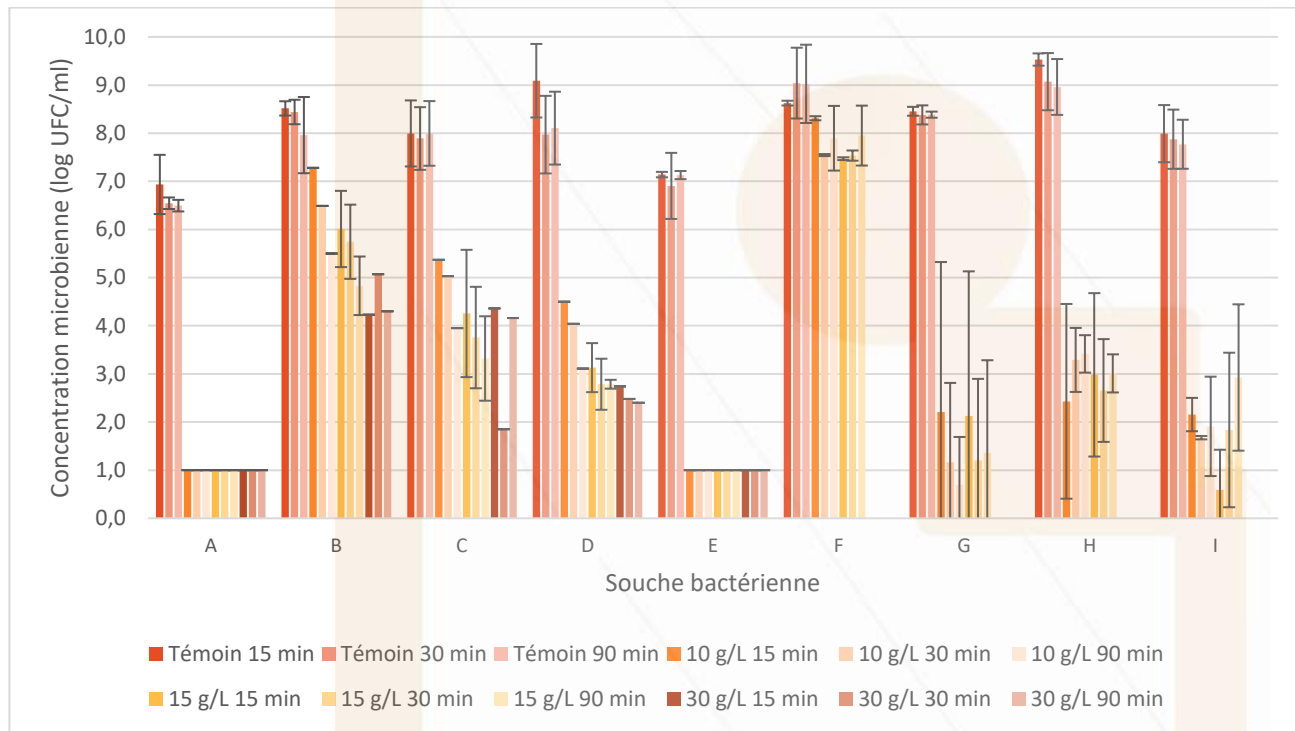
Figure 4 : Résultats des essais *in vitro* d'inhibition de souches bactériennes
(expérience menée à la réception du MIRENAT®-NSF).



Huit mois plus tard, des essais ont été reconduits afin d'étudier l'effet de la concentration du gel et du temps d'application. Pour chaque paramètre, trois modalités ont donc été testées : 10, 15 et 30 g/L pour la concentration du gel et 15, 30 et 90 minutes pour le temps d'application.

Concernant le gel à 30 g/L, celui-ci ne présentait pas un aspect aussi homogène que les deux autres, la solution semblait trop concentrée pour se dissoudre correctement. Les résultats de cette deuxième série d'essais sont présentés sur la Figure 5.

Figure 5 : Résultats des essais in vitro d'inhibition de souches bactériennes avec le MIRENAT®-NSF stocké depuis 8 mois



A : *Brochothrix thermosphacta* UCMA 18331
 B : *Listeria monocytogenes* UCMA 7279
 C : *Enterococcus faecalis* UCMA 10632
 D : *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *Typhimurium* UCMA 12999

E : *Psychrobacter faecalis* UCMA 8684
 F : *Hafnia alvei* UCMA 14205
 G : *Lactococcus piscium* UCMA 18063
 H : *Escherichia coli* UCMA 6835
 I : *Pseudomonas psychrophila* UCMA 18319

En moyenne, les concentrations microbiennes des témoins sont comprises entre 7 et 9 log UFC/ml. Certaines bactéries comme *Brochothrix* (A) ou *Psychrobacter* (E) ont été totalement inhibées par le gel quels que soient la concentration et le temps d'application) (-6 log). A l'inverse, d'autres ont été peu inhibées par le gel telles que *Hafnia* (F) et *Listeria* (B) (-1 à -3 log). Les résultats sont variables chez certaines bactéries comme *Lactococcus* (G). Ainsi, toutes les bactéries sont significativement affectées par le gel ($P < 0.05$), de manière plus ou moins importante (diminution de -1 à -7 log). L'effet de la concentration n'apparaît que pour les bactéries *Listeria* et *Salmonella* ($P = 0,02$ et $0,01$ respectivement). En revanche, le temps d'application n'a pas eu d'effet sur l'inhibition des souches dans le cadre de cette étude ($P > 0.05$).

Cette deuxième série d'essais, réalisée plusieurs mois après la première, montre que la qualité de la poudre du MIRENAT®-NSF se dégrade au cours du temps et doit donc être utilisée dans les mois suivant sa fabrication. En effet, lors de la reconstitution du gel, la poudre se dissolvait plus difficilement et le gel obtenu était moins limpide que la première fois. Pour une concentration et un temps

d'application identiques (respectivement 15 g/L et 15 min), les essais d'inhibition se sont révélés plus efficaces lors de la première utilisation du gel. Par exemple, *Listeria monocytogenes* était inhibée à hauteur de 7 log la première fois et seulement 2 log la deuxième fois, idem pour *Hafnia alvei* qui a présenté une inhibition de seulement un log avec le second gel.

A la suite de ces résultats, une nouvelle commande de MIRENAT®-NSF a été effectuée pour les essais en abattoir afin d'avoir un gel avec une efficacité maximale. Il a été décidé d'utiliser un gel à 15 g/L avec un temps de contact de 15 minutes pour la suite. En effet, le gel à 30 g/L n'était pas satisfaisant en termes d'aspect avant utilisation et n'a pas permis d'obtenir des résultats significativement meilleurs que le gel à 15 g/L. En revanche, un effet de la concentration a tout de même été démontré sur certaines souches, c'est pourquoi le gel à 10 g/L a été écarté. Enfin, le temps d'application n'ayant pas d'effet sur l'inhibition des souches, la durée de 15 min est retenue car elle correspond aux contraintes retrouvées en abattoir.

III.2. Essais en abattoir

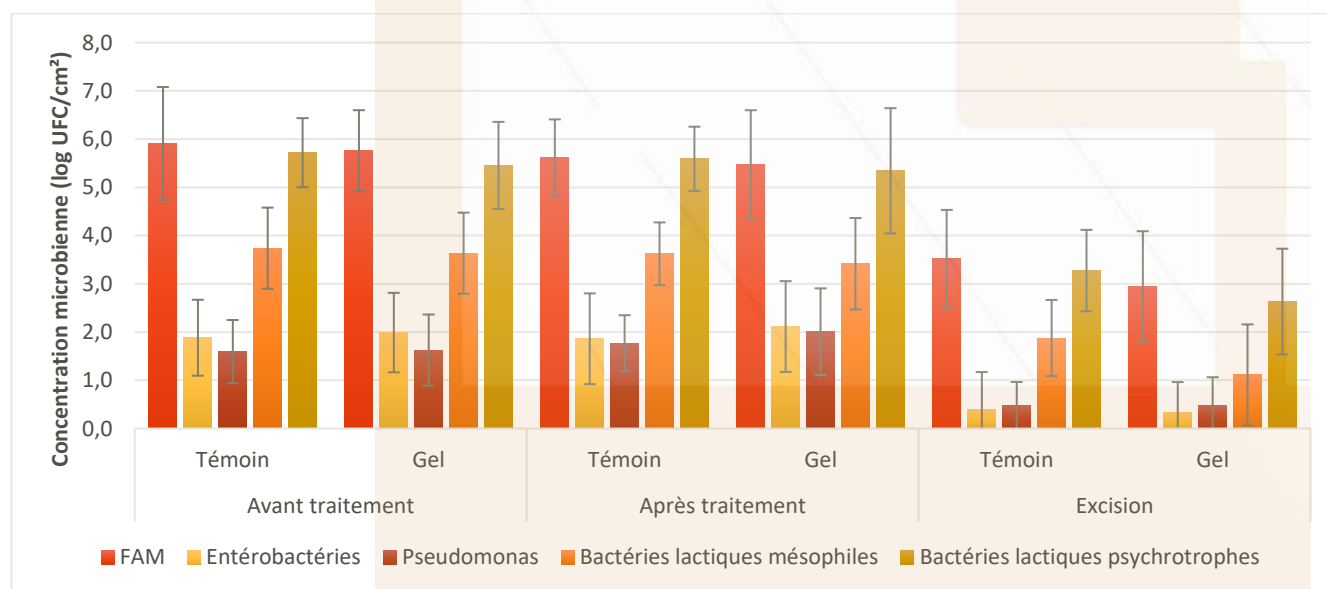
III.2.1. Essai par pulvérisation douce et couvrante

Lors de cet essai, 60 bovins ont été suivis. Les animaux étaient de races et de conformations assez variables. Il y avait autant d'animaux à poils courts qu'à poils longs et les bovins étaient plutôt propres malgré 45% des parfentes identifiées comme sales (présence de spot de souillures) et 13% comme très sales (plaques de fumier, boue couvrant toute la surface). Pour chaque carcasse, 50 ml de gel ont été appliqués. Ce dernier était préparé avant de partir en abattoir de la même façon que pour les essais *in vitro*.

L'ensemble des résultats des analyses microbiologiques est présenté sur la Figure 6. En moyenne, les animaux suivis présentaient une charge microbienne initiale de 5,8 log UFC/cm² sur le cuir. Avant traitement, il n'y a pas de différence significative entre le lot témoin et celui recevant du gel quel que soit le groupe microbien

recherché. Après traitement, le gel ne semble pas avoir eu un effet sur la charge bactérienne du cuir, y compris à l'échelle individuelle, puisque la charge microbienne moyenne retrouvée est de 5,5 log UFC/cm². Sur la carcasse, la charge microbienne en flore totale est moins importante que sur le cuir avec 3,23 log UFC/cm² en moyenne. Le groupe Gel est significativement moins contaminé que le groupe Témoin en flore totale (respectivement 2,9 contre 3,5 log UFC/g, P = 0.04) mais également en bactéries lactiques et flore psychrotrophe (P = 1.10⁻³ et 0.01 respectivement). Bien que l'effet antibactérien du gel n'ait pas été visible sur le cuir, il est possible qu'il ait tout de même permis de diminuer le transfert de bactéries du cuir vers la viande en piégeant ces dernières.

Figure 6 : Résultats des analyses microbiologiques pour l'essai complet



Compte tenu des résultats très inférieurs aux essais *in vitro*, le mode d'application du gel a été modifié afin d'en mesurer l'effet sur le niveau de contamination du cuir avant

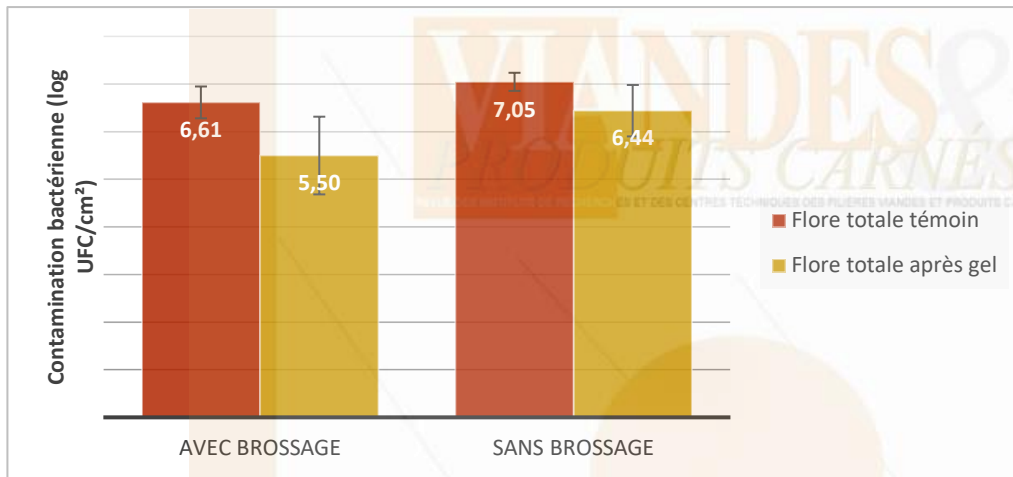
III.2.2. Comparaison de méthodes d'application du gel

Au cours de cet essai, dix animaux ont été suivis pour étudier l'effet du gel sur la charge microbienne du cuir. Il s'agissait majoritairement de jeunes bovins avec des poils courts et des parfentes propres. La quantité de gel appliquée a été augmentée par rapport à l'essai précédent et était de 200 ml par carcasse. La préparation du gel était toujours la même. Tous les animaux de cet essai ont été traités et un animal sur deux était également brossé pour faire pénétrer le gel dans le poil. En moyenne, la contamination initiale du cuir était de 6,83 log UFC/cm², soit un log de plus que l'essai précédent. Cela confirme qu'il n'est pas possible de compiler les données des essais ayant été effectués à différentes périodes (en l'occurrence début mars et fin mai). Le gel couplé au brossage a en moyenne permis de réduire de -1,12 log UFC/cm² la charge

l'arrachage. Ainsi, la pression de pulvérisation et la quantité de gel appliquées ont été revues à la hausse.

bactérienne du cuir et le gel seul de -0,61 log (Figure 7). Contrairement à l'essai précédent, une réduction de la charge bactérienne est observée sur la majorité des carcasses allant jusqu'à -1,66 log pour le groupe avec brossage et jusqu'à -1,22 log pour le groupe sans brossage. Avec ou sans brossage, le gel a permis de réduire significativement la charge microbienne du cuir (P = 0.02 et 0.04, respectivement). Bien que les résultats soient meilleurs pour le groupe avec brossage, il n'a pas été possible de démontrer statistiquement que le brossage permettait d'améliorer les résultats du traitement au gel (P > 0,05). Toutefois, à la vue de ces derniers, le brossage sera tout de même conservé pour la suite. L'utilisation de ce pulvérisateur et le brossage après application du gel ont ainsi été validés pour les prochains essais.

Figure 7 : Réduction de la charge microbienne sur le cuir lors de l'essai simplifié



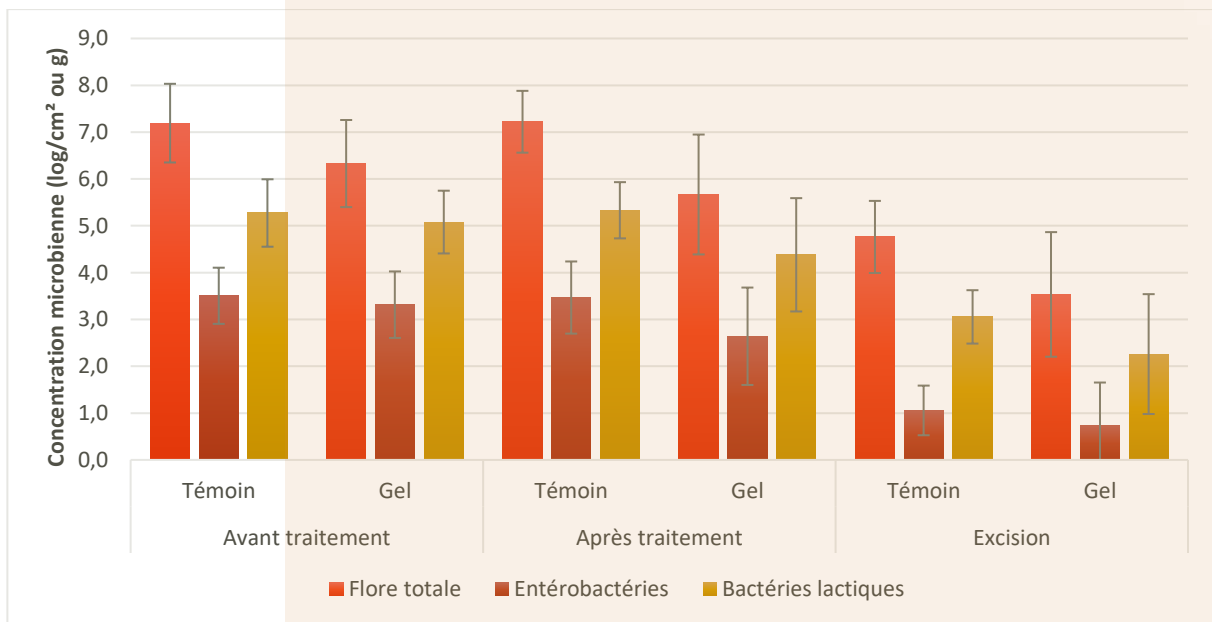
III.2.3. Essai final : application du gel par pulvérisation et brossage

Grâce à une pression de pulvérisation plus importante (5 bars) couplée à un brossage après application, l'effet décontaminant du gel a été validé sur le cuir de l'animal lors de l'essai simplifié. La seconde étape consistant à obtenir des carcasses moins contaminées grâce au gel a été expérimentée dans ce dernier essai. Une fois de plus, les animaux suivis étaient assez hétérogènes. En majorité, les bovins avaient le poil court, sec et propre.

La Figure 8 présente les résultats obtenus lors de cet essai. La concentration microbienne moyenne du cuir avant traitement est de 6,76 log/cm², ce qui est comparable au premier essai. Une différence non attendue d'environ un log a été observée sur la flore totale initiale entre le groupe témoin et le groupe expérimental. Dans le groupe

expérimental, une diminution significative de -0,7 log est observée pour chaque flore après traitement au gel sur le cuir ($P < 0,05$). Ces différences ne se retrouvent pas dans le groupe témoin. Sur la viande, la flore totale moyenne du groupe gel est significativement inférieure de -1,2 log par rapport au groupe témoin ($P = 0,01$). Les autres flores ont également tendance à être plus faibles ($P > 0,05$). Ainsi, en utilisant un pulvérisateur assez puissant (120 bars) couplé à un brossage pour faire pénétrer le gel dans les poils, il a été possible de mettre en évidence une réduction de la charge microbienne sur le cuir de l'animal (-0,7 log UFC/cm²) et sur la carcasse (-1,2 log UFC/g par rapport aux témoins).

Figure 8 : Résultats des analyses microbiologiques pour l'essai final



Les analyses statistiques n'ont pas mis en évidence des facteurs influençant l'efficacité du gel tels que la longueur des poils ou la propreté des parfentes (analyse de

régression multiple comparant la différence de charge bactérienne sur le cuir dans le groupe Gel, $P > 0,05$). Cela peut s'expliquer par le faible nombre d'individus testés.

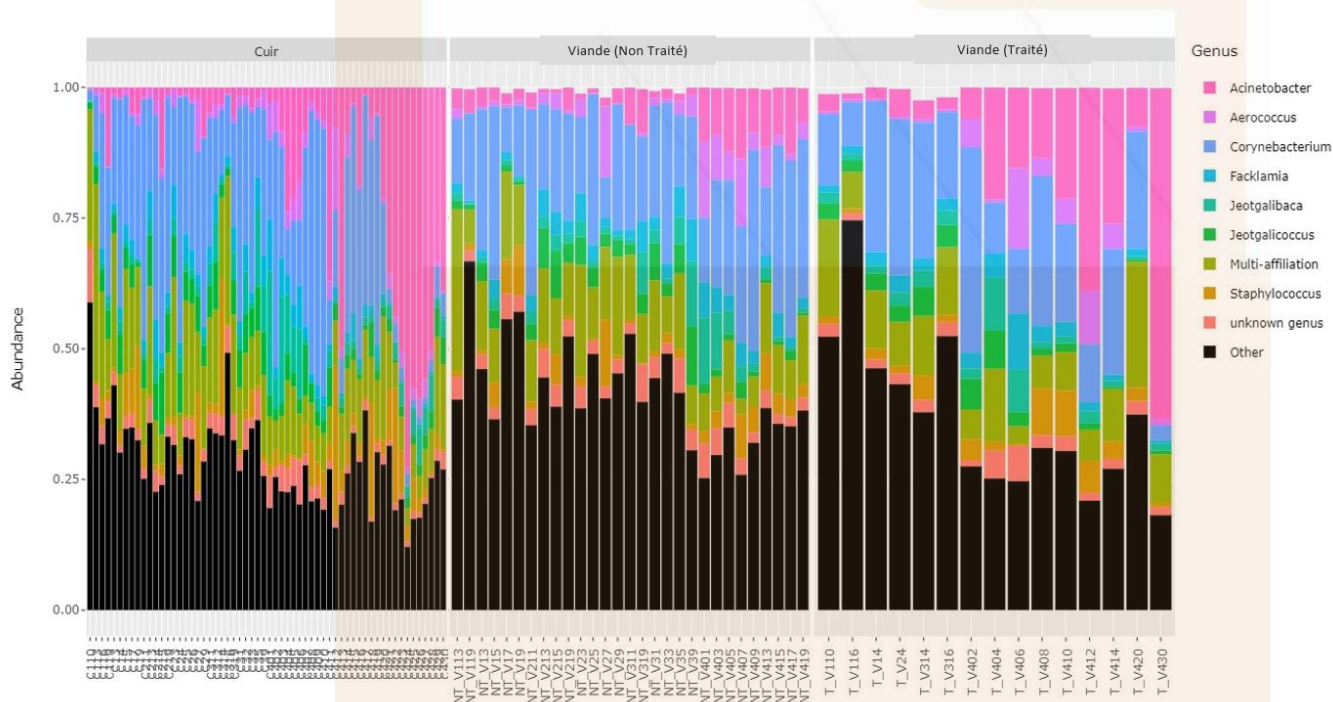
III.3. Etude de la microflore des cuirs et carcasses par métagénomique

Sur les 120 échantillons envoyés pour séquençage, 16 échantillons issus de carcasse n'ont pu être exploités faute de matériel bactérien suffisant (inférieur à 2,5 UFC/g en moyenne), en effet la quantité d'ADN était insuffisante pour garantir une analyse métagénomique fiable. Il s'agissait principalement d'échantillons prélevés lors de l'essai final (12 sur 16) et issus de carcasses faisant partie du groupe traité (15 sur 16). L'analyse a donc été effectuée sur 60 échantillons de cuir, 29 échantillons de carcasse issus du groupe témoin ainsi que 15 échantillons de carcasse provenant du groupe traité.

La composition des microbiotes cuir et carcasse est présentée sur la Figure 9 avec la représentation des 9 genres bactériens les plus abondants. Ainsi, les bactéries des genres *Acinetobacter* et *Corynebacterium* sont majoritaires, aussi bien sur les cuirs que sur les carcasses, avec des abondances relatives pouvant aller jusqu'à 60% pour les premières et 50% pour les secondes. Ces deux genres bactériens sont globalement en proportions moins importantes sur la carcasse. Le genre *Staphylococcus*, présent chez l'homme ou l'animal (Institut Pasteur, 2016), représente jusqu'à 30% de la population bactérienne dans les échantillons de cuir mais n'excède pas 15% sur la

carcasse. Le genre *Aerococcus* peut être retrouvé jusqu'à 15% dans le cuir et la carcasse. Les genres *Acinetobacter*, *Corynebacterium* et *Aerococcus* sont communément identifiés dans l'environnement (eau et sol) (Betts, 2006 ; Masson, 2008 ; Canada, 2012). D'autres genres bactériens, comme le genre *Facklamia*, sont retrouvés au sein des différents échantillons, ce dernier est généralement présent chez les animaux à sang chaud et dans l'environnement (CTCB, 2016). Enfin, le genre *Jeotbalibaca*, appartenant à la famille des *Carnobacteriaceae*, a également été retrouvé dans les échantillons de cuir et de carcasse analysés. Il s'agit d'un genre encore peu connu (Zamora *et al.*, 2017). Ainsi, les principaux genres bactériens identifiés se retrouvent autant sur le cuir que sur la carcasse. Sur cette dernière, l'application du gel ne semble pas impacter la diversité bactérienne observée. La contamination de la carcasse se faisant majoritairement lors de l'arrachage du cuir, cela explique pourquoi les mêmes genres bactériens sont retrouvés entre les cuirs et les carcasses (Cartier, 2009). Toutefois, la proportion d'autres genres bactériens (« Other ») est plus importante dans les échantillons de carcasse, indiquant qu'il y a probablement une plus grande diversité bactérienne sur ces derniers.

Figure 9 : Composition bactérienne retrouvée par séquençage de l'ADNr 16S des échantillons de Cuir et de Viande ayant été traités ou non par le gel (NT/T).



Les échantillons notés NT et T correspondaient aux animaux non traités et traités par le gel, respectivement. Les numéros correspondaient à l'identification des animaux échantillonnés.

Le nombre d'espèces bactériennes observées varie de 365 à 734 avec une moyenne de 560 espèces sur le cuir et 630 sur la carcasse (Figure S1). L'indice de Chao1 permet d'estimer le nombre réel d'espèce dans l'environnement à partir du nombre d'espèces observées dans l'échantillon, la richesse ainsi estimée varie de 425 à 825 espèces bactériennes avec une moyenne plus élevée sur la carcasse que sur le cuir. L'indice de Shannon exprime la diversité présente dans un échantillon. Ainsi, celui-ci est en

moyenne de 4,1 pour un échantillon cuir et 4,45 pour un échantillon carcasse. La richesse et la diversité bactérienne sont donc plus importantes sur la carcasse que sur le cuir.

Les échantillons ont été prélevés en 4 séries. Les 3 premières ont été réalisées durant le premier essai, seul le jour du prélèvement les différencie. La dernière a été faite lors de l'essai final dans un autre abattoir, trois mois plus tard. Quelle que soit la série, les mêmes genres bactériens sont retrouvés, cependant les genres *Acinetobacter* et

Aerococcus sont largement plus représentés dans la dernière. Celle-ci compte 100 à 160 espèces observées de moins que les 3 autres (Figure S2), la richesse estimée selon l'indice de Chao1 est également plus faible (600 espèces contre 700 à 730 respectivement). L'indice de Shannon montre aussi une différenciation de cette série

(3,9 contre 4,4 à 4,6 respectivement). Ainsi, la composition bactérienne est significativement différente (Tableau 2) selon le type d'échantillon (cuir ou carcasse) mais aussi selon la série de prélèvements. Il est probable qu'il s'agisse d'un effet abattoir et/ou saison car les 3 premières séries ont des résultats très semblables.

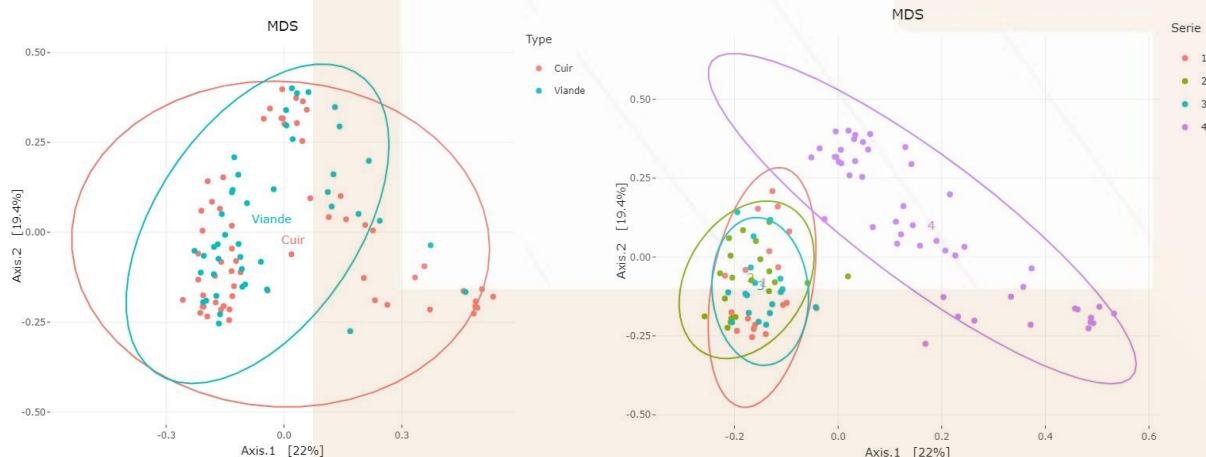
Tableau 2 : Résultats de l'analyse ANOVA (p-value) sur les indices de diversité α

	Chao1	Shannon
Impact du type de prélèvement (cuir vs carcasse)	0,002	2,63.10⁻⁴
Impact de la série de prélèvement	1,82.10⁻⁸	1,71.10⁻¹³

La diversité β permet de comparer la diversité des espèces entre écosystèmes. Celle des échantillons a été analysée et est présentée sur la Figure 10 sous forme d'analyse en coordonnées principales (PCoA). Bien que les échantillons aient une composition bactérienne significativement différente $P = 1.10^{-4}$, test MANOVA) selon le type (cuir ou carcasse), ils ont une distribution assez similaire sur l'analyse en coordonnées principales. Cela concorde avec les observations précédentes : les

genres bactériens majoritaires des deux microbiotes sont communs car les bactéries présentes sur la carcasse proviennent du cuir. La différence se joue probablement sur les genres minoritaires étiquetés « Other » sur la Figure 9. Comme évoqué précédemment, la distribution de la série 4 se différencie des séries 1, 2 et 3 ($P = 1.10^{-4}$, test MANOVA), montrant que l'environnement d'abattage impacte certainement la composition bactérienne retrouvée.

Figure 10 : Analyse en coordonnées principales (PCoA) basée sur une matrice des distances de Bray-Curtis illustrant la distribution des échantillons selon le type et la série.



Le numéro de série (1, 2, 3 ou 4) correspondait aux différentes séries de prélèvement effectuées lors des essais en abattoir.

Sur la carcasse, les échantillons provenant du groupe traité ont tendance à présenter une diversité plus faible que le groupe témoin. Les indices de diversité Chao1 et Shannon confirment qu'il existe une différence significative de composition du microbiote de la carcasse en fonction du traitement reçu (Figure S3, $P = 0,03$ et $0,01$, respectivement). Cette différence aurait pu être renforcée

si la totalité des échantillons de carcasse avait pu être séquencée. En effet, 15 échantillons sur 30 provenant du groupe traité n'ont pu être analysés faute de matériel bactérien suffisant. Le gel appliqué sur le cuir de l'animal a donc bien une influence sur la composition finale du microbiote de la carcasse en réduisant la diversité retrouvée.

III. CONCLUSION

Après avoir été vérifié en laboratoire sur différentes souches bactériennes, le pouvoir antimicrobien du gel a été testé en conditions réelles sur des bovins en abattoir. Lors des premiers essais terrain effectués, le mode d'application n'a pas permis de retrouver l'effet antimicrobien observé en laboratoire. Le gel ne semblait pas avoir d'effet sur la charge microbienne du cuir et donc ne permettait pas in fine d'obtenir des carcasses moins contaminées après retrait du cuir. En optimisant les paramètres d'application

du gel (pulvérisateur plus puissant, brossage du cuir), les résultats ont été améliorés. Ainsi, il a été possible de réduire jusqu'à 1,8 log la charge microbienne du cuir (flore totale, dernier essai) et d'avoir des carcasses moins chargées bactériologiquement (-1,2 log en moyenne pour la flore totale). Ces résultats sont encourageants même si la réduction de la charge microbienne observée n'était pas toujours significative ni même systématique pour chaque carcasse. Des facteurs tels que la longueur des poils et la

propreté de l'animal influent certainement sur l'efficacité du gel mais n'ont pas pu être mis en évidence statistiquement. Les résultats obtenus sont équivalents à d'autres techniques de décontamination déjà en place dans les abattoirs telles que l'utilisation du VapoVac (projection de vapeur sur les carcasses) et le traitement des carcasses à l'acide lactique. Le niveau de décontamination moyen est de -1 à -2 log UFC/cm² pour la première technique et -0,7 log UFC/cm² pour la seconde (Fleury, 2018). L'utilisation du gel sur le cuir présente plusieurs avantages : il n'y a pas de risque de dénaturation de la carcasse puisqu'il n'est pas directement appliqué sur celle-ci, bien qu'il y ait un risque de transfert sur la viande via le couteau de traçage et les mains des opérateurs de pré-dépeuplé. Toutefois, cette contamination serait minime et pourrait être limitée par des bonnes pratiques. Le gel est également économique puisque le coût estimé par carcasse est de 11 centimes (équipement non inclus). L'utilisation d'un gel antibactérien sur le cuir pourrait donc être complémentaire aux autres techniques de décontamination et permettrait ainsi d'améliorer la maîtrise du risque sanitaire sur la chaîne d'abattage. Des essais complémentaires combinant application du gel et les autres traitements actuellement en place en abattoir (VapoVac) pourraient être intéressants à investiguer pour limiter de manière plus importante la contamination des carcasses.

Références bibliographiques :

- Antic, D., Blagojevic, B., Buncic, S., (2011). Treatment of cattle hides with Shellac solution to reduce hide-to-beef microbial transfer. *Meat Science* 88, 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2011.01.034>.
- Antic, D., Blagojevic, B., Ducic, M., Mitrovic, R., Nastasijevic, I., Buncic, S., (2010). Treatment of cattle hides with Shellac-in-ethanol solution to reduce bacterial transferability – A preliminary study. *Meat Science* 85, 77–81. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2009.12.007>.
- Betts, G., (2006). 23 - Other spoilage bacteria, in: Blackburn, C. de W. (Ed.), *Food Spoilage Microorganisms*, Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. Woodhead Publishing, pp. 668–693.
- Bièche-Terrier, C., Fleury, M., Bré, JM., Malayrat, C., Tribot-Lespierre, P. et Desmasures, N., (2019). Viandes sous vide : les indicateurs microbiologiques actuels sont-ils fiables ? Viandes et produits carnés. VPC-2019-35-3-5. https://viandesetproduitscarnes.com/phocadownload/vpc_vol_35/Vol_3535_Viandes-sous-vide.pdf. (Consulté le 7 décembre 2023).
- Canada.ca, Fiche Technique Santé-Sécurité : Agents Pathogènes *Aerococcus* spp., (2012). <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/biosecurite-biosurete-laboratoire/fiches-techniques-sante-securite-agentes-pathogenes-evaluation-risques/aerococcus.html>. (Consulté le 26 octobre 2023).
- Cartier, P., (2009). « Chapitre 13 – La qualité des viandes : les micro-organismes ». Le point sur... La qualité des carcasses et des viandes de gros bovins. Institut de l'Élevage (Le point sur...), pp. 79–88.
- CTCB., (2016). Fiche technique : *Facklamia languida*. Fiche Technique de bactériologie 163. [https://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques%20BAC/Facklamia%20languida%20\(Edition%202016\).pdf](https://www.ctcb.com/documentation/Fiches%20techniques%20BAC/Facklamia%20languida%20(Edition%202016).pdf)
- Escudié, F., Auer, L., Bernard, M., Mariadassou, M., Cauquil, L., Vidal, K., Maman, S., Hernandez-Raquet, G., Combes, S., Pascal, G., (2018). FROGS: Find, Rapidly, OTUs with Galaxy Solution. *Bioinformatics* 34, 1287–1294. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx791>.
- Fleury, M. (2018). Propreté des gros bovins à l'abattoir : Moyens de maîtrise disponibles, de l'élevage à la chaîne d'abattage, pour améliorer le niveau de propreté du cuir des bovins et des carcasses. Interbev. <https://bibliothequerd.interbev.fr/wp-content/uploads/2018/11/Rapport-final-projet-Fiches-Proprete%20C3%A9-des-bovins-Version-Finale.pdf>.
- Institut Pasteur., (2016). Staphylocoque, Institut Pasteur. <https://www.pasteur.fr/fr/centre-medical/fiches-maladies/staphylocoque>. (Consulté le 3 novembre 2023).
- Interbev., (2022). Publication du bilan annuel des produits carnés par FranceAgriMer (Article de synthèse). <https://www.interbev.fr/fiche/publication-du-bilan-annuel-des-produits-carnes-par-franceagrimer-article-de-synthese/>. (Consulté le 22 novembre 2023).
- Masson, E., (2008). Dossier *Acinetobacter* spp - Les bactéries du genre *Acinetobacter* revisitées : leur importance actuelle. EM-Consulte. <https://www.em-consulte.com/article/77709/figures/dossier-acinetobacter-spp-les-bacteries-du-genre-a>. (Consulté le 26 octobre 2023).

En parallèle, l'analyse de la diversité bactérienne par métagénomique a permis de montrer que le microbiote de la carcasse en début de processus d'abattage est fortement lié à celui du cuir de l'animal, confirmant que ce dernier est la source principale de contamination d'une carcasse. Le gel antibactérien appliqué sur le cuir des animaux après abattage semble influencer sur le microbiote de la carcasse dépouillée. Des investigations complémentaires mériteraient d'être mises en œuvre afin d'étudier la différence de diversité bactérienne sur la conservation de la viande.

Avant de pouvoir recommander l'utilisation de ce gel dans les abattoirs, des essais complémentaires sont nécessaires pour définir les facteurs impactant son efficacité ainsi que les conditions précises de mise en œuvre (pression, application, etc.). De plus, il ne se substituerait en aucun cas aux bonnes pratiques d'hygiène qui doivent toujours être rigoureusement appliquées par les opérateurs. Pour le moment, le MIRENAT®-NSF est autorisé seulement dans les produits carnés traités thermiquement, ce qui impliquerait d'orienter tous les morceaux potentiellement contaminés vers du cuit ou de démontrer que le produit ne représente pas un danger pour le consommateur sur la viande crue. Ce gel représente une piste intéressante et complémentaire qui mérite d'être approfondie afin d'améliorer la sécurité sanitaire des viandes et produits carnés.

Salifou, C.F.A., Boko, K.C., Ahounou, G.S., Tougan, P.U., Kassa, S.K., Houaga, I., Farougou, S., Mensah, G.A., Clinquart, A., Youssao, A.K.I., (2013). Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *International Journal of Biological and Chemical Sciences* 7, 1351–1369. <https://doi.org/10.4314/ijbcs.v7i3.4>.

Santé Publique France, (2024). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Données de la déclaration obligatoire, 2022. Édition nationale. Saint-Maurice : Santé publique France, 13 p., 2024. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-infectieuses-d-origine-alimentaire/toxi-infections-alimentaires-collectives/documents/bulletin-national/surveillance-des-toxi-infections-alimentaires-collectives.-donnees-de-la-declaration-obligatoire-2022>. (Consulté le 23 avril 2024).

Saraoui, T., Leroi, F., Björkroth, J., Pilet, M.F., (2016). *Lactococcus piscium*: a psychrotrophic lactic acid bacterium with bioprotective or spoilage activity in food—a review. *Journal of Applied Microbiology* 121, 907–918. <https://doi.org/10.1111/jam.13179>.

Vedeqsa, (2023). LAE ® innocuous preservative for the food industry, LAE. <https://www.lauric-arginate.com/innocuous-preservative-for-the-food-industry/>. (Consulté le 22 novembre 2023).

Zamora, L., Pérez-Sancho, M., Domínguez, L., Fernández-Garayzábal, J.F., Vela, A.I., (2017). *Jeotgalibaca porci* sp. nov. and *Jeotgalibaca arthritidis* sp. nov., isolated from pigs, and emended description of the genus *Jeotgalibaca*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 67, 1473–1477. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001741>.

Données supplémentaires

Figure S1 : distribution de la diversité α selon le type d'échantillon.

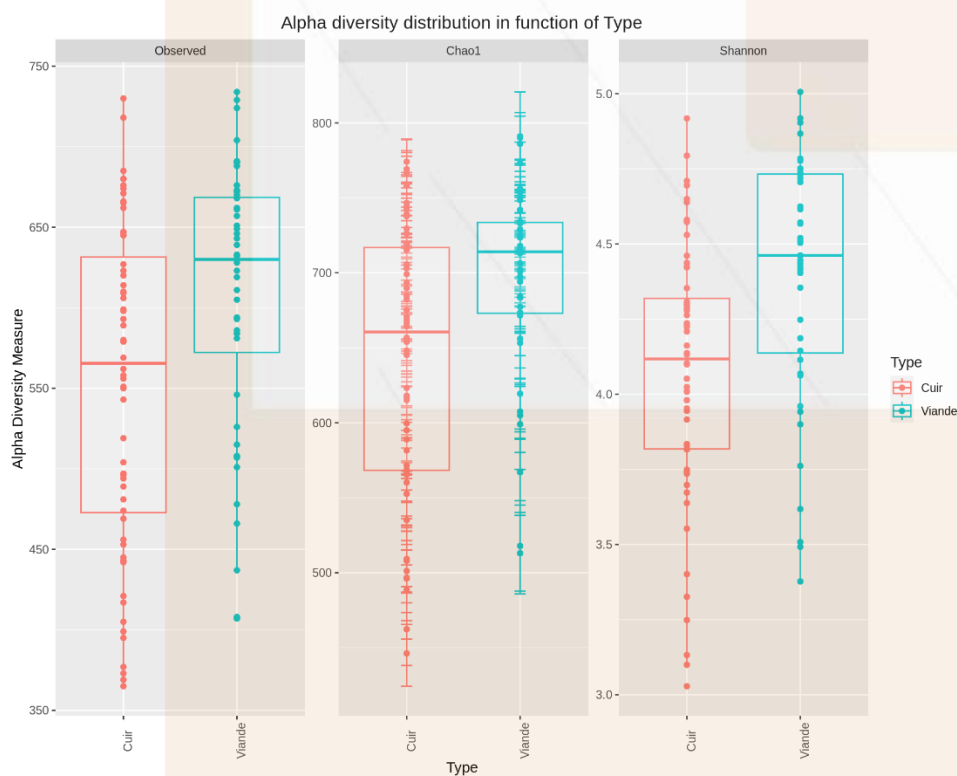


Figure S2 : Distribution de la diversité α selon la série de prélèvements.

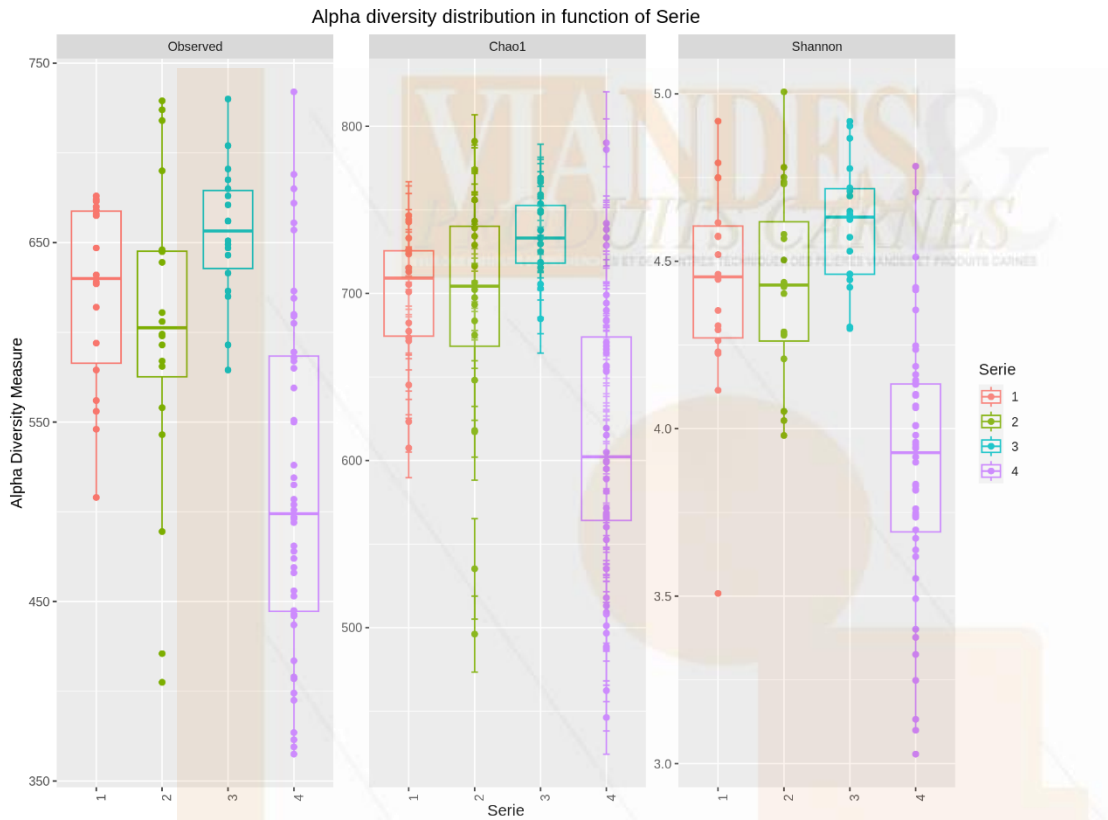


Figure S3 : Distribution de la diversité α selon le traitement au gel (échantillons issus de la carcasse uniquement)

