



Vitesse de refroidissement et nitrites : impact sur *Clostridium botulinum* dans le jambon cuit

Impact de la cuisson et du refroidissement sur le développement et la toxinogénèse de *Clostridium botulinum* durant la conservation du jambon cuit avec moins de nitrites et de NaCl

Mots clés : *Clostridium botulinum*, nitrites, jambon cuit, refroidissement

Auteurs : Bastien Fremaux¹, Amélien Jeanjot², Céline D'Alessandro², Sarah Lebrun², Tom Van Nieuwenhuysen³, Georges Daube², Antoine Clinquart²

¹IFIP Institut du porc, 9 boulevard du Trieux, 35740 Pacé, France

²Université de Liège, Faculté de médecine vétérinaire, FARA, Quartier Vallée 2, Avenue de Cureghem 10, 4000 Liège, Belgique

³Sciensano, Service pathogènes alimentaires, Rue Juliette Wytsman 14, 1050 Ixelles, Belgique

Cet article décrit les impacts du barème de cuisson et de refroidissement sur le développement et la toxinogénèse de *Clostridium botulinum* groupe II type B psychrotrophe durant la conservation de jambon cuit à teneurs réduites en nitrites et en NaCl.

Résumé

La maîtrise du danger *Clostridium botulinum* gr. II type B psychrotrophe dans le jambon cuit est la résultante de multiples facteurs étroitement liés les uns aux autres. Même si les nitrites jouent un rôle prépondérant, c'est le maintien de cet équilibre qui permet de garantir la sécurité du produit au regard de ce pathogène. Cette étude visait à évaluer l'impact de deux barèmes de cuisson et refroidissement, l'un comportant un refroidissement post-cuisson lent (28,5 h), le second, un refroidissement standard (10 h), sur le développement de *C. botulinum* psychrotrophe gr. II type B durant la conservation d'un jambon cuit modèle à teneurs réduites en nitrites de sodium (0 à 60 mg/kg) et en NaCl (18 g/kg versus un taux réduit de -25 % i.e. 13,5 g/kg). Une dose en NaNO₂ de 30 mg/kg suffisait pour inhiber la toxinogénèse durant la conservation des jambons cuits préalablement soumis au barème incluant un refroidissement post-cuisson standard, alors que 60 mg/kg étaient nécessaires lorsque la cuisson était suivie d'un refroidissement excessivement lent.

Abstract : Cooling rate and nitrites: impact on *Clostridium botulinum* in cooked ham

The control of the psychrotrophic *Clostridium botulinum* group II type B hazard in cooked ham results from multiple factors that are closely interlinked. Although nitrites play a key role, it is the maintenance of this balance that ensures the product's safety regarding this pathogen. This study aimed to assess the effect of two cooking-cooling regimens, including an usual (10 h) versus an extended (28.5 h) cooling period, on the growth of psychrotrophic *C. botulinum* group II type B during storage of a cooked ham model prepared with reduced levels of sodium nitrite (0 to 60 mg/kg) and sodium chloride (18 g/kg versus 13.5 g/kg). Only an ingoing amount of NaNO₂ of 60 mg/kg inhibited toxinogenesis of *C. botulinum* Group II type B in cooked ham samples subjected to the extended cooling regimen. In comparison, 30 mg NaNO₂ per kg were sufficient to prevent toxinogenesis in cooked ham cooled for 10.0 hours.

L'ESSENTIEL

Le botulisme humain est une maladie grave encore rencontrée sporadiquement en Europe. L'origine alimentaire, liée à l'ingestion de la toxine botulique produite par la bactérie dans l'aliment, est la forme la plus fréquente en Europe. Les produits carnés peuvent être contaminés par *Clostridium botulinum* lors de mauvaises pratiques d'abattage ou de manipulations inappropriées des viandes. Le nitrite de sodium (NaNO_2 , E250) est utilisé dans la filière charcutière pour son effet inhibiteur, notamment à l'encontre de *Clostridium spp.*, en particulier *C. botulinum*. Une étude antérieure a montré qu'un ajout de $\text{NaNO}_2 \geq 30$ mg/kg empêchait la croissance et la toxigenèse de *C. botulinum* groupe II type B dans un jambon cuit modèle soumis à un traitement thermique standard. La présente étude visait à examiner l'impact de deux barèmes de cuisson et de refroidissement, le premier incluant notamment un refroidissement post-cuisson lent (28,5 h simulant une défaillance de procédé, un éventuel point chaud d'une cellule de refroidissement ou encore le refroidissement de très grosses pièces de jambon cuit) alors que le second présentait un

refroidissement standard d'une dizaine d'heures, à partir d'un jambon cuit modèle préparé avec différents teneurs en NaNO_2 (0, 30, 60 mg/kg) et en NaCl (18 g/kg versus 13,5 g/kg). Pour cela, des mêlées de viande hachée ont été saumurées de manière appropriée (taux de 10,0 %, soit 0,1 kg de saumure pour 1 kg de viande de porc) puis inoculées avec un cocktail de trois souches de *C. botulinum* psychrotrophe groupe II type B à un taux d'inoculation cible de 3,2 Log₁₀ spores par gramme. Les mêlées ont été portionnées en échantillons de 50 g, lesquels ont été conditionnés sous vide puis cuits et refroidis suivant les deux barèmes visés. Ils ont ensuite été conservés suivant un scénario raisonnablement prévisible de 14 jours à 4°C suivis de 35 jours à 8°C avec une rupture de la chaîne du froid pendant 1 h à 20°C intercalée au 21^{ème} jour. Une dose en NaNO_2 de 30 mg/kg suffisait pour inhiber la toxigenèse durant la conservation des jambons cuits préalablement soumis au barème incluant un refroidissement post-cuisson standard, alors que 60 mg/kg étaient nécessaires lorsque la cuisson était suivie d'un refroidissement lent.

I. INTRODUCTION

Les nitrites en tant qu'additif alimentaire, contribuent à la sécurité microbiologique, la couleur et, par sa fonction antioxydante, à l'arôme des produits de charcuterie et de salaison. Pour certaines charcuteries vulnérables sur le plan microbiologique comme le jambon cuit, son utilisation (et dans une moindre mesure celle du sel) permet de garantir un niveau de sécurité suffisant vis-à-vis de *C. botulinum* (EFSA, 2010 ; Lebrun *et al.*, 2020). Dans son avis de 2010, l'EFSA indique que pour certains produits, à teneur réduite en sel et présentant une durée de vie longue (plusieurs semaines), l'ajout de 50 à 150 mg/kg de nitrites est recommandé pour inhiber la croissance de *C. botulinum*. Un taux d'incorporation maximal de 90 mg de nitrites de sodium (NaNO_2 , E250) par kg est actuellement stipulé pour les pièces cuites dans le code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes (mise à jour 2025). Ce taux est inférieur à celui imposé par la réglementation européenne i.e. 120 mg NaNO_2 par kg (Règlement (UE) 2023/2108).

Cette volonté de réduire, voire supprimer les nitrites dans certaines catégories de produits, fait notamment suite à l'avis de l'ANSES publié en juillet 2022,

soulignant l'existence d'une association positive entre l'exposition aux nitrates et/ou aux nitrites via la viande transformée et le risque de cancer colorectal (ANSES, 2022). Celle-ci s'ajoute à la démarche de réduction de la teneur en sel dans les produits, dont l'excès de consommation est reconnu comme un des facteurs de risque de l'hypertension artérielle et par conséquent de maladies cardiovasculaires. Cependant, leur diminution dans le jambon cuit pourrait favoriser le développement microbien, et notamment celui des formes végétatives de *C. botulinum* psychrotrophe (groupe II non protéolytique type B, dont la température minimale de croissance est de 2,5°C - ANSES, 2019) durant sa conservation. Des travaux antérieurs menés par l'IFIP et l'Université de Liège avaient d'ores et déjà montré qu'une dose d'emploi en nitrites de sodium ≥ 30 mg/kg (indépendamment de la dose de NaCl employée i.e. de 12 à 18 g/kg viande) permettait de garantir l'absence de croissance de *C. botulinum* gr II type B durant la conservation (14 jours à 4°C + 33 jours à 8°C) d'un jambon cuit modèle (à base de viande de porc hachée) suivant un refroidissement standard d'environ 13,5 h (permettant de passer de 67°C à 4°C). En revanche, l'absence de

nitrite permettait la croissance et la production de toxine botulique (Lebrun *et al.*, 2020). Par ailleurs, des souches de *C. botulinum* mésophiles gr. I (type A) et psychrotrophes gr. II (type B) inoculées en mélange dans le même jambon cuit modèle, n'étaient pas capables de se développer et de produire leurs toxines botuliques durant un refroidissement post-cuisson lent d'environ 27 h (incluant environ 23 h entre 48°C et 4°C, plage de température susceptible de permettre la croissance de *C. botulinum*), et ce, même pour la recette sans sel nitraté ajouté et avec une teneur cible en NaCl réduite de 25 % (i.e. 13,5 g NaCl par kg) (Frémaux *et al.*, 2020).

Aucune étude scientifique n'a toutefois été menée pour évaluer l'impact d'un refroidissement lent, qu'il est possible de rencontrer dans certaines situations (e.g. incidents de fabrication, éventuel point chaud dans certaines cellules de refroidissement ou encore le

refroidissement de très grosses pièces de jambon cuit), sur le comportement de *C. botulinum* psychrotrophe durant la phase ultérieure de conservation. Il est en effet possible qu'un tel refroidissement puisse favoriser la germination des spores et la reprise de croissance des formes végétatives lorsque les conditions deviennent favorables. Ceci pourrait s'avérer critique dans du jambon cuit formulé sans nitrite ajouté ou avec une teneur significativement réduite. Aussi, cette étude avait pour objectif d'évaluer l'impact de deux barèmes de cuisson et refroidissement, l'un comportant un refroidissement post-cuisson lent (28,5 h), le second, un refroidissement standard (10 h), sur le développement de *C. botulinum* psychrotrophe gr. II type B durant la conservation d'un jambon cuit modèle à teneurs réduites en nitrites de sodium (0 à 60 mg/kg) et en NaCl (18 g/kg versus un taux réduit de -25 % i.e. 13,5 g/kg).

II. MATERIELS ET METHODES

II.1. Souches de *C. botulinum* utilisées

Un cocktail de 3 souches de *C. botulinum* groupe II (non-protéolytique) type B (BL7, 300-05 et 815-12), toutes toxigènes, ont été utilisées pour ces essais. Toutes provenaient de la collection de l'Institut Pasteur (Paris, France) :

- Souche BL7 *C. botulinum* gr. II type B, souche de collection, origine Royaume-Uni.
- Souche 300-05 *C. botulinum* gr. II type B, isolée par le CNR en 2005 à partir d'un jambon sec de préparation familiale (département 46).
- Souche 815-12 *C. botulinum* gr. II type B, isolée par le CNR en 2012 à partir d'un jambon sec de préparation familiale (département 63).

II.2. Préparation des spores de *C. botulinum* groupe II type B

Les trois souches de *C. botulinum* gr. II type B (BL7, 300-05 et 815-12), conservées sous forme de cryotubes congelés à -80 °C, ont été individuellement cultivées en milieu BHI à +30 °C pendant douze semaines en anaérobiose pour provoquer la germination des spores, la croissance des formes végétatives et la sporulation. Les cellules ont ensuite été exposées à un choc thermique à +60 °C pendant 20

minutes pour détruire les formes végétatives et sélectionner les spores. Les spores ont été centrifugées à 4 500 g pendant 20 minutes, lavées puis remises en suspension dans de l'eau physiologique. Un pool des trois suspensions (à concentrations équivalentes en spores) a ensuite servi à l'ensemencement des échantillons.

II.3. Préparation des différentes recettes

Tenant compte de l'impossibilité technique d'inoculer un jambon dans toute sa masse, il a été proposé d'utiliser le jambon cuit modèle utilisé antérieurement par Lebrun *et al.* (2020) dans une étude visant à mesurer l'impact de différents teneurs en nitrites et en NaCl sur le développement de *C. botulinum* groupe II type B et la production associée de toxine botulique lors de la fabrication et de la conservation de jambon cuit. Ce modèle avait été initialement proposé par Redondo-Solano *et al.* (2013) pour étudier la croissance de *Clostridium perfringens* dans du jambon cuit selon différentes modalités.

Ce modèle est constitué de viande hachée de porc et des ingrédients sélectionnés. En tant que muscle 4D (dégraissé, désossé, dénervé et découenné) et de composition homogène, le « filet d'Anvers » de porc (grosse noix) a été choisi comme matière première pour

la fabrication du jambon cuit modèle. Cinq recettes (notées de R1 à R5) ont été testées en plus de la recette témoin (RT), laquelle a été préparée sans ajout de NaCl et de sel nitrité (Tableau 1).

Pour chaque recette, la viande a été hachée deux fois dans un hachoir (hachoir TX 98 Compact, Dadaux®, France) à une granulométrie de 4,5 mm jusqu'à l'obtention d'une masse homogène. Après hachage, la mēlée a été divisée en autant de portions que de recettes testées. Chaque portion a été saumurée à un taux de 10,0 % (soit 0,1 kg pour 1 kg de viande de porc) avec une saumure appropriée dont la teneur en dextrose et érythorbate de sodium était constante mais dont la teneur en sel et en sel nitrité a été ajustée (R1 à R5), pour obtenir les concentrations indiquées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Composition des recettes testées (exprimée par kg de viande).

Recette	RT	R1	R2	R3	R4	R5
Nitrite de sodium (mg/kg)	0	0	0	30	30	60
Sel fin (NaCl) (g/kg)	0	13,5	18	13,5	18	13,5
Erythorbate de sodium (mg/kg)	500	500	500	500	500	500
Dextrose (g/kg)	5	5	5	5	5	5

II.4. Inoculation des spores de *C. botulinum* et conditionnement

Pour chacune des recettes, une partie de la viande hachée a été contaminée à l'aide de la suspension de spores préparée à partir des 3 souches de *C. botulinum* gr. II type B à un taux d'inoculation cible de 3,2 Log₁₀ spores par gramme de viande (inoculum expérimental moyen de 3,21 ± 0,62 Log₁₀ UFC/g, toutes recettes et barèmes de cuisson/refroidissement confondus). Pour obtenir une bonne répartition des spores dans la viande après inoculation, celle-ci a été mélangée dans un robot Kenwood Major Titanium (Kenwood, Japon) à la vitesse « 1 » pendant 10 minutes. La viande ainsiensemencée a ensuite été répartie en portions de 50 g

dans des sachets Cryovac® CN 300 (Sealed Air, France) ayant une très faible perméabilité à l'oxygène (taux de transmission de l'oxygène de 13 cm³/m² après 24 h à une pression de 1 bar et à 23°C). L'autre partie de la viande hachée nonensemencée (servant entre autres à la réalisation des analyses physico-chimiques et à la vérification du niveau de contamination naturelle par *C. botulinum*) a été répartie de la même manière en sachets de 50 g. Tous les sachets ont été mis sous vide au moyen d'une machine simple cloche INV 10 (Intervac®, France), puis cuits et refroidis selon les deux barèmes ci-dessous.

II.5. Barèmes de cuisson et de refroidissement

Les courbes de cuisson et de refroidissement testées ont été acquises au sein d'entreprises charcutières volontaires via l'utilisation de sondes de température positionnées à cœur de barres de jambon cuit.

Notamment, le cas le plus défavorable enregistré chez un industriel charcutier en 2018 (jambon cuit localisé au point le plus chaud d'une cellule de refroidissement)

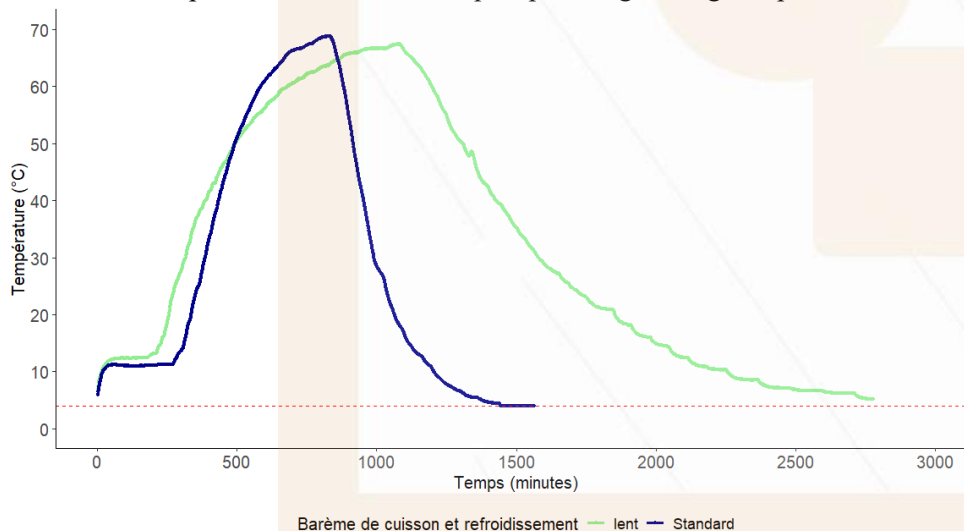
a été retenu pour simuler le barème thermique incluant un refroidissement lent.

Les deux courbes ont été reproduites expérimentalement sur le jambon cuit modèle au sein de l'unité pilote de l'Université de Liège. La cuisson a été réalisée dans une enceinte combinée Spakomat SPM 550 (Spako®, Pays-Bas) ; le refroidissement a été réalisé dans une enceinte climatique réfrigérée (MIR-253, Sanyo®, Japon). Pour déterminer l'évolution de la température à cœur du jambon cuit modèle durant la cuisson et le refroidissement, respectivement dans le four et l'enceinte climatique, une sonde de température (sonde de pénétration de type CTN, Testo AG

06102217-803 [thermistance à coefficient de température négatif], Testo®, Allemagne) a été introduite au cœur d'un échantillon de 50 g de viande de porc hachée et une sonde de température externe (de type CTN, Testo AG 06101720-001 [thermistance à coefficient de température négatif], Testo®, Allemagne) a été placée dans la cellule de cuisson et l'enceinte climatique. Les sondes étaient reliées à un enregistreur (datalogger Testo 171, Testo®, Allemagne) dont la fréquence d'enregistrement de la température a été fixée à une acquisition par minute (Figure 1).

Figure 1 : Courbes Temps-Température de cuisson-refroidissement (barème standard versus barème lent) appliquées aux échantillons de jambon cuit modèle.

La température de 4°C est indiquée par la ligne rouge en pointillé.



Le barème de cuisson et de refroidissement « standard » (VP70,10 proche de 144 min, germe de référence *Enterococcus faecalis*) présentait les caractéristiques suivantes :

- cuisson : température à cœur de +69,3°C atteinte en 550 min ;
- refroidissement : diminution de la température à cœur de +69,3°C à +8°C en 425 min et de +8°C à +4°C en 175 min (durée de refroidissement équivalente à 10 h).

Le barème de cuisson et de refroidissement « lent » (VP70,10 proche de 175 min, germe de référence *Enterococcus faecalis*) présentait les caractéristiques suivantes :

- cuisson : température à cœur de +67,7°C atteinte en 870 min ;

- refroidissement : diminution de la température à cœur de +67,7°C à +8°C en 1290 min et de +8°C à +4°C en 420 min (durée de refroidissement équivalente à 28,5 h).

Afin de pallier une contrainte de mise en œuvre expérimentale, les échantillons ont dû être entreposés dans le four éteint environ 3,5 heures (barème incluant le refroidissement standard) ou 4,5 heures (barème incluant le refroidissement lent) avant le démarrage de la cuisson. Lors du démarrage de la cuisson, les températures à cœur des échantillons étaient relativement proches entre les deux barèmes de cuisson et refroidissement testés, avec des valeurs respectives de 12,1°C et 13,1°C

II.6. Conditions de conservation

Les échantillons de jambon cuit modèle ont été conservés durant 49 jours selon le scénario suivant :

- 14 jours à +4 °C,
- 7 jours à +8°C suivis d'une rupture de la chaîne du froid pendant 1 h à +20 C,

II.7. Analyses microbiologiques

Sept points d'analyse ont été effectués : J0 avant cuisson/refroidissement (J0av) ou après cuisson/refroidissement (J0ap), J20, J25, J29, J35 et J49. A chaque point d'analyse, trois échantillons inoculés par recette ont été analysés pour le dénombrement de *C. botulinum* présomptifs sur gélose Tryptone Sulfite après 24 à 48h d'incubation en anaérobiose à 30°C. A J0ap et J49, ces mêmes échantillons ont été utilisés pour dénombrer la flore lactique sur gélose MRS après 72 h d'incubation à 30°C en aérobiose.

II.8. Calcul du potentiel de croissance de *C. botulinum* gr. II type B

Pour chaque recette et chaque barème de cuisson et de refroidissement mis en œuvre, la moyenne des trois échantillons analysés pour le dénombrement de *C. botulinum* à chaque point d'échantillonnage a été calculée. Les valeurs de potentiel de croissance (Δ) ont été calculées selon l'équation de la norme ISO 20976-1 : $\Delta = \log_{max} - \log_i$ où \log_{max} est la valeur la

- 28 jours à +8°C.

Ces conditions ont été reproduites dans des enceintes climatiques réfrigérées Sanyo MIR-254.

Un dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (FAMT) sur gélose PCA après 72 h d'incubation à 30°C a été effectué à J0av, J0ap et J49 à partir de trois échantillons non inoculés de la recette témoin RT. Pour la recette témoin RT, trois échantillons non inoculés ont été analysés à J0av, J0ap et J49 pour vérifier le niveau de contamination naturelle par des bactéries anaérobies sulfito-réductrices dont *C. botulinum*. Tous étaient inférieurs à la limite de quantification de la méthode utilisée ($< 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$), quelle que soit le stade d'analyse (données non montrées).

plus élevée de ces moyennes et \log_i est la valeur de la moyenne à J0ap. Il a été considéré que les échantillons de jambon cuit modèle permettaient la croissance du pathogène lorsque Δ était supérieur à $0,5 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$. Lorsque Δ était négatif, une valeur de $0 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ a été indiquée.

II.9. Détection de la toxine botulique par bio-essai sur souris

La recherche de la toxine botulique a été réalisée à J0ap à partir de cinq échantillons de la recette témoin RT, ainsi qu'à partir de trois échantillons de chacune des recettes à J20, J25, J29, J35 et J49 par l'Institut Scientifique de la Santé Publique (Sciensano, Bruxelles, Belgique), selon la méthode de référence par bio-essai sur souris. Les tests ont été approuvés par le comité d'éthique de Sciensano (dossier n°20201104-01). A chaque date d'analyse, dans un souci d'éthique, dès qu'un échantillon d'une recette donnée était positif pour la toxine botulique, les 2 autres échantillons issus de la même recette n'ont pas été testés.

Brièvement, 25 g de chaque échantillon ont été homogénéisés dans 25 ml de tampon phosphate-gélatine (0,4 % de Na_2HPO_4 , 0,2 % de gélatine, pH 6,2). Après centrifugation, le surnageant a été filtré avec un filtre de $0,45 \mu\text{m}$. Le filtrat obtenu a été administré à deux souris par injection intrapéritonéale, à raison de $400 \mu\text{l}$ par souris. Les animaux ont été

surveillés pendant une période de quatre jours afin de détecter l'apparition de symptômes du botulisme. En cas d'apparition de symptômes et/ou de mortalité, un test de séroneutralisation a été réalisé afin de confirmer la présence de la toxine botulique de type B (BoNT/B). Pour ce test, deux souris témoins ont reçu par voie intrapéritonéale le filtrat ($400 \mu\text{l}$ par souris), tandis que deux autres souris ont reçu par voie intrapéritonéale un mélange composé du filtrat ($400 \mu\text{l}$) et d'anticorps neutralisants anti-BoNT/B (NIBSC ; $100 \mu\text{l}$ à 10 UI/ml). Un échantillon était considéré comme positif pour la BoNT/B lorsque les souris témoins présentaient des symptômes du botulisme, tandis que les souris ayant reçu les anticorps étaient exemptes de symptômes. La sensibilité du test est exprimée en « DL50 » (quantité de produit, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % d'un groupe d'animaux d'essai) ; celle-ci est de l'ordre de 5 à 10 pg par souris (Rossetto et Montecucco, 2019).

II.10. Analyses physico-chimiques

Des mesures du pH et de l'activité de l'eau (aw) ont été réalisées à J0ap et J49 à partir d'un échantillon non inoculé par recette. Un dosage du sodium a été réalisé à J0ap à partir de trois échantillons non inoculés par recette. Un dosage des nitrite et nitrate résiduels a été

réalisé à J0ap et J49 à partir de trois échantillons non inoculés par recette. Le jus de cuisson des échantillons a été retiré et le produit a été essuyé avec du papier absorbant avant analyse.

II.10.1. Mesure du pH

Le pH a été mesuré selon la méthode destructive décrite dans la norme ISO 2917 : 1999 « Viandes et produits à base de viande – Mesurage du pH (méthode de référence) », au moyen d'un pH-mètre Knick 765 CALIMATIC® (Knick, Allemagne) avec correction de la valeur de pH en fonction de la température. Le pH-mètre était équipé d'une électrode combinée Mettler-

Toledo® LoT406-M6-DXK-S7/25 (Urdorf, Suisse) pour mesure dans les aliments solides et d'une sonde de température Knick® PT1000. La valeur de pH a été lue directement sur l'affichage de l'appareil, à 0,01 unité près et arrondie à 0,05 unités, tenant compte de l'incertitude de mesure.

II.10.2. Mesure de l'aw

La méthode utilisée est une méthode interne du laboratoire basée sur les recommandations de la norme ISO 18787 : 2017. L'activité de l'eau (aw) des échantillons a été mesurée au moyen d'un aw-mètre Aqualab® 4TE (Meter Group, Allemagne), gradué à

0,001 unité d'aw et dont la température de la micro-enceinte est maîtrisée à ± 1 °C près. L'aw est déterminée sur la base de la mesure du point de rosée dans la micro-enceinte à +25 °C et arrondie à 0,01 unité aw.

II.10.3. Analyse de la teneur en sodium

La teneur en sodium a été mesurée par spectrométrie d'émission optique à plasma à couplage inductif (ICP-OES) au laboratoire LABEXIA (Quimper, France). L'analyse est réalisée à partir d'une prise d'essai de 2 g provenant d'un broyat homogène de l'échantillon (200 g minimum). La solution d'essai, obtenue par minéralisation par voie humide basse pression (système ouvert), a été nébulisée puis l'aérosol transféré dans un

plasma d'argon induit par haute fréquence. Après atomisation et ionisation des éléments, la concentration en sodium a été déterminée par spectrométrie d'émission atomique sur la base de l'intensité de la lumière émise à des longueurs d'onde spécifiques. La teneur équivalente en NaCl ($\text{Na} (\%) \times 2,5$) a été exprimée en g NaCl / kg de produit.

II.10.4. Analyses des teneurs en nitrites et nitrates

La teneur en nitrites a été déterminée selon la norme ISO 2918 : 1975 « Viandes et produits à base de viande – Détermination de la teneur en nitrites (Méthode de référence) » adaptée en interne. Elle est exprimée en mg de nitrite de sodium / kg de produit. La teneur en

nitrates a été mesurée après réduction des nitrates en nitrites selon la méthode de Jones (1983) qui constitue une alternative à l'utilisation d'une colonne au cadmium. Elle est exprimée en mg de nitrate de sodium / kg de produit.

II.11. Analyses statistiques

Une seule expérience a été menée, avec l'analyse d'un ou trois échantillons (selon l'analyse effectuée)

par modalité testée. En raison du faible nombre de réplicats, aucune analyse statistique n'a été réalisée.

III. RESULTATS ET DISCUSSION

III.1. Caractéristiques physico-chimiques des échantillons de jambon cuit modèle

Les valeurs d'aw et de pH des échantillons de jambon cuit modèle étaient relativement homogènes entre les différentes recettes, et ce, quel que soit le

barème de cuisson/refroidissement testé (Tableaux 2A et 2B). Ces valeurs correspondent à celles habituellement observées pour du jambon cuit

(données internes). Ces paramètres sont restés stables durant la conservation, avec des valeurs moyennes (toutes dates, recettes et barèmes de cuisson et refroidissement confondus) de $0,99 \pm 0,006$ et $6,14 \pm 0,04$ unités, respectivement.

Les niveaux de sel mesurés à partir du dosage des ions sodium étaient relativement cohérents par rapport aux valeurs cibles attendues (Tableaux 2A et 2B). Les écarts mineurs observés (jusqu'à 0,9 g/kg) restent représentatifs de l'écart de pesée possible en entreprise, voire d'une éventuelle hétérogénéité de répartition de la saumure dans les muscles.

Compte tenu des réactions de transformation des nitrites et des nitrates dans les produits à base de viande, leur dosage et l'interprétation des résultats sont extrêmement complexes et ne peuvent être dissociés. Le règlement (CE) n°1333/2008 précise par ailleurs que des nitrates peuvent être présents dans certains produits à base de viande traités thermiquement, en raison de la conversion naturelle des nitrites en nitrates dans un milieu de faible acidité (Code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes). Dans cet essai, alors qu'aucun nitrate n'a été ajouté, les teneurs en nitrates oscillaient à J0ap entre 5,3 et 9,3 mg NaNO_3/kg pour les recettes supplémentées en sel nitrité (*versus* 1,4 à 4,8 mg NaNO_3/kg pour celles sans sel nitrité ajouté), quel que soit le barème de cuisson et

refroidissement appliqué (Tableaux 2A et 2B). L'apport de nitrates par l'eau déminéralisée utilisée est peu probable ou négligeable (à noter que l'eau du réseau peut toutefois en contenir) ; cependant un apport par la viande fraîche n'est pas exclu (ANSES, 2022 ; Bianco Junior *et al.*, 2022). A titre indicatif, Bianco *et al.* (2022) ont mesuré des teneurs en nitrates dans des échantillons de viande fraîche de porc ($n = 30$) allant de 7,8 à 25,2 mg NaNO_3/kg . Pour les recettes supplémentées en sel nitrité, les taux résiduels de nitrites étaient relativement faibles ($\leq 5,7$ mg NaNO_2/kg), bien que conformes à ceux habituellement mesurés (i.e. < 20 mg/kg, Talon *et al.*, 2015). Ceci s'explique par l'importante réactivité du nitrite, laquelle était par ailleurs favorisée par la présence d'érythorbate de sodium. Ce dernier permet la réduction du nitrite en favorisant le passage de l'acide nitreux (HNO_2) en oxyde nitrique (NO), ainsi que la réduction du fer ferrique de l'hème en fer ferreux, promouvant ainsi le développement de la couleur via la formation de nitrosomyoglobine. A noter qu'aucun nitrite résiduel n'a été détecté dans les recettes sans sel nitrité ajouté (< 1 mg NaNO_2/kg). Aucune différence majeure n'a pu être mise en évidence entre les teneurs en nitrites/nitrates des jambons cuits issus des deux barèmes de cuisson et de refroidissement testés.

Tableaux 2 : Caractéristiques physico-chimiques des jambons cuits modèles issus des différentes recettes testées et ayant subi le barème de cuisson et de refroidissement « standard » (A) ou « lent » (B).

Les valeurs moyennes \pm SD affichées pour les teneurs en sel (NaCl), en nitrite de sodium (NaNO_2) et en nitrate de sodium (NaNO_3) ont été obtenues à partir de mesures réalisées sur trois échantillons différents.

A

Recette	pH		a_w		NaCl (g/kg)		NaNO_2 (mg/kg)		NaNO_3 (mg/kg)	
	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49
RT	6,15	6,15	0,99	1,00	$1,2 \pm 0,00$	ND	$< 1,0$	$< 1,0$	$2,2 \pm 0,49$	0,8 $\pm 0,00$
R1	6,15	6,10	0,99	0,98	$13,2 \pm 0,83$	ND	$< 1,0$	$< 1,0$	$4,8 \pm 0,49$	1,7 $\pm 1,46$
R2	6,15	6,10	0,99	0,98	$18,0 \pm 0,70$	ND	$< 1,0$	$< 1,0$	$3,9 \pm 0,97$	1,1 $\pm 0,49$
R3	6,15	6,10	0,99	0,99	$13,1 \pm 0,72$	ND	1,0 $\pm 0,00$	1,0 $\pm 0,00$	9,3 $\pm 1,68$	9,5 $\pm 3,40$
R4	6,10	6,10	0,98	0,98	$18,0 \pm 0,81$	ND	1,3 $\pm 0,58$	1,0 $\pm 0,00$	7,6 $\pm 2,23$	7,0 $\pm 0,49$
R5	6,10	6,15	0,99	0,99	$13,3 \pm 0,55$	ND	5,7 $\pm 0,58$	2,0 $\pm 0,00$	8,7 $\pm 0,97$	2,0 $\pm 0,97$

B

Recette	pH		a _w		NaCl (g/kg)		NaNO ₂ (mg/kg)		NaNO ₃ (mg/kg)	
	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49	J0ap	J49
RT	6,10	6,15	0,99	1,00	1,2 ± 0,00	ND	< 1,0	< 1,0	3,4 ± 1,46	2,0 ± 0,49
R1	6,20	6,15	0,99	0,99	12,6 ± 0,44	ND	< 1,0	< 1,0	2,2 ± 0,97	5,6 ± 0,49
R2	6,20	6,10	0,99	0,98	17,9 ± 1,51	ND	< 1,0	< 1,0	1,4 ± 0,49	0,8 ± 0,00
R3	6,20	6,20	0,99	0,98	13,4 ± 1,44	ND	1,3 ± 0,58	1,0 ± 0,00	6,7 ± 0,00	7,3 ± 0,49
R4	6,15	6,15	0,98	0,98	17,4 ± 0,46	ND	1,0 ± 0,00	1,0 ± 0,00	5,9 ± 0,00	5,9 ± 0,00
R5	6,10	6,10	0,98	0,99	13,6 ± 0,47	ND	2,7 ± 0,58	1,0 ± 0,00	5,3 ± 0,49	7,3 ± 0,49

*NR = Non réalisée

III.2. Caractéristiques microbiologiques des échantillons de jambon cuit modèle

La cuisson a permis de réduire la population en flore aérobie mésophile totale (FAMT) des jambons, passant de $4,41 \pm 0,09 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ en moyenne avant cuisson à $2,22 \pm 1,14 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ après cuisson et refroidissement, indépendamment du barème mis en œuvre (Tableau 3). Cette flore résiduelle était certainement composée de bactéries sporulées (par exemple du genre *Bacillus* et genres apparentés) ou de

cellules végétales thermoduriques, lesquelles n'ont toutefois pas été retrouvées en fin de conservation ($< 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). La flore lactique était inférieure à la limite de quantification de la méthode utilisée à J0ap (i.e. $< 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$). Une population résiduelle (jusqu'à $2,7 \pm 0,44 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ en moyenne) a cependant été quantifiée dans les échantillons des recettes R3 et R4 en fin de conservation.

Tableau 3 : Populations de flore lactique (Log₁₀ UFC/g) dans les échantillons de jambon cuit modèle issus des différentes recettes à J0av, J0ap et J49, pour les 2 barèmes de cuisson et de refroidissement notés « standard » et « lent » (pour chaque modalité, valeur moyenne ± SD calculée à partir de trois échantillons différents).

Les populations en flore mésophile totale dénombrées, pour la recette témoin RT uniquement, sont notées entre parenthèses et en italique. Lorsque les populations étaient inférieures au seuil de quantification de la méthode, le résultat $< 0,7 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ est mentionné.

Recette	J0av		J0ap		J49	
	Standard	Lent	Standard	Lent	Standard	Lent
RT	NR* (<i>4,4 ± 0,11</i>)	NR (<i>4,4 ± 0,09</i>)	< 0,7 (<i>2,0 ± 1,71</i>)	< 0,7 (<i>2,5 ± 0,32</i>)	< 0,7 (<i>< 0,7</i>)	< 0,7 (<i>< 0,7</i>)
R1	NR	NR	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7
R2	NR	NR	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7
R3	NR	NR	< 0,7	< 0,7	1,5 ± 0,76	2,7 ± 0,44
R4	NR	NR	< 0,7	< 0,7	< 0,7	1,6 ± 0,25
R5	NR	NR	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7

*NR = Non réalisée

III.3. Croissance et toxinogénèse de *C. botulinum* gr. II type B dans les échantillons de jambon cuit modèle

En fin de refroidissement (J0ap), aucune toxine botulique n'a été détectée dans la recette témoin, et ce, quel que soit le barème de cuisson et de refroidissement testé (Tableau 4). Ces résultats rejoignent ceux d'une précédente étude où des souches de *C. botulinum* gr. I (type A) et gr. II (type B) n'étaient pas capables de se développer et de produire leurs toxines botuliques durant une phase de refroidissement prolongée (27 h dont 23 h entre 48 °C et 4 °C, plage de température susceptible de permettre la croissance de *C. botulinum*), et ce, même pour la recette sans sel nitrité ajouté (Frémaux *et al.*, 2020).

Dans les conditions de conservation testées, une détection positive de la toxine botulique a été observée dès le premier point d'analyse (J20, i.e. après seulement 6 jours à 8 C) pour les recettes sans sel nitrité

ajouté (RT, R1 et R2) cuites et refroidies selon le barème lent. Un résultat similaire a été obtenu pour les recettes RT et R1 soumises au barème de cuisson et de refroidissement standard, alors que la recette R2, exempte de sel nitrité mais avec une dose en NaCl ajoutée de 18 g/kg (versus 13,5 g/kg pour R1), était positive à partir de J25 (i.e. après 11 jours à 8°C). En comparaison, l'utilisation d'une dose de 30 mg NaNO₂/kg (avec 13,5 ou 18 g NaCl par kg de produit) permettait d'inhiber la croissance et la toxinogénèse dans les échantillons cuits et refroidis selon le barème standard, mais pas dans les échantillons cuits et refroidis suivant le barème lent. En revanche, aucune toxine botulique n'a été détectée dans la recette R5 préparée avec 60 mg NaNO₂/kg, quel que soit le barème de cuisson et de refroidissement testé.

Tableau 4 : Détection de la toxine botulique de type B par bio-essai dans les échantillons de jambon cuit modèle issus des différentes recettes, cuits et refroidis selon le barème « standard » versus « lent » (nombre d'échantillon(s) positif(s)/nombre total d'échantillons testés).

Recette	Barème standard						Barème lent					
	J0ap	J20	J25	J29	J35	J49	J0ap	J20	J25	J29	J35	J49
RT	0/5	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	0/5	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
R1	NR*	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1	NR	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
R2	NR	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1	NR	1/1	1/1	1/1	1/1	1/1
R3	NR	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	NR	0/3	1/1	1/1	1/1	1/1
R4	NR	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	NR	0/3	1/3	2/3	1/1	1/1
R5	NR	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	NR	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

*NR = Non réalisée

Sur la base des données de dénombrement obtenues, un résultat contradictoire a été obtenu pour la recette R2 soumise au barème de cuisson et de refroidissement standard ; pourtant toxine-positive dès J25. Cette recette présentait un potentiel de croissance de 0 Log10 UFC/g (Figure 2). Même si les échantillons analysés pour le dénombrement du pathogène et ceux envoyés pour la détection de toxines botuliques sont systématiquement différents, l'effet échantillonnage est peu probable au vu du protocole employé et la multiplicité des analyses réalisées au cours de la

conservation. Il est toutefois possible que cet écart soit lié au développement d'une mince fraction de cellules, laquelle ait pu produire une quantité détectable de toxines botuliques par bio-essai dont le niveau de sensibilité est supérieur à celui des analyses de dénombrements. A cela s'ajoute la difficulté de cultiver les souches de *C. botulinum* gr. II type B utilisées, à l'origine de résultats de dénombrement parfois hétérogènes entre les échantillons analysés. Ces éléments soulignent la nécessité de systématiquement effectuer la recherche de la toxine botulique lors de la

réalisation d'un test de croissance impliquant *C. botulinum*, comme précédemment suggéré par Lebrun *et al.* (2020).

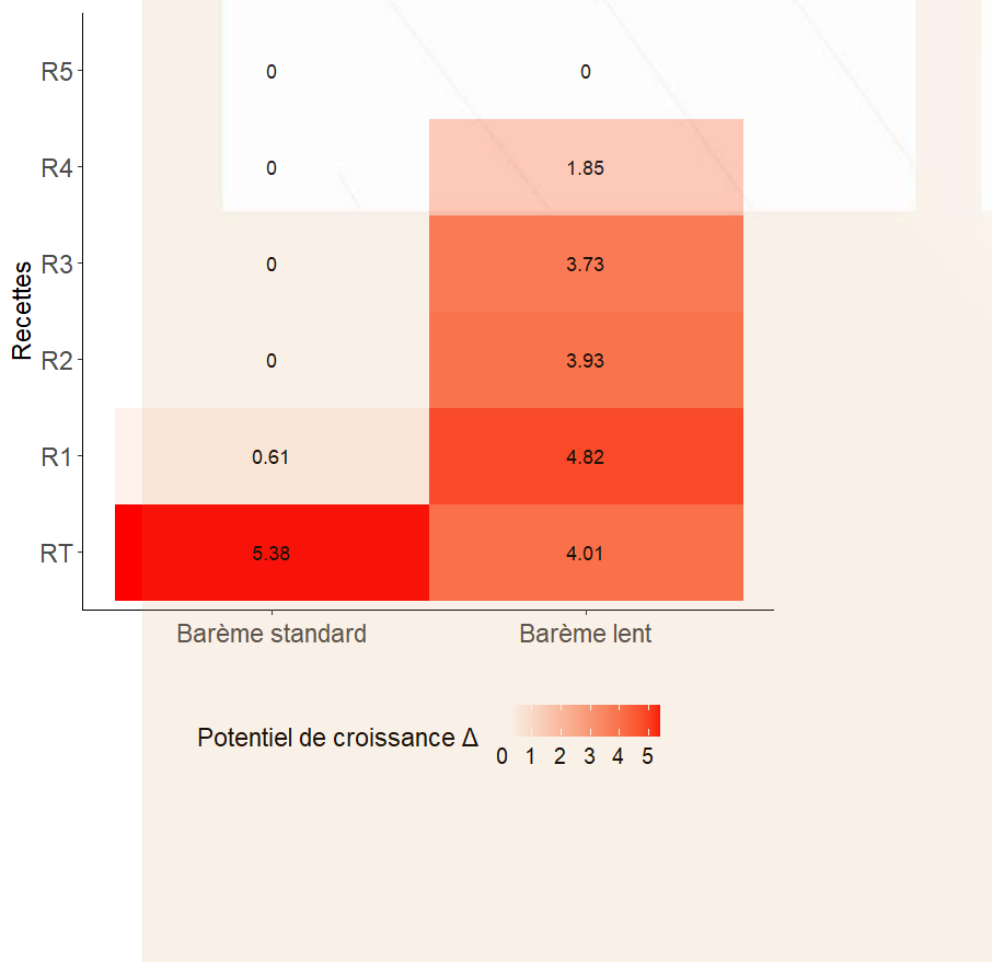
Lors d'une précédente étude il avait été démontré qu'une dose de 30 mg NaNO₂/kg suffisait à prévenir la croissance de *C. botulinum* gr. II type B et la production de toxine associée dans le même jambon cuit modèle cuit et refroidi selon un barème standard et conservé selon un scénario temps/températures similaire à celui mis en œuvre dans la présente étude (Lebrun *et al.*, 2020). Les données de la présente étude démontrent que cette dose est insuffisante dans le cas de jambons soumis à un cycle de cuisson et de refroidissement plus lent, incluant notamment une durée de refroidissement prolongée équivalente à 28,5h (dont ≈ 23,5 h entre 45 C et 4 C, plage de température susceptible de supporter le développement de *C. botulinum* gr. II type

B) ; une situation pouvant être rencontrée par exemple lors d'incidents de fabrication, au niveau de points chauds dans certaines cellules de refroidissement ou lors du refroidissement de très grosses pièces de jambon cuit.

Dans ce cas, une teneur ajoutée de 60 mg NaNO₂/kg est nécessaire pour inhiber la croissance et la toxinogénèse de *C. botulinum* gr. II type B dans le jambon cuit modèle conservé durant 14 jours à +4°C suivis de 35 jours à +8°C et avec une rupture de la chaîne du froid d'1 h à +20°C à J21. Ces résultats montrent que la maîtrise du danger *C. botulinum* gr. II type B dans le jambon cuit est la résultante de multiples facteurs étroitement liés les uns aux autres. C'est le maintien de cet équilibre multifactoriel qui permet de garantir la sécurité du produit au regard de ce pathogène.

Figure 2 : Valeurs du potentiel de croissance (Δ) de *C. botulinum* gr. II type B (Log10 UFC/g) obtenues pour les différentes recettes testées en fonction du barème de cuisson et de refroidissement utilisé.

Les valeurs supérieures à 0,5 Log10 UFC/g présentent un fond rouge plus ou moins prononcé en fonction des valeurs (moyenne de 3 mesures) plus ou moins élevées calculées.



IV. CONCLUSIONS

Dans les conditions de conservation testées, l'utilisation d'une dose de 30 mg NaNO₂/kg a permis d'inhiber la croissance de *C. botulinum* gr. II type B et la toxinogénèse associée dans les échantillons de jambon cuit modèle soumis à un barème de cuisson et de refroidissement standard (avec notamment un refroidissement d'une durée de 10 h), contrairement à ceux cuits et refroidis suivant le barème lent (incluant notamment un refroidissement d'une durée de 28,5 h dont environ 23,5 h entre 45°C et 4°C, plage de température susceptible de supporter le développement de *C. botulinum* gr. II type B), et ce, de manière indépendante de la dose ajoutée en NaCl (13,5 ou 18 g/kg). Seule une dose ajoutée de 60 mg NaNO₂/kg (combinée à une dose en NaCl de 13,5 g/kg) a empêché la croissance et la production associée de toxine botulique dans le jambon cuit modèle, quel que soit le barème de cuisson et de refroidissement appliqué.

A noter que cette dose d'emploi en nitrites de sodium est inférieure à celles imposées par le code des usages de la charcuterie, de la salaison et des conserves de viandes en France (i.e. 90 mg NaNO₂ / kg) et la réglementation européenne (i.e. 120 mg NaNO₂ / kg)

(Règlement (UE) 2023/2108). Ces résultats soulignent que la maîtrise du danger *C. botulinum* gr. II type B dans le jambon cuit est la résultante de multiples facteurs étroitement liés les uns aux autres. Seul le maintien de cet équilibre permet de garantir la sécurité du produit au regard de ce pathogène.

Par ailleurs, les doses ajoutées de nitrites de sodium trouvées efficaces dans la présente étude ne sont qu'indicatives, obtenues à partir d'un jambon cuit modèle dont la composition homogène favorise la reproductibilité des essais et la comparabilité des résultats. La dose d'emploi recommandée doit être ajustée afin de tenir compte de la variabilité des pratiques et des procédés rencontrés dans la filière. Il est également essentiel pour les professionnels d'optimiser leurs procédés de préparation de la saumure, d'injection et de barattage afin de favoriser une répartition homogène des nitrites dans leurs produits. Par ailleurs, si l'excellente cohérence des résultats obtenus souligne une certaine robustesse quant aux conclusions émises, il serait toutefois nécessaire de compléter cette étude avec des répétitions indépendantes supplémentaires.

Références

- ANSES (2019) Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : *Clostridium botulinum*, *Clostridium* neurotoxigènes, <https://www.anses.fr/system/files/BIORISK2016SA0074Fi.pdf>.
- ANSES, GT NiNa (2022) Évaluation des risques liés à la consommation de nitrates et nitrites. Avis révisé de l'ANSES – Rapport d'expertise collective, <https://www.anses.fr/en/system/files/ERCA2020SA0106Ra.pdf>.
- Bianco Junior, A., Dagher, H., & Kindlein, L. (2022). Baseline sodium nitrate and nitrite concentrations in fresh and processed meats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104227.
- EFSA (2010) EFSA Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food (ANS); Statement on nitrites in meat products. *EFSA Journal* 8(5), 1538.
- Frémaux B., Lhommeau T., Lebrun S (2020) Impact de teneurs réduites en nitrite et en NaCl sur le développement de *Clostridium botulinum* types A et B durant la phase de refroidissement post-cuisson du jambon cuit. Rapport d'étude APRIVIS.
- Lebrun S., Van Nieuwenhuysen T., Crèvecoeur S., Vanleyssem R., Thimister J., Denayer S., Jeuge S., Daube G., Clinquart A., Fremaux B. (2020). Influence of reduced levels or suppression of sodium nitrite on the outgrowth and toxinogenesis of psychrotrophic *Clostridium botulinum* Group II type B in cooked ham. *International Journal of Food Microbiology*; 334,108853.
- Redondo-Solano M., Valenzuela-Martinez C., Cassada D.A., Snow D.D., Juneja V.K., Burson D.E. and Thippareddi H. (2013) Effect of meat ingredients (sodium nitrite and erythorbate) and processing (vacuum storage and packaging atmosphere) on germination and outgrowth of *Clostridium perfringens* spores in ham during abusive cooling. *Food Microbiology* 35, 108-115.
- Rossetto, O., Montecucco, (2019) C. Tables of Toxicity of *Botulinum* and *Tetanus* Neurotoxins. *Toxins*, 11(12), 686. <https://doi.org/10.3390/toxins11120686>
- Talon R., Leroy S., Vermassen A., Christieans S. (2015) Réduction des nitrates, nitrites dans les produits carnés : quelles conséquences ? Quelles solutions ? Synthèse INRA, <https://hal.inrae.fr/hal-02641672v1/document>.