



République de Côte d'Ivoire  
Union-Discipline-Travail

Ministère de l'Enseignement Supérieur et  
de la Recherche Scientifique



UFR des Sciences et  
Technologies des Aliments

Année Universitaire  
2015-2016

## THÈSE UNIQUE

pour l'obtention du titre de Docteur de l'Université Nangui  
Abrogoua

**Spécialité : Microbiologie et Biologie Moléculaire**

Numéro d'ordre  
296

Présentée par

**YOBOUET Bassa Antoine**

**THÈME :**

**Contamination du lait cru et de  
l'*attiéké* vendus sur les marchés  
informels à Abidjan (Côte d'Ivoire)  
par le groupe *Bacillus cereus* et  
analyse des risques**

Soutenue publiquement  
le 03/05/2016

### **Commission d'examen**

- BOHOUA Louis Guichard, Professeur titulaire, UNA ..... : Président
- DJÈ Koffi Marcellin, Professeur titulaire, UNA ..... : Co-directeur
- BONFOH Bassirou, Maître de recherches, CSRS ..... : Co-directeur
- KOFFI-NEVRY Rose, Professeur titulaire, UNA ..... : Rapporteur
- TETCHI Fabrice Achille, Maître de conférences, UNA ..... : Rapporteur
- KAROU Tago Germain, Maître de conférences, UFHB ..... : Examinateur
- LOUKOU Yao Guillaume, Maître de conférences agrégé, UFHB ... : Examinateur



**DÉDICACE**

Je dédie le présent mémoire de thèse :

*À ma famille*

Mon grand frère **KOUACOU Koffi Raoul** et sa femme Mme **KOUACOU née YAO Adjoua Denise**, comme un père et une mère qui ont tout mis en œuvre pour satisfaire à tous mes besoins et à mon épanouissement intellectuel ; que Dieu vous garde encore longtemps parmi nous.

Mes frères **YOBOUET Kadja Ignace** et **YOBOUET Kouadio Joseph** et ma sœur **YOBOUET N'da Brou Rosalie** pour leur soutien indéfectible à chaque fois qu'ils ont été sollicités.

*À ma fiancée et à mes jumeaux*

Ma chérie **N'ZI Amino Rose**, pour sa sympathie, sa patience, son amour permanent et ses prières sans cesse croissantes qui m'ont permis de vaincre toutes les difficultés rencontrées pendant ces cinq années de thèse.

Mes jumeaux **YOBOUET Luis-Emmanuel Kouassi** et **YOBOUET Marie-Grâce Carelle Akissi** pour la joie incommensurable qu'ils m'apportent dans ma vie et dans les moments de détresse.

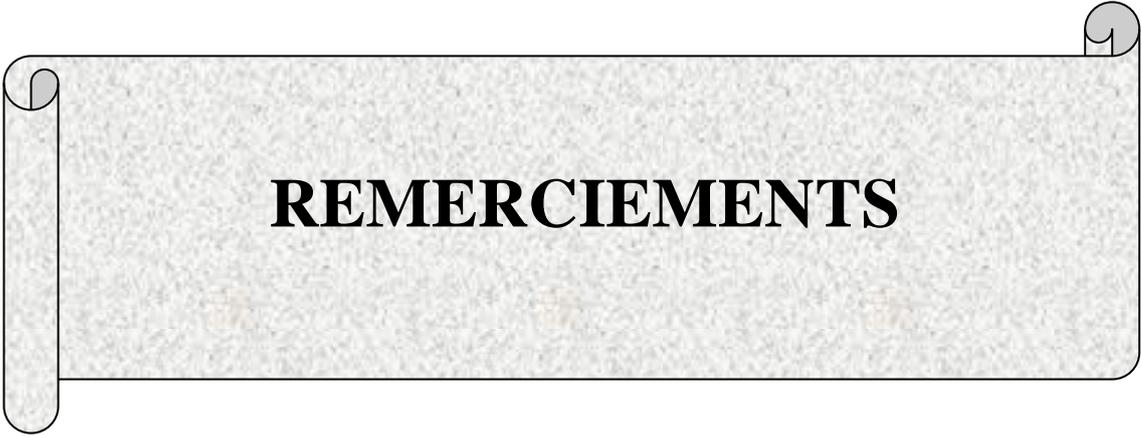
*Que Dieu vous bénisse et vous protège !*

## ***IN MEMORIAM***

Mon père Feu **YOBOUET Kouakou Benjamin** qui, de son vivant, m'a apporté son amour, sa confiance et son soutien indéfectible.

Ma mère feu **YAO Akissi** et ma sœur jumelle feu **YOBOUET Akissi Célestine** si tôt rappelées à Dieu, je prie pour le repos de leurs âmes dans le Paradis de notre Seigneur Jésus-Christ.

Amen !



**REMERCIEMENTS**

La présente thèse représente cinq années de recherche réalisée conjointement au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques (CSRS) en Côte d'Ivoire et au laboratoire de biotechnologie des aliments de l'ETH de Zurich en Suisse. Ces travaux n'auraient pas pu être menés à terme sans le financement de quelques institutions, la contribution scientifique et le soutien moral de plusieurs personnes que je voudrais remercier.

J'adresse mes sincères remerciements au professeur **TANO Yao Serge**, Président de l'Université Nangui Abrogoua pour avoir accepté mon inscription en thèse unique dans ladite université.

Je remercie professeur **BOHOUA Louis Guichard**, doyen de l'Unité de Formation et de Recherches des Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA). C'est un honneur pour moi que vous ayez accepté de présider ce jury malgré vos multiples occupations. Votre rigueur scientifique incite à l'admiration. Veuillez recevoir l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je remercie professeur **COULYBALY Adama**, Président de l'Université Péléforo Gon Coulibaly, pour avoir accepté d'instruire ce document en vue de l'améliorer, malgré ses nombreuses occupations. Vos recommandations m'ont aidé à améliorer ce mémoire de thèse.

Je remercie professeur **KOFFI-NEVRY Rose** et docteur **TETCHI Fabrice Achille** pour avoir accepté d'instruire ce document en vue de l'améliorer, malgré leurs nombreuses occupations. C'est également un honneur pour moi que vous ayez accepté de prendre part à ce jury. Vos remarques m'ont aidé à améliorer ce mémoire de thèse.

J'adresse mes sincères remerciements aux docteurs **KAROU Tago Germain** et **LOUKOU Yao Guillaume** pour la promptitude avec laquelle vous avez accepté de participer à ce jury en tant qu'examinateur.

J'exprime toute ma reconnaissance au professeur **DJÈ Koffi Marcellin**, Professeur titulaire, Directeur du Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Alimentaire (LBMA) de l'Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments (UFR-STA) de l'Université Nangui Abrogoua, et Co-directeur de cette thèse. Vous m'avez donné l'opportunité d'intégrer votre équipe et m'avez suivi et encouragé toutes ces années. Je vous remercie pour votre infinie patience et pour la confiance que vous avez eue en moi en m'accordant la conduite de ce travail.

J'adresse mes remerciements au docteur **BONFOH Bassirou**, Maître de recherches, Directeur Général du Centre Suisse de Recherches Scientifiques (CSRS) en Côte d'Ivoire, et Co-directeur de cette thèse qui m'a offert l'opportunité de faire ce travail. Je vous attribue la paternité de ce travail depuis sa conception, son financement et sa réalisation. Vous n'avez ménagé aucun effort en m'acceptant comme stagiaire au CSRS dans le projet « *Safe Food, Fair Food* » et en m'aidant à trouver le financement et un stage à l'École Polytechnique Fédérale (ETH) de Zürich en Suisse pour la réalisation de la partie moléculaire de ces travaux. Les discussions que nous avons eues et les conseils que vous m'avez prodigués se sont toujours révélés fructueux et formateurs, sans oublier votre contribution scientifique apportée à cette thèse ainsi que toute la confiance et le soutien que vous m'avez accordés durant toutes ces années. Pour tout cela, je tiens à vous témoigner mon infinie gratitude et vous dire merci pour vos encouragements pendant les moments difficiles que j'ai vécus.

Je remercie infiniment docteur **DADIÉ Adjéhi**, Maître de conférences, qui a suivi mon parcours depuis la maîtrise et pour toute la confiance qu'il a placée en moi en me proposant comme stagiaire au CSRS en vue d'aider le projet « *Safe Food, Fair Food* » à réaliser ses activités. Ce stage m'a permis de trouver les financements pour la réalisation de mon projet de thèse. Docteur, malgré votre grade d'alors qui ne vous a pas autorisé à commencer à encadrer officiellement ma thèse de doctorat unique et vos nombreuses occupations, vous n'avez ménagé aucun effort pour suivre ce travail en nous prodiguant les conseils et les encouragements nécessaires pour mener à bien cette thèse. Docteur **DADIÉ**, infiniment merci.

Je remercie **Prof. Dr. Leo MEILE**, Directeur Adjoint du laboratoire de biotechnologie des aliments à l'Institut des Sciences des Aliments et de Nutrition de l'ETH de Zurich en Suisse, pour avoir parrainé mon stage dans ledit institut. Merci pour votre encadrement scientifique pendant mon stage, la confiance que vous avez mise en moi, de la mise à ma disposition des ressources nécessaires à la réalisation de la phase moléculaire de mes travaux dans votre laboratoire. Merci également au **Prof. Dr. Ing. Christophe LACROIX**, qui a accepté ma demande de stage au laboratoire de biotechnologie des aliments à l'ETH ; ainsi qu'à toute l'équipe de son laboratoire, avec une pensée pour les **docteurs Christoph JANS** et **Martina HAUG**, la **secrétaire Anne-Marie MARTINS** et les **techniciens Vassiliki VENAKIS** et **Alfonso DIE**.

Je remercie **Dr. Delia GRACE**, Investigateur principal du projet « *Safe Food, Fair Food* », qui, depuis ILRI Kenya, a permis les actions de renforcement des capacités nécessaires à la réalisation de cette thèse. Je n'oublie pas les autres partenaires du projet, notamment, **Dr. Kohei MAKITA**, Coordinateur du projet « *Safe Food, Fair Food* ». Son aide a été précieuse pour la compréhension de l'Analyse Participative des Risques et l'analyse statistique des données. Son amitié, sa simplicité, sa réactivité et son efficacité ont été constantes dans le suivi de mon travail du début à la fin de ce projet. Je n'oublie pas **Dr. Solenne COSTARD**, Chercheur-associé au Department of Veterinary Clinical Sciences, The Royal Veterinary College (University of London, UK) qui, ses compétences pédagogiques nous ont permis de mieux cerner le logiciel ModelRisk ainsi que les éléments statistiques de l'évaluation stochastique des risques. Merci pour votre participation et votre disponibilité à la rédaction de nos publications scientifiques.

Je remercie vivement **Dr. SANGARE Yaya**, Secrétaire exécutif du PASRES pour ses précieux conseils, ses encouragements, sa compréhension et toute l'attention accordée à ce travail et à ma personne.

J'adresse un remerciement particulier à **Dr. Giovanna RASO** (Ex-Directrice du Département Environnement et Santé du CSRS), **Dr. KONAN Amino Georgette** responsable du groupe de recherche Technologie, Nutrition et Qualité des Aliments (TNQA) (ex-groupe de recherche Nutrition, Qualité et Analyse des risques), **Dr. NINDJIN Charlemagne**, le responsable du laboratoire de microbiologie du CSRS.

Je remercie également messieurs, **YAO Konan** pour son aide à l'analyse statistique des données et **KONE Bognan Valentin** pour son appui à la réalisation des discussions en groupes focaux (focus group). Je n'oublie pas l'équipe choc du Laboratoire du CSRS notamment **Dr. TRAORÉ Sylvain Gnamien**, **Dr. KOUAMÉ-SINA Sylvie Mireille**, mademoiselle **KRABI Ékoua Régina**, Madame **ZAHUI-IRIÉ Liliane Dominique**, messieurs **TOURÉ Sadikou** et **TRAORÉ Mamadou**, ainsi qu'à l'ensemble des chercheurs du CSRS et à tous ceux qui travaillent au Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Alimentaire (LBMA) de l'Université Nangui Abrogoua.

Mes plus chaleureux remerciements s'adressent à mes amis, collègues et compagnons de recherche avec lesquels j'ai passé ces cinq dernières années de fraternité et de convivialité et dont l'aide a été précieuse aussi bien par leurs critiques constructives que par les encouragements et les corrections apportées à cette thèse. Il s'agit des **docteurs KOUADIO Ahou Nadège**, **KOUASSI Kra Athanase**, **KOUAMÉ N'zébo Désiré**,

**ATOBLA Koua, KOFFI Ahua René et ATTIEN Yao Paul** ; de monsieur **BLÉ Yatanan Casimir** et de mademoiselle **TOÉ Evelyne**.

Mes remerciements vont aussi à l'endroit de messieurs, **YOBOUÉ Kouadio Bernard** qui m'a hébergé pendant les deux premières années de la thèse, **YOBOUÉ Koffi** mon compagnon de tous les jours, **N'GUESSAN Honoré** et **MESSOU Kacou Roger** pour leur soutien indéfectible et leur encouragement tout au long de cette expérience.

Je remercie mes deux grandes sœurs, à savoir mesdemoiselles **KOUAKOU Amenan Paulette** et **KOUAKOU Aya Pauline** pour leurs prières, conseils et soutiens pendant toutes ces années de labeur.

Je remercie monsieur **N'DRI Kouassi Norbert**, Ex-Président de l'Union Fraternelle des Originaires de Soungassou (UFOS) section d'Abobo et madame **KOUADIO Aya Delphine**, marraine pour le baptême de ma fiancée, pour leurs conseils, leurs encouragements et leurs soutiens à ma famille pendant les moments difficiles.

Cette thèse n'aurait pu exister sans l'appui financier des organismes suivants :

1. Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS) ;
2. Deutsche Gesellschaft für Internationale Zusammenarbeit (GIZ) GmbH dans le cadre du projet « *Safe Food, Fair Food* » à travers l'International Livestock Research Institute (ILRI) et le CSRS ;
3. Le Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (PASRES) (Projet CSRS/PASRES N°27) ;
4. La Commission Fédérale de Bourses pour Étudiant Étranger de la Confédération Suisse (CFBE) (réf. 2010.0197/Côte d'Ivoire/OP).

À toutes les personnes qui m'ont accordé l'amour, l'attention et les conseils avisés, nécessaires à mon épanouissement intellectuel pendant ces cinq longues années de thèse que je n'ai pas pu citer.

Que Dieu vous accorde toute sa Grâce !



# **TABLE DES MATIÈRES**

DÉDICACE.....	.....
<i>IN MEMORIAM</i> .....	.....
REMERCIEMENTS.....	.....
TABLE DES MATIÈRES .....	i
LISTE DES ABREVIATIONS ET SIGLES.....	x
LISTE DES TABLEAUX .....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xviii
RÉSUMÉ.....	xxi
ABSTRACT .....	xxiii
INTRODUCTION .....	1
I- REVUE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
1. GÉNÉRALITÉS SUR LE LAIT .....	8
1.1. Définition du lait .....	8
1.2. Composition générale du lait de vache .....	9
1.2.1. Aspect et composition physico-chimique du lait de vache .....	9
1.2.2. Composition microbiologique du lait.....	11
1.2.2.1. Flore indigène ou originelle du lait.....	11
1.2.2.2. Flore contaminante du lait.....	11
1.2.2.3. Bactéries thermoduriques dans le lait pasteurisé.....	12
1.2.2.4. Bactéries psychrotrophes du lait.....	13
1.3. Contamination bactérienne du lait .....	13
1.3.1. Contamination intra-mammaire .....	14
1.3.2. Contamination extra-mammaire .....	14
1.4. Place du lait dans l'alimentation humaine.....	16
1.5. Risques de maladie infectieuse inhérents à la consommation du lait .....	16
2. GÉNÉRALITÉS SUR L' <i>ATTIÉKÉ</i> .....	18
2.1. Manioc et nutrition.....	18
2.2. Préparation et principaux types d' <i>attiéké</i> en Côte d'Ivoire.....	19
2.2.1. Définition de l' <i>attiéké</i> fraîchement préparé.....	19
2.2.2. Production et commercialisation de l' <i>attiéké</i> .....	19
2.2.3. Principaux types d' <i>attiéké</i> .....	23
2.2.3.1. Attiéké Adjoukrou .....	23
2.2.3.2. Attiéké Ebrié.....	23
2.2.3.3. Attiéké Alladjan.....	23
2.2.3.4. Attiéké Garba .....	23

---

2.2.4. Consommation de l' <i>attiéké</i> .....	24
2.2.5. Caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles de l' <i>attiéké</i> .....	25
2.2.6. Caractéristiques microbiologiques de l' <i>attiéké</i> et risque de toxi-infection pour le consommateur.....	25
3. GÉNÉRALITÉS SUR LE GROUPE <i>BACILLUS CEREUS</i> .....	26
3.1. Genre <i>Bacillus</i> .....	26
3.2. Groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	27
3.2.1. <i>Bacillus anthracis</i> .....	28
3.2.2. <i>Bacillus cereus sensu stricto</i> .....	31
3.2.3. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	31
3.2.4. <i>Bacillus mycoides</i> et <i>Bacillus pseudomycoides</i> .....	31
3.2.5. <i>Bacillus weihenstephanensis</i> .....	32
3.3. Écologie du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	33
3.3.1. Réservoirs primaires.....	33
3.3.2. Présence du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments.....	33
3.4. Pathologies liées au groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	34
3.4.1. Atteintes non gastro-intestinales .....	34
3.4.2. Toxi-infections alimentaires au groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	34
3.4.2.1. Syndrome émétique .....	35
3.4.2.2. Syndrome diarrhéique.....	36
3.5. Importance du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les toxi-infections alimentaires.....	37
3.6. Pouvoir pathogène de <i>Bacillus cereus</i> .....	37
3.6.1. Toxine émétique.....	38
3.6.2. Entérotoxines .....	38
3.6.2.1. Hémolysine BL.....	38
3.6.2.2. Entérotoxine non-hémolytique .....	39
3.6.2.3. Cytotoxine K .....	40
3.6.2.4. Entérotoxine T et entérotoxine FM.....	40
3.6.3. Autres facteurs de virulence .....	40
3.7. Résistance aux antibiotiques.....	41
3.8. Surveillance des bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les aliments .....	41
3.9. Techniques d'isolement et d'identification du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	42
4. GÉNÉRALITÉS SUR L'ANALYSE DES RISQUES.....	43
4.1. Historique, base légale de l'analyse des risques et définitions.....	43
4.2. Principaux concepts de l'analyse des risques .....	45

---

---

4.2.1. Analyse des risques selon le <i>Codex Alimentarius</i> .....	46
4.2.1.1. Évaluation des risques.....	47
4.2.1.2. Gestion des risques .....	51
4.2.1.3. Communication sur les risques.....	51
4.2.2. Analyse participative des risques .....	52
II- MATÉRIEL ET MÉTHODES .....	55
1. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA CHAÎNE DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DU LAIT CRU LOCAL .....	56
1.1. Matériel .....	56
1.1.1. Population d'étude .....	56
1.1.2. Fiches d'enquête .....	56
1.2. Méthodes .....	56
1.2.1. Sites d'étude.....	56
1.2.2. Sélection des éleveurs et des vendeurs de lait cru local .....	58
1.2.3. Détermination des caractéristiques de la chaîne de production à la vente du lait cru .....	58
1.2.4. Perceptions des acteurs de la qualité du lait .....	59
2. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA CHAÎNE DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DE L' <i>ATTIÉKÉ</i> .....	59
2.1. Matériel .....	59
2.1.1. Population d'enquête.....	59
2.1.2. Matériel d'enquête .....	59
2.2. Méthodes .....	60
2.2.1. Sites d'étude et nombre de productrices sélectionnées .....	60
2.2.2. Détermination des caractéristiques de la chaîne de production à la commercialisation de l' <i>attiéké</i> .....	60
3. ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DU LAIT ET DE L' <i>ATTIÉKÉ</i> PAR LE GROUPE <i>B. CEREUS</i> .....	62
3.1. Matériel biologique .....	62
3.2. Souches de référence.....	62
3.3. Échantillonnage de lait .....	63
3.3.1. Taille des échantillons de lait .....	63
3.3.2. Prélèvement des échantillons de lait .....	65

---

---

3.3.3. Détermination de paramètres physico-chimiques du lait .....	65
3.3.3.1. Détermination de la température du lait.....	65
3.3.3.2. Détermination du pH du lait .....	66
3.3.3.3. Détermination de la densité du lait à 20°C .....	66
3.3.3.4. Mise en évidence des résidus d’antibiotiques dans le lait.....	66
3.3.3.5. Qualité globale du lait.....	67
3.4. Échantillonnage d’ <i>attiéké</i> .....	67
3.4.1. Sites d’étude.....	67
3.4.2. Taille des échantillons d’ <i>attiéké</i> .....	69
3.4.3. Prélèvement des échantillons d’ <i>attiéké</i> .....	70
3.4.4. Détermination de paramètres physico-chimiques de l’ <i>attiéké</i> .....	71
3.4.4.1. Détermination du temps et de la température de cuisson de l’ <i>attiéké</i> .....	71
3.4.4.2. Détermination du pH de l’ <i>attiéké</i> .....	71
3.4.4.3. Détermination du taux d’humidité de l’ <i>attiéké</i> .....	71
3.5. Isolement et identification du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	72
3.5.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales .....	72
3.5.2. Isolement et dénombrement des bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	72
3.5.2.1. Identification des isolats présumptifs du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	73
3.5.2.2. Formulation de l’interprétation des résultats microbiologiques .....	74
3.5.3. Identification par réaction de polymérisation en chaîne .....	75
3.5.3.1. Extraction de l’ADN génomique .....	77
3.5.3.2. Préparation du mélange réactionnel (mix) .....	77
3.5.3.3. Amplification du gène 16S rADN .....	78
3.5.3.4. Détection du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	78
3.5.3.5. Détection des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	78
3.5.3.6. Analyse électrophorétique des produits d’amplification .....	79
3.6. Recherche des gènes de virulence du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	79
3.7. Détermination de la résistance aux antibiotiques .....	83
4. ANALYSE DES RISQUES.....	85
4.1. Évaluation des risques de toxi-intoxication liés au groupe <i>B. cereus</i> .....	85
4.1.1. Identification du groupe <i>Bacillus cereus</i> comme danger microbien.....	86
4.1.2. Appréciation des risques de toxi-infection liés à la consommation de lait .....	87
4.1.2.1. Population et fiche d’enquête .....	87
4.1.2.2. Sélection et taille des consommateurs de lait .....	87
4.1.2.3. Réalisation de l’enquête consommation .....	87

---

4.1.3. Appréciation des risques de toxi-infection liés à la consommation d' <i>attiéké</i> ....	88
4.1.3.1. Population enquêtée.....	88
4.1.3.2. Matériel d'enquête.....	88
4.1.3.3. Calcul de la taille de consommateurs d' <i>attiéké</i> enquêtés à Abidjan.....	88
4.1.3.4. Réalisation de l'enquête consommateur.....	88
4.1.4. Évaluation de l'exposition et estimation du risque de toxi-infection alimentaire suite à la consommation de lait ou d' <i>attiéké</i> .....	89
4.2. Gestion du risque de toxi-infection suite à la consommation de lait ou d' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	91
4.2.1. Réduction du risque de toxi-infection lié à la consommation du lait contaminé par le groupe <i>B. cereus</i> .....	91
4.2.1.1. Détermination de la durée limite de vente du lait à la température ambiante.....	91
4.2.1.2. Réduction du risque par le chauffage du lait.....	91
4.2.2. Réduction du risque de toxi-infection suite à la consommation d' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>B. cereus</i> par réchauffage hydrothermique.....	92
4.2.2.1. Détermination de la température de réchauffage de l' <i>attiéké</i> .....	92
4.2.2.2. Étude de la survie des spores du groupe <i>Bacillus cereus</i> au réchauffage de l' <i>attiéké</i> .....	92
5. ANALYSE STATISTIQUE.....	94
III- RESULTATS ET DISCUSSION.....	95
1. CARACTÉRISTIQUES DU SYSTÈME DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DU LAIT CRU LOCAL.....	96
1.1. Résultats.....	96
1.1.1. Caractéristiques des fermes, des exploitants et des vendeurs.....	96
1.1.2. Facteurs de risque de contamination du lait local à la ferme.....	96
1.1.2.1. État sanitaire des animaux et utilisation des médicaments vétérinaires.....	96
1.1.2.2. État sanitaire des fermes.....	97
1.1.2.3. Conditions de production, distribution et commercialisation du lait.....	104
1.2. Discussion.....	109
2. QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DU LAIT.....	113
2.1. Résultats.....	113
2.1.1. Qualité physico-chimique du lait cru local.....	113

2.1.1.1. Qualité physico-chimique du lait en fonction de la température, du pH et de la densité .....	113
2.1.1.2. Présence d'inhibiteurs de croissance dans le lait selon le site de prélèvement .....	118
2.1.2. Caractéristiques microbiologiques du lait .....	119
2.1.2.1. Qualité microbiologique globale du lait de la traite à la vente.....	119
2.1.2.2. Points critiques et sources de contamination du lait cru par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	120
2.1.2.3. Contamination du lait par le groupe <i>Bacillus cereus</i> et qualité du lait .....	120
2.2. Discussion.....	122
3. CARACTÉRISTIQUES DU SYSTÈME DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DE L'ATTIÉKÉ .....	126
3.1. Résultats .....	126
3.1.1. Circuits de production, de distribution et de vente de l' <i>attiéké</i> à Abidjan .....	126
3.1.2. Pratiques et facteurs de risques de contamination de l' <i>attiéké</i> par <i>Bacillus cereus</i> .....	128
3.1.2.1. État sanitaire des sites de production de l' <i>attiéké</i> .....	128
3.1.2.2. Conditions de production et de vente d' <i>attiéké</i> .....	128
3.2. Discussion.....	130
4. QUALITÉ PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE L'ATTIÉKÉ .....	132
4.1. Résultats .....	132
4.1.1. Caractéristiques physico-chimiques de l' <i>attiéké</i> .....	132
4.1.2. Caractéristiques microbiologiques de l' <i>attiéké</i> .....	136
4.1.2.1. Présence du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les intrants et dans les produits intermédiaires de l' <i>attiéké</i> , l'environnement et l'eau d'utilisation .....	136
4.1.2.2. Présence du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans l' <i>attiéké</i> .....	137
4.1.2.3. Charge moyenne en <i>Bacillus cereus</i> dans les intrants pour la production de l' <i>attiéké</i> , dans l'eau d'usage et de l'environnement .....	139
4.1.2.4. Charge moyenne en groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les produits intermédiaires du processus de production de l' <i>attiéké</i> .....	139
4.1.2.5. Charge moyenne en groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés de l' <i>attiéké</i> .....	139
4.1.2.6. Qualité microbiologique de l' <i>attiéké</i> .....	140
4.2. Discussion.....	143

---

5. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE, PROFILS TOXIGÉNIQUES ET ANTIBIOTYPIQUES DU GROUPE <i>BACILLUS CEREUS</i> ISOLÉ DU LAIT ET DE L'ATTIÉKÉ .....	148
5.1. Résultats .....	148
5.1.1. Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> identifiées par PCR .....	148
5.1.2. Virulence du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolé du lait et de l'attiéké.....	150
5.1.3. Profils toxigéniques du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolées du lait et de l'attiéké..	153
5.1.3.1. Profil cytotoxique .....	153
5.1.3.2. Profil entéro-cytotoxique .....	153
5.1.3.3. Profil entéro-émétique .....	153
5.1.3.4. Profils entéro-hémolytiques .....	153
5.1.3.5. Profils entéro-non hémolytiques.....	154
5.1.3.6. Profils entéro-hémolytiques et entéro-non hémolytiques associés ou non aux gènes <i>bceT</i> et <i>cytK-2</i> .....	154
5.1.4. Diversités toxigéniques du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	156
5.1.5. Résistances aux antibiotiques du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolées du lait et de l'attiéké.....	161
5.1.6. Profils antibiotypiques du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolées du lait et de l'attiéké .....	164
5.1.6.1. Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus du lait .....	164
5.1.6.2. Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus de l'attiéké.....	164
5.1.6.3. Profils antibiotypiques communs aux isolats obtenus du lait et de l'attiéké .....	165
5.1.6.4. Diversités génétiques du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolées du lait et de l'attiéké .....	165
5.2. Discussion.....	178
6. ÉVALUATION DES RISQUES DE TOXI-INFECTIONS LIÉS À LA CONSOMMATION DU LAIT ET DE L'ATTIÉKÉ.....	185
6.1. Résultats .....	185
6.1.1. Évaluation des risques liés à la consommation du lait .....	185
6.1.1.1. Identification du danger dans le lait.....	185
6.1.1.2. Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation du lait cru contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	185
6.1.1.3. Caractéristiques des consommateurs du lait .....	187
6.1.1.4. Évaluation de l'exposition, du mode et de la fréquence de consommation du lait.....	187

---

---

6.1.1.5. Facteurs de risque et toxi-infections liés à la consommation du lait .....	188
6.1.2. Évaluation des risques liés à la consommation de l' <i>attiéké</i> .....	193
6.1.2.1. Identification du danger dans l' <i>attiéké</i> .....	193
6.1.2.2. Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation d' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	193
6.1.2.3. Caractéristiques des consommateurs d' <i>attiéké</i> .....	195
6.1.2.4. Évaluation de l'exposition, mode et fréquence de consommation de l' <i>attiéké</i> .....	196
6.1.2.5. Facteurs de risque et toxi-infections liées à la consommation d' <i>attiéké</i> ....	200
6.2. Discussion.....	203
7. GESTION DES RISQUES DE CONSOMMATION DE LAIT OU D' <i>ATTIÉKÉ</i> CONTAMINÉ PAR LE GROUPE <i>B. CEREUS</i> .....	208
7.1. Résultats .....	208
7.1.1. Réduction du risque de consommation de lait contaminé par le groupe <i>Bacillus</i> <i>cereus</i> .....	208
7.1.2. Réduction du risque de consommation d' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	208
7.1.2.1. Température de réchauffage de l' <i>attiéké</i> .....	208
7.1.2.2. Thermorésistance du groupe <i>B. cereus</i> au cours du réchauffage de l' <i>attiéké</i> à 90 °C.....	210
7.1.2.3. Régénération du groupe <i>B. cereus</i> après réchauffage de l' <i>attiéké</i> à 90 °C	211
7.2. Discussion.....	212
8. COMMUNICATION DES RISQUES DE CONSOMMATION DE LAIT OU D' <i>ATTIÉKÉ</i> CONTAMINÉ PAR LE GROUPE <i>B. CEREUS</i> .....	217
CONCLUSION .....	218
RECOMMANDATIONS.....	218
PERSPECTIVES .....	218
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	218
PUBLICATIONS, CHAPITRES DE LIVRE ET COMMUNICATIONS .....	
PUBLICATION 1.....	
PUBLICATION 2.....	
ANNEXES .....	



**LISTE DES ABREVIATIONS  
ET SIGLES**

<b>ACP</b>	: Analyse des Composantes Principales
<b>ADN</b>	: Acide Désoxyribonucléique
<b>AFSCA</b>	: Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire
<b>AFSSA</b>	: Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments
<b>AFLP</b>	: Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés
<b>AFNOR</b>	: Association Française de Normalisation
<b>APR</b>	: Analyse Participative des Risques
<b>ATCC</b>	: American Type Culture Collection (Collection des types de cultures américaines)
<b>AW</b>	: Activité de l'eau
<b>BAD</b>	: Banque Africaine de Développement
<b>BceT</b>	: <i>Bacillus cereus</i> entérotoxine T
<b>BPF</b>	: Bonnes Pratiques de Fabrication
<b>BPH</b>	: Bonnes Pratiques d'Hygiène
<b>CAH</b>	: Classification Ascendante Hiérarchique
<b>CA-SFM</b>	: Comité de l'Antibiogramme de la Société française de Microbiologie
<b>CE</b>	: Commission Européenne
<i>ces</i>	: Gène codant pour le céréulide
<b>CSRS</b>	: Centre Suisse de Recherches Scientifiques
<b>CytK</b>	: Cytotoxine K
<b>CytK-1</b>	: Cytotoxine K-1
<b>CytK-2</b>	: Cytotoxine K-2
<b>D<sub>i</sub></b>	: Dose infectieuse
<b>dNTP</b>	: Désoxyribonucléotide triphosphate
<b>DSM</b>	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Collection allemande de microorganismes)
<b>DSMZ</b>	: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Collection allemande de microorganismes et de cultures cellulaires)
<b>EDTA</b>	: Éthylène Diamine Tétra Acétique
<b>EFSA</b>	: European Food Safety Authority (Autorité européenne de la sécurité des aliments)
<b>ELISA</b>	: Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
<b>ETH</b>	: Eidgenössische Technische Hochschule (École Fédérale Polytechnique)

---

<b>FAO</b>	: Food and Agriculture Organisation of United Nation (Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture)
<b>FE</b>	: Fraction étiologique chez les exposées
<b>FER</b>	: Fraction étiologique du risque
<b>FSAI</b>	: Autorité de la sécurité alimentaire en Irlande
<b>HACCP</b>	: Hazard Analysis Critical Control Point (Analyse des dangers et contrôle des points critiques)
<b>HBL</b>	: Hemolysin Binding Lytic (Hémolysine des liaisons lytiques)
<b>HCl</b>	: Chlorure d'Hydrogène
<b>HPA</b>	: Health Protection Agency (Agence de protection de la santé)
<b>IAC</b>	: Improved African Cassava (Manioc africain amélioré)
<b>IC</b>	: Intervalle de Confiance
<b>IDF</b>	: International Dairy Federation (Fédération internationale des laiteries)
<b>INS</b>	: Institut National de la Statistique
<b>ILRI</b>	: International Livestock Research Institute (Institut international de recherche sur le bétail)
<b>ISO</b>	: International Organization for Standardization (Organisation internationale de normalisation)
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	: Chlorure de magnésium
<b>MIPARH-DPP</b>	: Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques – Département de la Planification et des Programmes
<b>MIRAH-DPP</b>	: Ministère des Ressources Animales et Halieutiques – Département de la Planification et des Programmes
<b>MLEE</b>	: MultiLocus Enzyme Electrophoresis (Électrophorèse enzymatique multi locus)
<b>MLST</b>	: MultiLocus Sequence Typing (Typage de séquence multi locus)
<b>MMWR</b>	: Morbidity and Mortality Weekly Report (Report hebdomadaire de la morbidité et de la mortalité)
<b>MYP</b>	: Mannitol-Egg Yolk Polymyxine-Agar (Gélose au jaune d'œufs et à la polymyxine)
<b>NHE</b>	: Non-Haemolytic Enterotoxin (Entérotoxine non-hémolytique)
<b>NRC</b>	: National Research Council (Conseil national de la recherche)
<b>OIE</b>	: Office International des Épizooties

<b>OMC</b>	: Organisation Mondiale du Commerce
<b>OMS</b>	: Organisation Mondiale de la Santé
<b>PASRES</b>	: Programme d'Appui Stratégique à la Recherche de l'Enseignement Supérieur
<b>Pb</b>	: Paire de base
<b>PCA</b>	: Plate Count Agar (Gélose pour le dénombrement)
<b>PCR</b>	: Polymerase Chain Reaction (Réaction de Polymérisation en Chaîne)
<b>REFPED</b>	: Refrigerated Processed Foods of Extended Durability (Aliments transformés réfrigérés pour la prolongation de la durée de vie)
<b>Rep-PCR</b>	: Repetive Extragenic Palindromic-Polymerase Chain Reaction (Palindrome extragénique répétitive-Réaction de polymérisation en chaîne)
<b>RPLA</b>	: Reversed passive latex agglutination (Agglutination passive inversée au latex)
<b>sp</b>	: Specie (Espèce)
<b>spp</b>	: Pluriel de Specie
<b>SPS</b>	: Sanitaires et Phytosanitaires
<b>SPSS</b>	: Statistical Package for the Social Sciences (Paquet statistique pour les sciences sociales)
<b>TAE</b>	: Tris Acétate EDTA
<b>TIA</b>	: Toxi-Infection Alimentaire
<b>TIAC</b>	: Toxi-Infection Alimentaire Collective
<b>Tris</b>	: 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol
<b>UFC</b>	: Unité Formant Colonie



**LISTE DES TABLEAUX**

---

<b>Tableau 1</b> : Composition générale du lait de vache .....	10
<b>Tableau 2</b> : Propriétés physico-chimiques du lait de vache .....	10
<b>Tableau 3</b> : Contaminants et sources de contamination bactérienne du lait .....	15
<b>Tableau 4</b> : Nouvelle classification du groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	30
<b>Tableau 5</b> : Répartition des échantillons provenant de la chaîne de production du lait par site de production et par marché .....	64
<b>Tableau 6</b> : Répartition des échantillons d' <i>attiéké</i> par site de production et par marché ...	69
<b>Tableau 7</b> : Répartition des isolats présomptifs du groupe <i>Bacillus cereus</i> étudiés.....	76
<b>Tableau 8</b> : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'identification des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> et leur programme d'amplification.....	80
<b>Tableau 9</b> : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour la détection des gènes de virulence des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> et leur programme d'amplification .....	81
<b>Tableau 10</b> : Molécules d'antibiotiques, diamètres critiques et lecture interprétative pour l'antibiogramme du groupe <i>Bacillus cereus</i> . .....	84
<b>Tableau 11</b> : Répartition des consommateurs d' <i>attiéké</i> enquêtés .....	89
<b>Tableau 12</b> : Répartition de la production moyenne journalière de lait dans les fermes ....	98
<b>Tableau 13</b> : Caractéristiques socio-démographiques des éleveurs et des vendeurs de lait	99
<b>Tableau 14</b> : État sanitaire des animaux au cours des deux derniers mois précédant l'enquête .....	100
<b>Tableau 15</b> : Mode d'usage des antibiotiques dans les fermes .....	101
<b>Tableau 16</b> : Fréquence de nettoyage des abreuvoirs .....	102
<b>Tableau 17</b> : Pratiques et facteurs influençant la qualité microbiologique du lait à la ferme .....	103
<b>Tableau 18</b> : Répartition de la quantité de lait collecté et vendu par jour .....	107
<b>Tableau 19</b> : Matériel utilisé pour la traite et le conditionnement du lait .....	108
<b>Tableau 20</b> : Qualité du lait à la ferme et au point de vente en fonction du pH.....	113
<b>Tableau 21</b> : Qualité du lait de vente en fonction de la densité.....	114
<b>Tableau 22</b> : Caractéristiques des trois classes de lait de vente identifiées .....	117
<b>Tableau 23</b> : Présence d'inhibiteur de croissance dans le lait selon le site de prélèvement .....	118
<b>Tableau 24</b> : Charges moyennes en groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les échantillons et sources de contamination du lait .....	121
<b>Tableau 25</b> : Qualité microbiologique des différents types de lait .....	121

---

---

<b>Tableau 26</b> : État sanitaire des sites de production de l' <i>attiéké</i> et des ustensiles utilisés .	129
<b>Tableau 27</b> : Température de l' <i>attiéké</i> .....	133
<b>Tableau 28</b> : Durée de cuisson au cours de la préparation de l' <i>attiéké</i> selon le site de production.....	133
<b>Tableau 29</b> : Teneur en eau de la pâte de manioc fermentée séchée et de l' <i>attiéké</i> .....	135
<b>Tableau 30</b> : pH de la pâte de manioc fermentée pressée séchée, de l' <i>attiéké</i> fraîchement préparé et de l' <i>attiéké</i> en vente sur les marchés informels .....	135
<b>Tableau 31</b> : Présence du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les intrants, les produits intermédiaires, l'environnement et l'eau d'utilisation .....	136
<b>Tableau 32</b> : Proportion d' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	138
<b>Tableau 33</b> : Répartition de <i>Bacillus cereus</i> obtenu de l' <i>attiéké</i> fraîchement préparé en fonction du site de production et de la durée de cuisson.....	138
<b>Tableau 34</b> : Charge moyenne en groupe <i>Bacillus cereus</i> dans les intrants, les produits intermédiaires, l'environnement et l'eau d'utilisation .....	141
<b>Tableau 35</b> : Charge moyenne en groupe <i>Bacillus cereus</i> dans l' <i>attiéké</i> .....	141
<b>Tableau 36</b> : Qualité microbiologique de l' <i>attiéké</i> fraîchement préparé .....	142
<b>Tableau 37</b> : Qualité microbiologique de l' <i>attiéké</i> au cours de la vente.....	142
<b>Tableau 38</b> : Répartition des isolats identifiés selon la filière.....	148
<b>Tableau 39</b> : Distribution des gènes d'entérotoxines du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés ...	152
<b>Tableau 40</b> : Profils toxigéniques spécifiques aux isolats obtenus du lait .....	157
<b>Tableau 41</b> : Profils toxigéniques spécifiques aux isolats obtenus de l' <i>attiéké</i> .....	159
<b>Tableau 42</b> : Profils toxigéniques des isolats communs au lait et à l' <i>attiéké</i> .....	160
<b>Tableau 43</b> : Résistance aux antibiotiques du groupe <i>B. cereus</i> isolées dans le lait et dans l' <i>attiéké</i> vendu sur les marchés informels à Abidjan .....	162
<b>Tableau 44</b> : Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus du lait .....	167
<b>Tableau 45</b> : Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus de l' <i>attiéké</i> .....	168
<b>Tableau 46</b> : Profils antibiotypiques communs aux isolats obtenus du lait et de l' <i>attiéké</i> .....	169
<b>Tableau 47</b> : Diversités génétiques spécifiques aux isolats obtenus du lait.....	170
<b>Tableau 48</b> : Diversités génétiques spécifiques aux isolats obtenus de l' <i>attiéké</i> .....	174
<b>Tableau 49</b> : Diversités génétiques commune aux isolats obtenus du lait et de l' <i>attiéké</i> .	177
<b>Tableau 50</b> : Caractéristiques socio-démographiques des consommateurs de lait.....	189
<b>Tableau 51</b> : Mode et fréquence de consommation du lait cru .....	190
<b>Tableau 52</b> : Risque lié à la consommation du lait issu des marchés informels .....	191
<b>Tableau 53</b> : Effet du traitement thermique du lait sur la survenue de la maladie .....	192

---

**Tableau 54** : Caractéristiques socio-démographiques des consommateurs d'*attiéké*..... 195

**Tableau 55** : Mode de consommation d'*attiéké* ..... 198

**Tableau 56** : Fréquence de consommation d'*attiéké* à Abidjan ..... 199

**Tableau 57** : Impact de la consommation d'*attiéké* sur la santé du consommateur ..... 201

**Tableau 58** : Effet du traitement thermique de l'*attiéké* sur la survenue de l'affection ... 202

**Tableau 59** : Variétés d'*attiéké* consommées par tous les malades ..... 202



# **LISTE DES FIGURES**

---

<b>Figure 1</b> : Diagramme de fabrication de l' <i>attiéké</i> .....	22
<b>Figure 2</b> : Systématique de l'analyse des risques selon le <i>Codex Alimentarius</i> .....	47
<b>Figure 3</b> : Concept d'analyse participative des risques dans la chaîne de valeur informelle des produits d'origine animale .....	54
<b>Figure 4</b> : Carte d'Abidjan matérialisant les sites de production et les marchés informels de vente du lait cru de vache.....	57
<b>Figure 5</b> : Carte d'Abidjan matérialisant les sites de production d' <i>attiéké</i> .....	61
<b>Figure 6</b> : Carte d'Abidjan avec matérialisation des marchés de gros et demi-gros et des marchés informels de distribution et de vente d' <i>attiéké</i> .....	68
<b>Figure 7</b> : Échantillons d' <i>attiéké</i> conditionné en sachets plastiques pour la vente au détail .....	70
<b>Figure 8</b> : Modèle d'évaluation du risque utilisé dans cette étude.....	85
<b>Figure 9</b> : Chaîne de production informelle du lait cru de la ferme au consommateur à Abidjan.....	106
<b>Figure 10</b> : Projection des variables de qualité du lait de vente sur le plan principal de l'ACP. ....	116
<b>Figure 11</b> : Projection des classes de lait de vente sur le plan principal de l'ACP.....	117
<b>Figure 12</b> : Qualité microbiologique globale du lait cru local de la traite à la vente.....	119
<b>Figure 13</b> : Diagramme de la chaîne de production à la consommation de l' <i>attiéké</i> à Abidjan.....	127
<b>Figure 14</b> : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification du gène <i>motB</i> du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés du lait et de l' <i>attiéké</i> .....	149
<b>Figure 15</b> : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 2,5 %, des produits d'amplification du gène <i>gyrB</i> des espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés du lait et de l' <i>attiéké</i> .....	149
<b>Figure 16</b> : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification par PCR multiplex des gènes de virulence <i>hblA</i> , <i>nheA</i> , <i>bceT</i> du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés du lait et de l' <i>attiéké</i> .....	151
<b>Figure 17</b> : Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification par PCR multiplex des gènes de virulence <i>hblC</i> et <i>hblD</i> du groupe <i>Bacillus cereus</i> isolés du lait et de l' <i>attiéké</i> .....	151
<b>Figure 18</b> : Répartition des pourcentages de résistance des isolats obtenus du lait et de l' <i>attiéké</i> en fonction du nombre d'antibiotiques .....	163

---

<b>Figure 19</b> : Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation du lait contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	186
<b>Figure 20</b> : Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation de l' <i>attiéké</i> contaminé par le groupe <i>Bacillus cereus</i> .....	194
<b>Figure 21</b> : Proportion de lait de vente susceptible de provoquer une toxi-infection au cours de la vente à la température ambiante .....	209
<b>Figure 22</b> : Courbe de variation de la température au cours du réchauffage d' <i>attiéké</i> selon la quantité.....	209
<b>Figure 23</b> : Courbe de survie et de mortalité à 90 °C des bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i> au cours du réchauffage de 150 g d' <i>attiéké</i> .....	210
<b>Figure 24</b> : Courbe de régénération du groupe <i>Bacillus cereus</i> dans l' <i>attiéké</i> après 15 minutes de réchauffage à 90 °C .....	211



# **RÉSUMÉ**

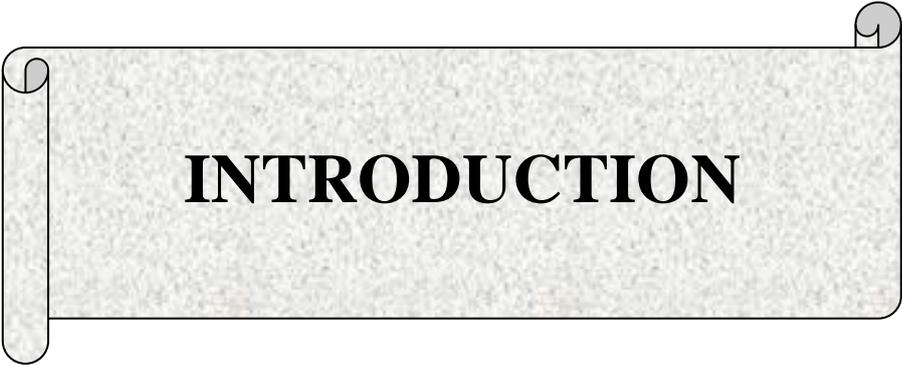
En Côte d'Ivoire, le lait et l'*attiéké* jouent un rôle important dans la nutrition humaine, mais peuvent représenter un risque de toxi-infection pour le consommateur. L'objectif de cette étude était de contribuer à la réduction du risque de toxi-infection suite à la consommation de lait cru local et d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus*. A cet effet, les systèmes de production à la commercialisation du lait et de l'*attiéké* à Abidjan ont été étudiés. Le risque de toxi-infections lié à la consommation du lait et de l'*attiéké* a été évalué à l'aide d'un questionnaire avec respectivement 188 consommateurs de lait et 360 consommateurs d'*attiéké*. D'une part, 320 échantillons issus des fermes dont 150 échantillons de lait et d'autre part, 16 échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons d'*attiéké* en vente sur le marché, ont été collectés et analysés selon la norme EN ISO 7932 : 2004. Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et d'une caractérisation toxigénique et antibiotypique. Enfin, la résistance des spores du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* a été évaluée. Les résultats ont montré que le groupe *B. cereus* a été isolé dans 41,2 % de lait de vente avec une charge moyenne de  $2,9 \pm 1,0$  log (UFC/mL) et dans 25,2 % d'*attiéké* en vente avec une charge moyenne en cellules végétatives et en spores respectivement de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) et  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g). *B. thuringiensis* (41,9 %) et *B. cereus sensu stricto* (36,0 %) ont été les espèces identifiées. Les gènes de virulence majoritaires ont été *cytK-2* (80,8 %), *hblD* (72,1 %) et *nheC* (70,9 %). Les isolats ont été très résistants à la tétracycline (94,8 %), à la ciprofloxacine (94,8 %) et au chloramphénicol (94,2 %). La probabilité de consommer du lait et de l'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* a été respectivement de 21,6 % et 16,0 %. Au total, 12,6 % et 18,9 % des consommateurs ont rapporté une toxi-infection suite à la consommation respectivement de lait cru et d'*attiéké* non réchauffé et les symptômes les plus évoqués ont été la diarrhée et les douleurs abdominales. Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* à une température supérieure ou égale à 90 °C pendant au minimum 15 min a réduit la concentration en spores de *B. cereus* dans l'*attiéké*, de 4,2 à  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g) d'*attiéké* et le  $D_{90\text{ °C}}$  a été de  $8,5 \pm 1,9$  min pour des quantités d'*attiéké* variant de 150 à 450 g. La durée maximale de vente du lait à la température ambiante a été de 40 min alors que le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé à 90 °C a été de 18 h. En conclusion, le lait et l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan représentent un risque de toxi-infection pour le consommateur et les bactéries du groupe *B. cereus* sont l'une des causes possibles. Il est recommandé de chauffer le lait jusqu'à ébullition et de réchauffer l'*attiéké* à la vapeur d'eau pendant au moins 15 min à 90 °C avant toute consommation, si les bonnes pratiques d'hygiène ne peuvent pas garantir la sécurité de ces aliments.

**Mots clés :** Lait, *attiéké*, Groupe *Bacillus cereus*, toxi-infections, Risque, Abidjan



In Côte d'Ivoire, although milk and *attiéké* play an important role in human nutrition, they could represent a poisoning risk to the consumer, due to poor hygiene throughout the production chain. This study aimed to contribute to the poisoning risk reduction linked to the consumption of local raw milk and *attiéké* contaminated with *B. cereus* group. For this, milk and *attiéké* production systems from farm to retail in Abidjan were studied. The risk of foodborne illness associated with the consumption of milk and *attiéké* was assessed using a questionnaire with 188 consumers of milk and 360 consumers of *attiéké*, respectively. On the one hand, 320 samples from the farms including 150 milk samples and on the other hand 16 samples of freshly prepared *attiéké* and 306 samples *attiéké* sold on the informal markets were collected and analyzed according to EN ISO 7932: 2004. The isolates were identified by polymerase chain reaction (PCR) and characterized by toxigenic and antibiotype. In addition, the resistance of *B. cereus* group spores to hydrothermal warm up of *attiéké* was evaluated. The results showed that *B. cereus* group was found in 41.2% of milk of the samples taken from seller's pooled milk with a mean load of  $2.9 \pm 1.0$  log (CFU/mL). The prevalence of *B. cereus* group in *attiéké* samples taken from the informal markets was 25.2% and an average load of vegetative cells and spores were  $2.4 \pm 1.1$  log (CFU/g) and  $2.3 \pm 1.1$  log (CFU/g) respectively. *B. thuringiensis* (41.9%) and *B. cereus sensu stricto* (36.0%) were the isolated species. The majority virulence genes found were *cytK-2* (80.8%), *hblD* (72.1%) and *nheC* (70.9%). The isolates were highly resistant to tetracycline (94.8%), ciprofloxacin (94.8%) and chloramphenicol (94.2%). The probability of consuming milk and *attiéké* contaminated with *B. cereus* group is 21.6% and 16.0% respectively. In total 12.6% and 18.9% of consumers reported that they contracted a foodborne illness after unheated milk and *attiéké* consumption respectively and the most symptoms were diarrhea and abdominal pain. The hydrothermal warm up of *attiéké* with a temperature greater than or equal to 90°C for at least 15 minutes reduced the concentration of *B. cereus* spores from 4.2 in *attiéké* into  $1.8 \pm 1.0$  log (CFU/g) and  $D_{90^\circ\text{C}}$  was  $8.5 \pm 1.9$  min for the quantities of *attiéké* varying from 150 to 450 g. The maximum duration of the milk sale at ambient temperature is 40 min while, the consumption deadline of *attiéké* warmed up at 90°C was 18 hours. In conclusion, milk and *attiéké* produced and sold in informal markets in Abidjan represents a risk for consumers' health and *B. cereus* group species are one possible cause. It is recommended to heat the milk to boiling temperature and to warm up *attiéké* for at least 15 min at 90°C before consumption if clean milk and *attiéké* production cannot be assured.

**Keywords:** Milk, *Attiéké*, *Bacillus cereus* group, poisoning, Risk, Abidjan



# **INTRODUCTION**

En Côte d'Ivoire comme ailleurs en Afrique, le lait et l'*attiéké* jouent un rôle important dans l'alimentation de la population. Ils font partie des habitudes alimentaires de nombreux peuples. Ainsi, le lait représente dans les systèmes pastoraux une valeur sociale, nutritive et une référence culturelle (**Bonfoh *et al.*, 2002 ; FAO, 2009 ; Fokou *et al.*, 2010**). Il est essentiel à un bon équilibre nutritionnel surtout pour les enfants et constitue une bonne base des apports protéiques d'origine animale nécessaires à chaque individu (**Amiot *et al.*, 2002**).

Le marché de lait local est extrêmement étroit et la consommation du lait est le plus souvent limitée à certaines catégories de la population (**Kouamé-Sina *et al.*, 2010**). La production nationale de lait est faible et ne couvre que 17 % de la consommation globale de lait en Côte d'Ivoire (**MIRAH-DPP, 2012**). Pour améliorer la production de lait, l'État a installé, à travers des projets de développement dont le Projet Laitier Sud, des petits élevages laitiers essentiellement en zones périurbaines pour contribuer à l'approvisionnement des grandes villes ivoiriennes (**MIPARH-DPP, 2003**).

La crise socio-politique de 2002 a détruit tout le cheptel bovin du nord. Par ailleurs, de petites fermes laitières sont créées dans les zones périphériques de la ville d'Abidjan par des fonctionnaires ou des hommes d'affaires ivoiriens ou étrangers qui ont confié la gestion aux Peuls originaires du Mali, du Burkina Faso ou de la Guinée. Environ, 92 % des exploitants sont des petits éleveurs (**Youan-Bi, 2008**) et la majorité du lait produit est vendue directement aux consommateurs par les éleveurs et les petits commerçants sur les marchés informels non contrôlés. La plupart des éleveurs, des trayeurs, des collecteurs et des vendeurs ont peu de connaissance en hygiène et des aspects sanitaires à observer tout au long de la chaîne de production et de vente du lait. Par conséquent, la qualité du lait de ces petits exploitants est constamment remise en cause du fait des conditions d'hygiène précaires observées dans la filière laitière (**BAD, 2002 ; Yapi-Gnaoré *et al.*, 2009 ; N'Goran *et al.*, 2013**). Les conséquences sont entre autres, la perte de la valeur marchande du lait local face aux importations massives de lait et produits laitiers, et secondairement la perte de la rentabilité économique de l'élevage laitier en Côte d'Ivoire.

L'*attiéké*, est une semoule de racines de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) fermenté, partiellement déshydratée, cuite à la vapeur d'eau et d'apparence agglomérée (**NI 713, 2013**). C'est un aliment typiquement ivoirien, dont la consommation locale annuelle est estimée à plus de 450 000 tonnes (**CNRA, 2003 ; Djéni *et al.*, 2008**). À l'origine, l'*attiéké* était produit longtemps pour l'autoconsommation familiale, avant que l'évolution de cette production n'atteigne le niveau semi-industriel qui la caractérise actuellement. Les Adjoukrou, Alladjan et Ebrié sont les trois groupes ethniques du sud de la Côte d'Ivoire, considérés comme les plus

gros producteurs et consommateurs (Assanvo *et al.*, 2000 ; Djè *et al.*, 2008). Mais de plus en plus, la production et la consommation de l'*attiéké* se sont répandues sur tout le territoire ivoirien et dans la sous-région ouest africaine, avec les migrations des populations (Sotomey *et al.*, 2001 ; Djéni *et al.*, 2011). À Abidjan, plus de 34 % des ménages consomment l'*attiéké* au moins une fois par jour avec du poisson ou de la viande (Amani et Kamenan, 2003 ; Djéni *et al.*, 2014). Par ailleurs, avec son coût jugé à la portée de toutes les bourses, l'*attiéké* est devenu l'un des aliments les plus consommés dans plusieurs pays africains où l'urbanisation rapide et les difficultés économiques ont favorisé l'augmentation du nombre de consommateurs (Sotomey *et al.*, 2001 ; Djéni *et al.*, 2011). L'*attiéké* est aussi exporté en Europe, en Amérique et en Asie par le biais de la diaspora noire africaine où il serait prisé et acheté à fort prix (Kacou, 2000 ; Kouassi *et al.*, 2008 ; Djéni *et al.*, 2011).

La production et la commercialisation de l'*attiéké* constituent une source importante de revenus pour les acteurs de la filière manioc. Le commerce d'*attiéké* génère environ 20 à 70 milliards de francs CFA par an (CNRA, 2003 ; Atta, 2008) et procure aux femmes, actrices principales, une indépendance financière leur permettant de se prendre aisément en charge.

La microflore du ferment utilisé dans la préparation de l'*attiéké* est dominée par les espèces de *Bacillus* spp, qui contribuent à la détoxification du manioc, au ramollissement de la pâte de manioc au cours de la fermentation et à l'amélioration du goût et de la texture de l'*attiéké* (Amoa-Awua et Jakobsen, 1996 ; Coulin *et al.*, 2006). Cependant, en tenant compte de certaines propriétés de la bactérie, de la non-conformité de quelques opérations de traitement de la denrée et des caractéristiques de l'environnement de production, l'*attiéké* peut être contaminé par les microorganismes pathogènes pour l'homme, mais particulièrement par le groupe *Bacillus cereus*.

En effet, certains clones du groupe *B. cereus* (*B. cereus sensu stricto*, *B. anthracis* et *B. thuringiensis*) connus pour être particulièrement virulents, peuvent résister à la cuisson à la vapeur de la semoule, par leurs spores thermorésistantes et se retrouver dans le produit fini. Par ailleurs, l'*attiéké* se vend à l'état frais, prêt à consommer, dans un emballage ne garantissant pas une sécurité microbiologique. De plus, les mauvaises conditions de stockage et les fréquentes manipulations post-cuissons au cours de la commercialisation peuvent accroître le niveau de contamination à un niveau de charges dépassant les limites de salubrité acceptables.

La production et la commercialisation du lait et de l'*attiéké* se font essentiellement dans le secteur informel par des petits producteurs. La grande importance du secteur informel rend difficile le contrôle de la qualité du lait et de l'*attiéké* (Sotomey *et al.*, 2001 ; Dao, 2013)

et pose le problème de la sécurité des consommateurs. Ainsi, l'inorganisation de la filière laitière et la faiblesse du système de réglementations et des structures de contrôle de la qualité des produits dans le secteur informel ne permettent pas d'assurer une qualité hygiénique suffisante du lait et de l'*attiéké*. Cette situation est amplifiée par les conditions climatiques variées, avec la chaleur et l'humidité ambiante qui ne favorisent pas parfois la conservation adéquate du produit (Faye et Loiseau, 2002). Par ailleurs, les méthodes utilisées ne suffisent pas à prévenir ou à réduire la contamination par des agents pathogènes susceptibles de causer des maladies d'origine alimentaire aux consommateurs en général et par le groupe *Bacillus cereus* en particulier (Ehling-Schulz et al., 2004). La conséquence, est le risque élevé de contamination microbienne, tel que rapportés par Djéni et al. (2011) et Kouamé et al. (2012), qui ont révélé la présence de coliformes totaux et fécaux, de *Staphylococcus aureus* et de flore fongique de type *Fusarium* spp, dans l'*attiéké* vendu à Abidjan.

Le développement de *B. cereus* dans le lait ou dans l'*attiéké* contribue à la détérioration rapide de chacun de ces produits, limite leur durée de conservation. Spécifiquement, le développement de *B. cereus* dans le lait engendre des défauts technologiques occasionnant de nombreuses pertes aux acteurs de la chaîne de production et aux industriels (Bonfoh et al., 2006).

La consommation du lait cru local et de l'*attiéké* contaminés par les espèces du groupe *B. cereus*, ensemble de six espèces correspondant à *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* et *Bacillus weihenstephanensis*, pourrait représenter un risque de toxi-infection pour le consommateur. Les bactéries groupe *B. cereus* sont des bacilles à Gram positif, sporogènes, ubiquistes du sol, retrouvés dans l'environnement et dans les aliments (Dromigny, 2008). *B. cereus* et les genres apparentés (*B. anthracis* et *B. thuringiensis*) sont fréquemment identifiés comme la cause de maladies alimentaires humaines de gravité moyenne dans le monde malgré quelques cas mortels signalés (Dierick et al., 2005 ; EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008). Ils sont l'agent étiologique de deux types de toxi-infections alimentaires. Une intoxication diarrhéique caractérisée généralement par des douleurs et des crampes abdominales et la diarrhée qui surviennent 6-18 heures après la consommation d'aliments contaminés (EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008 ; Rajkovic et al., 2008), et une intoxication émétique caractérisée par des nausées aiguës et des vomissements (Stenfors et al., 2008) qui apparaissent 1 à 5 heures après la consommation des aliments contaminés et contenant la toxine préformée (EFSA, 2005 ; Dromigny, 2008). De plus, les souches peuvent résister à certains antibiotiques rendant ainsi difficile le traitement des toxi-infections dont elles sont responsables. Toute la population,

indépendamment de l'âge, est souvent exposée à *B. cereus*. Pour les personnes à risque, en particulier les enfants, les vieillards, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées, l'infection à *B. cereus* peut être fatale (Dierick *et al.*, 2005; AFSSA, 2009).

Si le lait et les produits laitiers sont les aliments régulièrement cités dans les toxi-infections alimentaires à *B. cereus* dans le monde, il n'en est pas le cas pour l'*attiéké*. En Côte d'Ivoire, de nombreuses études se sont intéressées à l'amélioration des méthodes de production du lait (N'goran *et al.*, 2008 ; Yapi-Gnaoré *et al.*, 2009) et de l'*attiéké* (Assanvo *et al.*, 2006; Coulin *et al.*, 2006), à l'optimisation et à la mécanisation du système de production de l'*attiéké* (Akely *et al.*, 2012). Récemment, seules quelques études se sont consacrées à la qualité sanitaire du lait (Kouamé-Sina *et al.*, 2010 ; N'goran *et al.*, 2013) et de l'*attiéké* (Djéni *et al.*, 2011, 2014 ; Kouamé *et al.*, 2012). La contamination du lait et de l'*attiéké* par le groupe *B. cereus* et les risques possibles sur la santé du consommateur n'ont pas encore fait l'objet d'une étude en Côte d'Ivoire.

L'analyse participative des risques qui est une méthode se trouvant entre la recherche formelle et informelle, s'avère être l'approche appropriée pour conduire des analyses de nature scientifique et pour proposer des solutions cohérentes et rationnelles aux problèmes liés à la sécurité sanitaire du lait et de l'*attiéké*, en tenant compte des connaissances de la population. La gestion de la qualité par l'analyse participative des risques potentiels de toxi-infection, tout au long de la chaîne de production et de vente au détail liée à un produit (approche *Codex Alimentarius*), a été alors appliquée de la vache laitière jusqu'au consommateur d'une part, et de la productrice d'*attiéké* jusqu'au consommateur d'autre part.

### Questions de recherche

Les questions de recherche qui ont suscité la réalisation de cette étude sont les suivantes :

- 1- Quels sont les facteurs ou les pratiques qui favorisent la contamination du lait et de l'*attiéké* par le groupe *B. cereus* ?
- 2- Quelle est le taux de contamination du lait et de l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan par le groupe *B. cereus* ?
- 3- Quelles sont les caractéristiques toxigéniques et antibiotypiques des isolats du groupe *B. cereus* obtenus du lait et de l'*attiéké* ?
- 4- Quels sont les risques potentiels de toxi-infection encourus par le consommateur de lait ou d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus* ?

5- Comment peut-on réduire le risque de toxi-infection chez le consommateur de lait ou d'*attiéké* contaminés par les espèces du groupe *B. cereus* ?

### **Hypothèses de recherche**

Les hypothèses qui découlent de ces questions sont les suivantes :

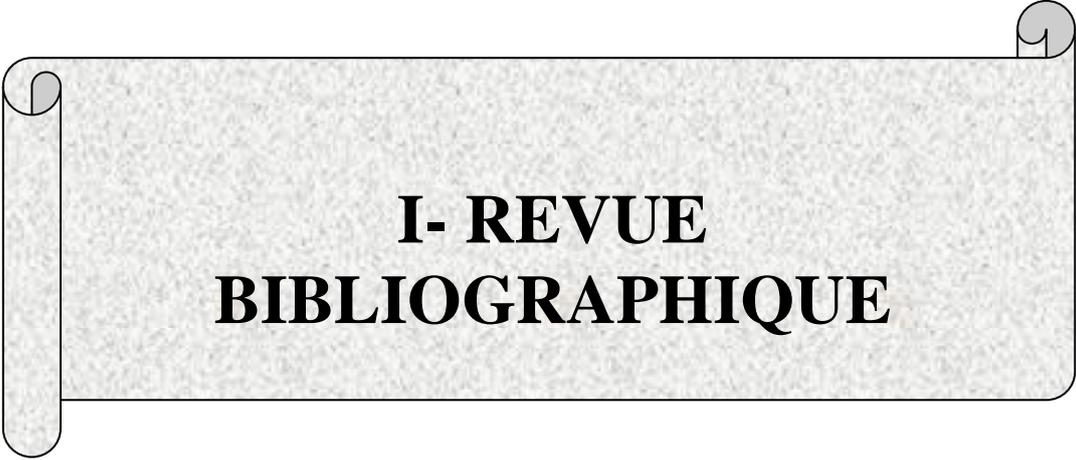
- 1- Certaines pratiques de production et de commercialisation favorisent la contamination du lait et de l'*attiéké* par le groupe *B. cereus* ;
- 2- Certaines pratiques des consommateurs contribuent à une augmentation du risque de toxi-infections lié au groupe *B. cereus* ;
- 3- Le lait et l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan sont contaminés par une diversité génétique de souches toxigènes de *B. cereus* à des charges dépassant les limites de salubrité acceptables ;
- 4- Le traitement thermique adéquat du lait et de l'*attiéké* avant consommation réduit le risque de toxi-infections alimentaires lié au groupe *B. cereus*.

### **Objectifs**

L'objectif général de cette étude était de contribuer à la réduction du risque de toxi-infection suite à la consommation de lait cru local et d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus*.

Les objectifs spécifiques de cette étude étaient de :

- 1- déterminer les caractéristiques des systèmes de production à la commercialisation et les risques de contamination du lait cru local et de l'*attiéké* produits dans le secteur informel à Abidjan ;
- 2- déterminer la diversité génétique du groupe *B. cereus* isolé de la chaîne de production à la vente du lait et de l'*attiéké* ;
- 3- évaluer le risque de toxi-infection lié à la consommation du lait ou de l'*attiéké* ;
- 4- proposer des mesures pour la réduction de la proportion de lait ou d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus* afin de réduire le risque de toxi-infection pour le consommateur.



**I- REVUE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

## 1. GÉNÉRALITÉS SUR LE LAIT

### 1.1. Définition du lait

Le lait est le produit de sécrétion des glandes mammaires des mammifères, comme la vache, la chèvre et la brebis, destiné à l'alimentation du jeune animal naissant (**Amiot *et al.*, 2002**). Il s'agit d'un fluide aqueux opaque, blanc, légèrement bleuté, d'une saveur douceâtre et d'un pH (6,6 à 6,8) légèrement acide, proche de la neutralité (**Pougheon 2001**). C'est un aliment complet et équilibré, sécrété par les glandes mammaires de la femelle et par celles des mammifères femelles pour la nutrition des jeunes (**Aboutayeb, 2009**).

La première définition du lait apparaît en 1908, au Congrès International de la Répression des Fraudes de Paris. Le mot « lait » a été défini comme étant « le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum ».

Le décret du 25 mars 1924 précise que la dénomination « lait » sans indication de l'espèce animale de provenance est réservée au lait de vache. Tout lait provenant d'une femelle laitière autre que la vache doit être désignée par la dénomination « lait » suivie de l'indication de l'espèce dont il provient. Exemple : lait de chèvre, lait de brebis, lait d'ânesse, etc.

La décision de la commission du 28 octobre 1988 (88/566/CEE) établit la liste des dénominations non compatibles avec le règlement. Ainsi, tous les liquides blancs ne peuvent donc pas être appelés « lait ». Mais certains, reconnus pour leurs usages traditionnels, sont acceptés. Pour les liquides blancs ne pouvant être appelés « lait », il est possible d'utiliser les termes « boisson » ou « jus ». Les boissons végétales ont une composition nutritionnelle différente des laits animaux.

Le lait est également défini par le règlement européen 1234/2007 annexe XII (**Communauté Européenne, 2007a**), qui prévoit également les conditions d'utilisation de cette dénomination. Ainsi, la dénomination « lait » est réservée exclusivement au produit de la sécrétion mammaire normale, obtenu par un ou plusieurs traites, sans aucune addition ni soustraction. Toutefois, cette dénomination « lait » peut-être utilisée pour le lait ayant subi un traitement n'entraînant aucune modification de sa composition.

## 1.2. Composition générale du lait de vache

### 1.2.1. Aspect et composition physico-chimique du lait de vache

Le lait apparaît comme un liquide opaque blanc mat, plus ou moins jaunâtre selon la teneur en  $\beta$ -carotène de la matière grasse, deux fois plus visqueux que l'eau, de saveur légèrement sucrée. Il a une odeur peu marquée mais reconnaissable. Schématiquement, le lait peut être considéré comme une émulsion de matière grasse dans une solution aqueuse comprenant de nombreux éléments dont les uns sont à l'état dissous et les autres sont la forme colloïdale.

Les laits des différentes espèces de mammifères sont constitués des mêmes catégories de composants. Cependant, les proportions respectives de ces composants varient largement d'une espèce à l'autre. Du point de vue physico-chimique, le lait est un produit très complexe. Des globules de matières grasses en suspension sont retrouvés dans une solution contenant le sucre du lait (lactose), des protéines de très bonne qualité (surtout la caséine), des acides aminés essentiels et des sels de calcium, de phosphore, de chlore, de sodium de potassium et de soufre. Le lait est particulièrement riche en lysine qui est par excellence l'acide aminé de la croissance (**Amiot *et al.*, 2002**). L'extrait sec total du lait est en moyenne de 13,1 % et l'extrait sec dégraissé (sans matière grasse) est de 9,2 %. L'eau est l'élément quantitativement le plus important (**Amiot *et al.*, 2002**). Elle représente environ 90 % du lait. La matière grasse (3,7 %), le lactose (4,6 %), les matières azotées et les matières salines sont présents en quantités sensibles donc plus ou moins dosables. Les enzymes, les pigments et les vitamines figurent à l'état de traces et sont plus difficilement appréciables. Par ailleurs, le lait contient des quantités appréciables de cholestérol et de vitamine A ainsi que de faibles quantités de vitamine D et E. Le lait est un produit équilibré d'un point de vue nutritionnel, adapté aux besoins de chaque espèce. La composition générale du lait de vache est présentée dans le **tableau 1** et les propriétés physico-chimiques du lait dans le **tableau 2**.

**Tableau 1** : Composition générale du lait de vache

Constituants majeurs	Variations limites (%)	Valeur moyenne (%)
Eau	85,5 – 89,5	87,5
Matières grasses	2,4 – 5,5	3,7
Protéines	2,9 – 5,0	3,2
Lactose	3,6-5,5	4,6
Minéraux	0,7 – 0,9	0,8

**Source: Amiot *et al.* (2002)**

**Tableau 2** : Propriétés physico-chimiques du lait de vache

Propriétés	Valeur moyenne
Densité du lait à 20°C	1,028 - 1,034
Densité du lait écrémé	1,035 – 1,036
Densité de la matière grasse	0,92 – 0,94
Point de congélation	– 0,55°C
pH	6,6 – 6,8
Acidité titrable	14 – 17 °D
Activité de l'eau à 20°C	0,99

**Source : Leymarios (2010)**

### 1.2.2. Composition microbiologique du lait

Le lait est un fluide biologique complexe, sécrété par les femelles des mammifères (**Rasolofa, 2010**). Du fait de sa composition physico-chimique susmentionnée, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. Pour d'autres germes banaux ou pathogènes, il n'est qu'un véhicule occasionnel. Selon leur importance, les microorganismes du lait sont répartis en deux grandes classes : la flore indigène ou originelle et la flore contaminante.

#### 1.2.2.1. Flore indigène ou originelle du lait

Lorsque le lait provient d'un animal sain et qu'il est prélevé dans des conditions aseptiques, il devrait contenir généralement moins de 5 000 UFC/mL (**Vignola, 2002**). Le nombre de microorganismes est limité par le système immunitaire de l'animal et les agents antimicrobiens sécrétés dans le lait (**Rasolofa, 2010**). La flore indigène du lait se définit comme l'ensemble des microorganismes retrouvés dans le lait à la sortie du pis. Ces microorganismes, plus ou moins abondants, sont en relation étroite avec l'alimentation, la race et d'autres facteurs. Les germes dominants de la flore indigène sont principalement des microorganismes mésophiles. Il s'agit essentiellement des germes saprophytes de pis et des canaux galactophores : *Micrococcus* sp., *Streptococcus lactiques*, *Lactobacillus*.

#### 1.2.2.2. Flore contaminante du lait

La flore contaminante est l'ensemble des microorganismes ajoutés au lait, de la récolte jusqu'à la consommation. Elle peut se composer d'une flore d'altération qui est capable de causer des défauts sensoriels ou de réduire la durée de conservation des produits, et d'une flore pathogène capable de provoquer des malaises chez les consommateurs de lait (**Vignola, 2002**).

La flore d'altération peut causer des défauts sensoriels de goût, d'arômes, d'apparence ou de texture du lait entraînant la réduction de sa durée de vie. Parfois, certains microorganismes nuisibles du lait peuvent aussi être pathogènes. Les principaux genres identifiés sont *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp., les coliformes, soit principalement les genres *Escherichia* et *Enterobacter*, les bactéries sporulées telles que *Bacillus* sp., et *Clostridium* sp., et certaines moisissures et levures. Quatre groupes de bactéries d'altération sont généralement présents dans le lait cru : les producteurs d'acide lactique, d'acide propionique, d'acide butyrique et d'enzymes de dégradation principalement les protéases et les lipases.

Des germes pathogènes et dangereux du point de vue sanitaire peuvent aussi être présents lorsque le lait est issu d'un animal malade. Il peut s'agir des agents des mammites (Streptocoque pyogène, Corynebactéries pyogènes, *Staphylococcus aureus*) et des germes d'infection générale tels que *Salmonella*, *Brucella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, *Bacillus anthracis* et quelque virus. Ainsi, hormis les maladies de la mamelle, l'ensemencement du lait se fait pour l'essentiel au cours des diverses manipulations dont il est l'objet à partir de la traite (**Guiraud, 2003**).

La flore contaminante du lait possède en général un caractère mésophile dominant. Dans cette microflore contaminante, les bactéries sont dominantes et conditionnent le plus directement la qualité hygiénique ainsi que l'aptitude à la conservation et à la transformation du lait. En outre, le lait peut contenir des agents pathogènes dont la multiplication dépend principalement de la température et de la microflore du lait (**Frank et Hassan, 2002**).

#### 1.2.2.3. Bactéries thermoduriques dans le lait pasteurisé

Le lait est pasteurisé avant qu'il soit vendu pour la consommation. L'objectif principal de la pasteurisation est la destruction des bactéries pathogènes présentes dans le lait. Les microorganismes du lait pasteurisé sont constitués de bactéries thermoduriques ou thermorésistantes et celles qui contaminent le lait après le traitement thermique (post contamination). Une charge élevée en bactéries thermoduriques signale généralement des pratiques non hygiéniques. La flore thermodurique dans le lait est subdivisée en six groupes principaux (**Rasolofu, 2010**) :

- Les *Bacillus* sp. : *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus brevis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*.
- Les corynebactéries : *Micobacterium lacticum*.
- Les microcoques : *Micrococcus luteus*.
- Les streptocoques : *Streptococcus thermophilus*, *Streptococcus bovis*, *Streptococcus faecalis*.
- Les alcaligenes : *Alcaligenes tolerans*.
- Les clostridies: *Clostridium butyricum*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium tyrobutyricum*.

Les contaminants du lait pasteurisé peuvent être des coliformes, des bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcaligenes* et *Flavobacterium* (Ray, 1996).

Les contaminants post-pasteurisation peuvent influencer la durée de conservation du lait réfrigéré. La durée de conservation du lait pasteurisé est limitée par le développement des bactéries psychrotrophes sporulantes. Si le procédé de pasteurisation est correctement appliqué, le lait sera exempt de bactéries psychrotrophes à Gram négatif et de bactéries pathogènes principalement observées dans le lait cru. Le lait ultra haute température (UHT), qui est un produit commercialement stérile, peut contenir des spores viables de quelques bactéries thermoduriques (Ray, 1996).

#### 1.2.2.4. Bactéries psychrotrophes du lait

Les bactéries psychrotrophes du lait sont des microorganismes très importants dans l'industrie laitière en raison de leur faculté à pouvoir croître en 0 et 4°C. Cette plage de températures correspond à celle recommandée pour la conservation du lait. Les principaux microorganismes psychrotrophes du lait sont (Vignola, 2002) :

- *Alcaligenes*,
- *Pseudomonas* (bactéries d'altération),
- *Bacillus* (bactérie sporulée pouvant être nuisible ou pathogène),
- *Clostridium* (semblable à *Bacillus*),
- *Listeria monocytogenes* (pathogène)
- *Yersinia enterocolitica* (pathogène),
- Levures (microorganismes nuisibles et fermentaires),
- Moisissures (microorganismes aérobies stricts),
- Certaines souches de bactéries lactiques (acidification du lait au froid).

### 1.3. Contamination bactérienne du lait

Le lait recueilli après la traite contient toujours des microorganismes dont le nombre et les espèces auxquels ils appartiennent sont très variables. La présence inévitable de ces germes est due à des contaminations d'origine intra-mammaire et extra-mammaire (Weber, 2011).

### 1.3.1. Contamination intra-mammaire

À la sortie de la mamelle, le lait, même qu'il provienne d'un animal sain et que la traite soit effectuée dans les conditions rigoureuses d'hygiène, contient habituellement une centaine à quelques milliers de bactéries par millilitre. Il s'agit de germes banaux appartenant le plus souvent aux genres *Corynebacterium* et *Micrococcus* et parfois de germes pathogènes. Ils proviennent du milieu extérieur d'où ils pénètrent dans la mamelle par le canal du trayon. Ils sont entraînés avec le lait au moment de la mulsion (**Weber, 2011**).

### 1.3.2. Contamination extra-mammaire

La contamination extra-mammaire est constituée par des germes pathogènes infectant l'animal. Ils parviennent dans la mamelle par la circulation sanguine. C'est, par exemple, le cas pour les agents de la brucellose et de la tuberculose. Au cours des opérations de traite, le lait reçoit un second apport de microorganismes d'espèces variées dont le nombre est habituellement très supérieur à celui dû à la contamination d'origine intra-mammaire. Les sources de contamination du lait peuvent être de nature diverse (**tableau 3**). Le nombre et les types de microorganismes trouvés dans le lait reflètent ainsi les conditions hygiéniques de la traite et de l'étable. Les ustensiles en contact avec le lait et la machine à traire mal nettoyée sont notamment à l'origine de la très forte charge microbienne des laits.

L'homme contamine le lait pendant la traite, la manipulation, la collecte, le traitement, le transport et l'entreposage du lait (**FAO, 2011**). La majorité des microorganismes dans le lait proviennent des surfaces, des aliments, de l'air, de l'eau, du sol, des ustensiles et des équipements utilisés pour la traite (seaux à traire, machines à traire) et l'entreposage (bidons, cuves, tanks). L'augmentation du nombre de bactéries, pendant le transport du lait, est surtout due à la contamination par des véhicules insuffisamment nettoyés et désinfectés (**Frank et Hassan, 2002**). Les approvisionnements en eau, lorsqu'elle est polluée, constituent l'une des principales sources externes d'infection du lait à la ferme et parfois même au centre de pasteurisation. Les insectes, rongeurs, matériaux sales et engrais jouent tous un rôle dans cette pollution. Les phases les plus critiques sont celles qui suivent la pasteurisation, car un seul porteur humain peut alors ré-contaminer de grandes quantités de lait (par exemple pendant la mise en bouteilles ou en cartons, ou au cours de la distribution en vrac dans les crémeries).

**Tableau 3** : Contaminants et sources de contamination bactérienne du lait

Sources	Genres
Personnel	<i>Coliformes, Salmonella, Enterococcus, Staphylococcus</i>
Air	<i>Streptococcus, Micrococcus, Corynebacterium, Bacillus</i> , levures et moisissures
Intérieur du pis	<i>Streptococcus, Micrococcus, Corynebacterium</i>
Extérieure du pis	<i>Micrococcus, Staphylococcus, Enterococcus, Bacillus</i>
Fèces	<i>Escherichia, Staphylococcus, Listeria, Mycobacterium, Salmonella</i>
Appareil de traite	<i>Micrococcus, Streptococcus, Bacillus</i> , coliformes
Litière	<i>Clostridium, Bacillus, Klebsiella</i>
Sol	<i>Clostridium, Bacillus, Pseudomonas, Mycobacterium</i> , levures et moisissures
Alimentation	<i>Clostridium, Listeria, Bacillus</i> , bactéries lactiques
Eau	Coliformes, <i>Pseudomonas, Corynebacterium, Alcaligenes</i>

Source : Frank et Hassan (2002)

#### **1.4. Place du lait dans l'alimentation humaine**

**Franworth et Mainville (2010)** évoquent que le lait est reconnu depuis longtemps comme étant un aliment bon pour la santé. Il peut être ajouté au régime sous plusieurs formes. Le lait et les œufs sont les seuls aliments complets connus à l'état naturel du fait qu'ils contiennent des quantités significatives de quelques 55 nutriments essentiels à la vie (**Amiot *et al.*, 2002**). Au regard de son contenu en énergie métabolique, le lait est considéré comme un aliment de forte densité nutritionnelle. Le lait n'est cependant pas un aliment parfait, car il ne contient pas à l'état naturel de fibres et son contenu en certains nutriments, dont le fer et la vitamine D, demeure relativement faible. Le lait et les produits laitiers constituent un des quatre grands groupes alimentaires reconnus d'une saine alimentation.

Le lait est un aliment liquide, mais sa teneur en matière sèche (10 à 14 %) est proche de celle de nombreux aliments solides. Le caractère essentiel de sa composition est son harmonie qui fait de lui un aliment de valeur nutritionnelle inestimable, particulièrement pour le jeune enfant. Le lait contient la plupart des éléments nécessaires à l'édification des tissus de l'organisme. Les protéines du lait ont une valeur nutritive élevée, en particulier la lactoglobuline et la lactalbumine, riche en acides aminés soufrés. Le lait représente également une excellente source de calcium, de phosphore, de riboflavine et relativement riche en thiamine et en vitamine A. Cependant, il est pauvre en fer, cuivre, acide ascorbique et en vitamine D (**Amiot *et al.*, 2002**). Le lait possède une valeur énergétique de 700 kcal/litre. La haute qualité nutritionnelle des protéines du lait repose sur leur forte digestibilité et leurs compositions particulièrement bien équilibrées en acides aminés indispensables. Pour les nouveau-nés, les protéines du lait constituent une source protéique adaptée aux besoins de croissance durant la période néonatale (**Derby, 2007**). En moyenne, le lait contribue à apporter 5 % des lipides totaux et 7 % des acides saturés chez l'enfant, respectivement 1,7 % et 3 % chez l'adulte (**Noblet, 2012**).

#### **1.5. Risques de maladie infectieuse inhérents à la consommation du lait**

Le lait n'est pas une sécrétion entièrement stérile. Dès que le lait est stocké, le risque de prolifération microbienne augmente et, ce d'autant plus qu'une contamination peut survenir au cours d'un processus industriel long et complexe. Un dérapage et un pullulement de souches pathogènes sont possibles dans ces circonstances.

De nombreux pathogènes pour l'homme, dont *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *E. coli* pathogènes pour l'homme et producteurs de vérocytotoxine, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia*, *Staphylococcus aureus* producteurs d'entérotoxines, *Bacillus cereus*, *Cryptosporidium parvum*, etc. ainsi que les toxines de *Clostridium botulinum* peuvent être retrouvés dans le lait des bovins. La prévalence de ces agents dans le lait de bovins varie, mais leur présence a été démontrée dans beaucoup d'études. Dans les pays industrialisés, les épidémies humaines dues à la consommation de lait ou de produits à base de lait représentent 2 à 6 % des épidémies humaines d'origine alimentaire (AFSCA, 2011).

La majorité des épidémies humaines rapportées dues à la consommation de lait de bovins est causée par *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. et les souches de *Escherichia coli* O157 et non O157 pathogènes, avec quelques cas rares décrits pour *Listeria monocytogenes*. *Escherichia coli* pathogènes pour l'homme et producteurs de vérocytotoxine et *Listeria monocytogenes* peuvent provoquer des maladies très graves, suivis par *Campylobacter* spp. et *Salmonella* spp. Ces 4 agents pathogènes peuvent être présents chez les bovins, dans l'environnement des exploitations et dans le lait de bovins. D'un point de vue microbiologique, la consommation de lait de bovins est considérée comme un produit de risque pour une infection alimentaire humaine. L'exposition et le risque d'une infection alimentaire peuvent être augmentés, spécialement pour la population à risque, c'est à dire les jeunes enfants, les personnes âgées, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées ou souffrant d'une autre maladie, si le consommateur n'est pas bien informé sur la nécessité de faire bouillir le lait cru avant la consommation (AFSCA, 2011).

Le risque lié à la consommation de lait est considérablement réduit voire éliminé par le traitement thermique du lait. La pasteurisation (71°C/15 s ou 63°C/30 min, ou équivalent) réduit les pathogènes présents sous forme végétative dans le lait jusqu'à un niveau considéré comme sûr pour la santé publique. Cependant, la pasteurisation est incapable de détruire les spores de *Clostridium botulinum* et de *Bacillus cereus* et, le choc thermique peut provoquer leur germination. La stérilisation et le traitement UHT du lait détruisent les formes végétatives des agents pathogènes ainsi que leurs formes sporulées, et un produit commercialement stérile est fourni (AFSCA, 2011).

## 2. GÉNÉRALITÉS SUR L'ATTIÉKÉ

### 2.1. Manioc et nutrition

Le manioc (*Manihot esculenta* Crantz) est une plante arbustive de la famille des Euphorbiaceae, à racines riches en amidon et originaire de l'Amérique du Sud (Janssens, 2001). Il est devenu une culture importante dans les pays tropicaux en développement (Stupak *et al.*, 2006). La production annuelle de manioc en Afrique était de 157,987 millions de tonnes en 2013 (FAO, 2014). C'est une des sources de calories de l'alimentation humaine dans les régions tropicales (Janssens, 2001). À ce titre, le manioc relaie des cultures vivrières telles que le mil, le maïs et le sorgho. Malgré son importance nutritionnelle, il présente deux inconvénients majeurs qui limitent son utilisation en alimentation humaine : une toxicité liée à la présence de composés cyanogènes et une faible teneur en protéines comprise entre 1 et 5 % de matière sèche (Stupak *et al.*, 2006).

Les variétés de manioc sont réparties en deux groupes : les variétés douces et les variétés amères. Les variétés douces sont utilisées artisanalement pour l'alimentation humaine, tandis que les amères doivent subir une transformation avant consommation (Assanvo *et al.*, 2006).

Dans les pays de l'Afrique subsaharienne, le manioc est reconnu comme réserve alimentaire en cas de famine parce qu'il est disponible toute l'année, facile à cultiver, pousse dans les régions où la pluviométrie est faible, se développe sur des sols pauvres et résiste aux maladies et aux ravageurs (FAO, 2004 ; Ceballos *et al.*, 2006).

En Afrique de l'Ouest, la racine de manioc est utilisée principalement dans l'alimentation humaine sous diverses formes artisanales et industrielles. La racine de manioc tend à remplacer le blé dans la fabrication de nombreux produits alimentaires tels que le pain et le gâteau (Bokanga, 1998). Elle sert aussi à l'alimentation du bétail. Plusieurs produits dérivés du manioc sont commercialisés, parmi lesquels le gari, l'*attiéké*, les cossettes, l'amidon, le tapioca, le fufu, la farine brute, etc.

En Côte d'Ivoire, le manioc occupe le deuxième rang au niveau des cultures vivrières après l'igname avec une production annuelle de 4,2 millions de tonnes en 2014 (FAO, 2016). Il est cultivé dans presque toutes les régions et constitue à la fois une culture de subsistance et de rente pour les producteurs (Kouassi *et al.*, 2008). La culture et l'exploitation du manioc engendrent des activités diverses qui participent à la sécurité alimentaire et permettent de lutter contre la pauvreté. Les racines tubéreuses après transformation offrent une diversité de produits dont l'*attiéké*, le foutou, la farine,

l'amidon, les flocons, le Gari, le Placali, le Konkondé, l'Attoukpou, le bitô, le bédécouman, etc. (Sotomey *et al.*, 2001 ; Kouassi *et al.*, 2008).

## 2.2. Préparation et principaux types d'*attiéké* en Côte d'Ivoire

### 2.2.1. Définition de l'*attiéké* fraîchement préparé

L'*attiéké* est une semoule de racine de manioc (*Manihot esculenta* Crantz ou *Manihot ulilissima* Pohl) cuite à la vapeur d'eau d'apparence agglomérée, obtenu à partir de racines fraîches de manioc selon le procédé de fabrication suivant : épluchage, concassage ou découpage, lavage à l'eau, râpage ou broyage, fermentation, essorage, émottage, semoulage, pré-séchage, tamisage, vannage et cuisson à la vapeur d'eau (NI 713, 2013)). C'est un couscous de manioc à granulométrie variable, de couleur se situant entre le blanchâtre et le jaunâtre (Kouassi *et al.*, 2008). Il a une texture collante, un goût légèrement acidulé et ressemble au couscous de blé (Djéni, 2009). L'*attiéké* est un couscous traditionnel obtenu par agglomération de granules sphériques de semoule frais de pulpe de manioc préparé à la vapeur (Akely, 2012).

L'*attiéké* se vend sur le marché à l'état frais, prêt à consommer soit par petites portions emballées dans des sachets en plastiques non alimentaires, soit dans de petits paniers tapissés de plastique ou dans des paniers en raphia recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées "feuilles d'*attiéké*" (Sotomey *et al.*, 2001 ; Kouassi *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Production et commercialisation de l'*attiéké*

L'*attiéké* est un produit typiquement ivoirien préparé originellement à l'échelle artisanale dans le sud de la Côte d'Ivoire par les peuples Adjoukrou, Alladjan et Ebrié qui sont les plus gros producteurs (Assanvo *et al.*, 2006). La production de l'*attiéké* est encore artisanale et est basée sur le savoir-faire empirique des productrices. L'*attiéké* était produit pour l'autoconsommation familiale principalement dans la région sud de la Côte d'Ivoire. La production de l'*attiéké* a dépassé le cadre familial, s'est répandue dans tout le pays et dans les pays de l'Afrique de l'Ouest (Sotomey *et al.*, 2001 ; Assanvo *et al.*, 2006). La Côte d'Ivoire produit plus de 450 000 tonnes d'*attiéké* par an avec une production journalière de plus de 100 tonnes pour la seule ville d'Abidjan concernant la filière artisanale (CNRA, 2003). Les activités de production et de commercialisation de l'*attiéké* font intervenir plus de 100 000 personnes (CNRA, 2003). Elles produisent des revenus supplémentaires aux femmes pour les besoins familiaux tout en leur assurant une relative

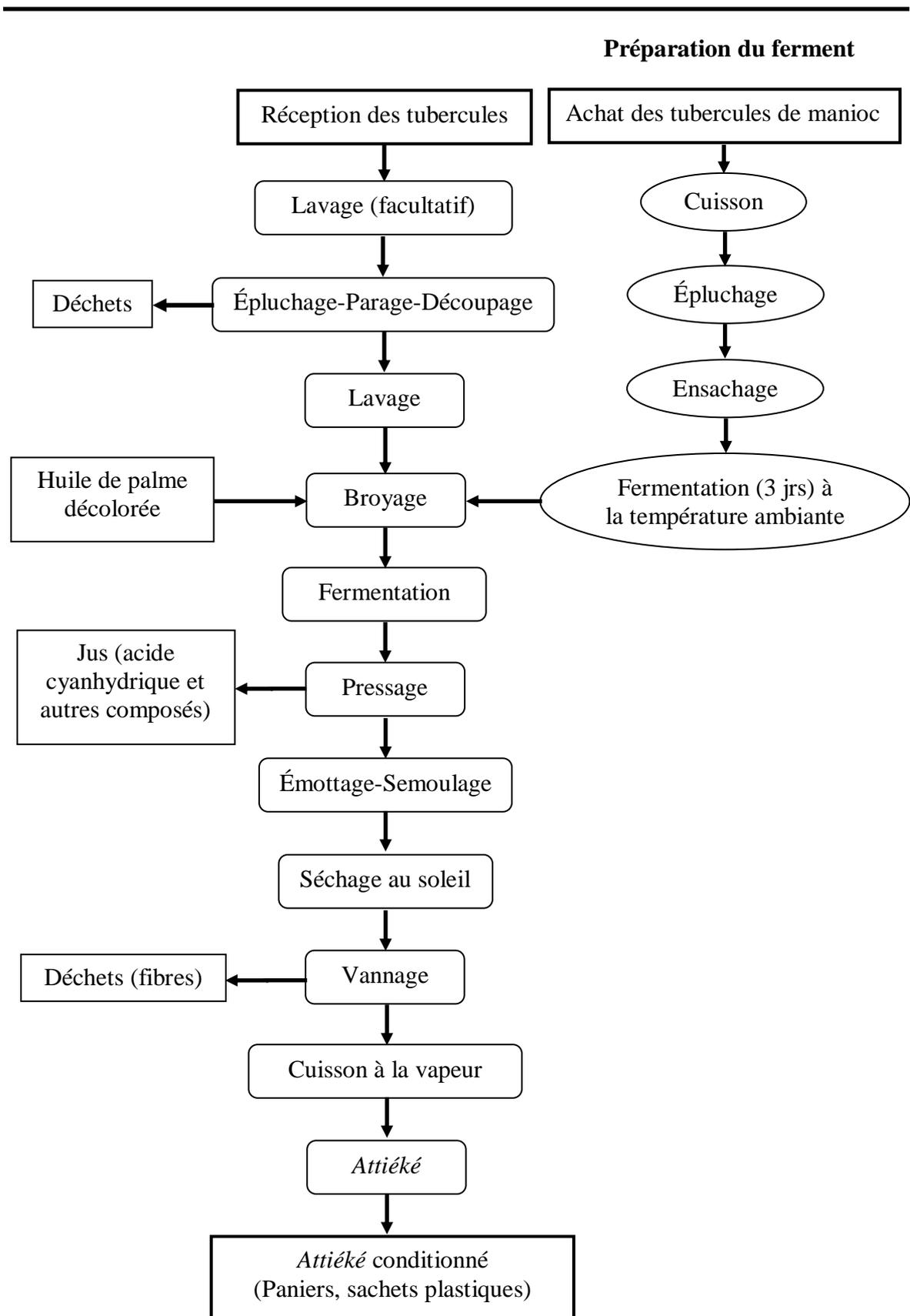
indépendance financière. Le commerce d'*attiéké* génère environ 20 à 70 milliards de francs CFA par an (CNRA, 2003 ; Atta, 2008). De plus, de nos jours des groupements de femmes productrices d'*attiéké* se créent pour à la demande de plus en plus croissante de la population.

La production de l'*attiéké* peut se faire à partir de la pulpe des deux variétés de manioc, douce ou amère. Mais, ce sont les variétés amères de manioc qui sont utilisées généralement pour la production et la variété la plus prisée des productrices ivoiriennes est le "Improved African Cassava" (IAC) à cause de sa disponibilité et de sa faible teneur en eau (Assanvo *et al.*, 2000). La production de l'*attiéké* est précédée d'une étape de préparation du ferment (**figure 1**). Les techniques de préparation du ferment de manioc et de l'*attiéké* varient très peu selon les groupes ethniques (Kouassi *et al.*, 2008). De façon générale, le ferment ("lidjrou" ou "egoun" ou "logoun" en Adjoukrou, "bêdèfon" en Alladjan et "mangnan" en Ebrié) est préparé à partir de la variété de manioc retenue pour la production de l'*attiéké*. La racine de manioc épluchée ou non, découpée en morceaux ou non, est lavée et cuite à l'eau dans une marmite pendant 10-20 min. Après cuisson, les racines sont refroidies à la température ambiante, emballées dans des sacs de jute dits sac-fermenteur ou dans un sachet puis conservées dans un endroit sec à l'abri de la lumière pour une fermentation spontanée pendant 2-3 jours qui va permettre le développement des microorganismes (Kouassi *et al.*, 2008). Les microorganismes ainsi cultivés, sont utilisés pour la fermentation de la pâte de manioc destinée à la préparation de l'*attiéké* (Assanvo *et al.*, 2006 ; Kouassi *et al.*, 2008).

La production de l'*attiéké* comprend douze opérations (**figure 1**), qui s'étalent sur deux à quatre jours. Les racines de manioc sont épluchées à l'aide de couteau et découpées en petits morceaux de 3 à 4 cm de long pour en extraire les fibres. Les cossettes obtenues sont ensuite lavées plusieurs fois à grande eau et marinées dans une grande bassine d'eau pour empêcher leur bruissement pendant le découpage. Les cosettes sont broyées à l'aide d'une broyeuse à moteur ou manuelle (râpage à la tôle perforée) avec addition d'huile de palme décolorée et de ferment précédemment préparé. Le broyat obtenu est dans certains cas réhydraté, puis laissé reposer pendant 1 à 2 heures dans les bassines et fermenté à température ambiante pendant une nuit dans des sacs de jute de 10 à 15 kg de contenance. Ces sacs contenant la pâte sont ensuite pressés à l'aide d'une presse à vis. Le gâteau de pressage obtenu est alors écrasé sur un tamis pour retirer les morceaux de manioc non

fermentés et la granulation est effectuée à la main dans une bassine ou une écuelle en bois spécial. La semoule obtenue est séchée en couches minces dans des vans à l'air libre pendant au moins une heure avant d'être à nouveau tamisés, vannée et défibrée. La semoule obtenue est cuite à la vapeur d'eau pendant une trentaine de minute en moyenne pour donner l'*attiéké* fraîchement préparé prêt à consommer (**Heuberger, 2005 ; Kouassi et al., 2008**).

La durée de production depuis l'épluchage jusqu'à la cuisson varie en fonction des productrices. Elle est en général de 2 jours pour la plupart des productrices. Cependant, certaines d'entre elles mettent beaucoup plus de temps au vannage, au défibrage et au tamisage, les conduisant ainsi à trois jours de préparation. Les opérations unitaires impliquées dans la préparation de l'*attiéké* sont encore manuelles, exception faite au broyage qui se fait désormais à l'aide de broyeuse électrique ou à moteur. De plus, au cours de cette étape, sont ajoutés le ferment à raison de 5 à 10 % de la quantité de cosette de manioc obtenue après épluchage et découpage (**Toka, 1998**) et 1 % d'huile de palme décolorée par chauffage (**Djéni, 2009**). L'ajout de l'huile de palme facilite le semoulage et évite la prise en masse des grains après la cuisson (**Kouassi et al., 2008**). La fin de la fermentation de la pâte s'apprécie au toucher (**Djéni, 2009**).



**Figure 1** : Diagramme de fabrication de l'*attiéké*

**Kouassi *et al.* (2008)**

### 2.2.3. Principaux types d'*attiéké*

En Côte d'Ivoire, il existe plusieurs types d'*attiéké* selon les ethnies productrices, mais les principaux types sont notamment l'*attiéké* Adjoukrou, l'*attiéké* Ebrié, l'*attiéké* Alladjan (**Kouassi et al., 2008**).

#### 2.2.3.1. *Attiéké Adjoukrou*

L'*attiéké* Adjoukrou est composé d'un mélange de petits grains et de grains moyens (**Assanvo et al, 2000**). L'ensemble donne une forme d'*attiéké* qui présente une texture collante, souvent de couleur jaune ou crème (brillant), d'odeur agréable et de goût légèrement acidulé. Ce type d'*attiéké* peut être conservé au plus pendant une semaine à la température ambiante. Toutefois, lorsque les grains sont bien séchés et bien cuits, la conservation peut aller au-delà d'une semaine voire un mois.

#### 2.2.3.2. *Attiéké Ebrié*

L'*attiéké* Ebrié semble être le plus produit à Abidjan. Il présente trois variantes : la plus courante est l'*attiéké* ordinaire appelé *attiéké* Ebrié composé d'un mélange de petits grains et de gros grains. L'*attiéké* ordinaire présente une couleur blanchâtre (**Djéni, 2009**). Les deux autres variantes sont l'Agbodjama à petits grains et celui à grains moyens. Ces deux variantes possèdent des grains uniformes (**Djéni, 2009**).

#### 2.2.3.3. *Attiéké Alladjan*

L'*attiéké* Alladjan tout comme les deux autres types, est produit et vendu à l'état frais prêt à la consommation. Dans cet état, il est humide et contient environ 50 % d'eau avec des grains détachables à texture collante, de couleur jaune clair ou crème, d'odeur agréable et de pH compris entre 4 à 4,5 (**Djéni, 2009**). Il est composé d'un mélange de petits grains, de grains moyens et de gros grains. Lorsque les grains sont bien cuits, la conservation peut se faire au-delà d'une semaine voire un mois.

#### 2.2.3.4. *Attiéké Garba*

L'*attiéké* Garba est une variante de l'*attiéké* obtenue par la suppression de certaines étapes de processus normal de fabrication de l'*attiéké* (granulation et de séchage), de la diminution de la quantité de ferment (3 %) entraînant un raccourcissement du temps de production. Il en résulte un produit collant et farineux avec beaucoup de fibres, mais il

---

constitue une haute source d'énergie à faible coût (**Heuberger, 2005 ; Djéni, 2009**). C'est un produit de qualité inférieure par rapport aux autres variétés.

L'*attiéké* de préparation traditionnelle particulièrement les types Adjoukrou et Alladjan sont opposés à l'*attiéké* de type Ebrié. L'*attiéké* Adjoukrou et l'*attiéké* Alladjan ont tous deux un arôme agréable et des grains qui sont faiblement liés. Cependant, l'*attiéké* Alladjan possède une texture plus hétérogène et l'*attiéké* Adjoukrou un goût plus sucré et moins aigre. Ces deux types d'*attiéké* sont différents de l'*attiéké* Ebrié essentiellement au niveau du goût et de la texture. L'*attiéké* Ebrié possède un goût plus aigre que les autres et est moins sucré. L'*attiéké* Adjoukrou possède une granulométrie plus fine que l'*attiéké* Alladjan et Ebrié (**Djéni, 2009**).

#### 2.2.4. Consommation de l'*attiéké*

Parmi les produits à base de manioc, l'*attiéké* demeure le plus prisé et le plus consommé en Côte d'Ivoire. Autrefois, c'était la nourriture de base des populations lagunaires du sud de la Côte d'Ivoire (Adjoukrou, Alladjan, Ebrié, Avikam et Ahizi) qui en sont les plus grands consommateurs (**Assanvo et al, 2006**). De nos jours, avec l'urbanisation rapide des villes africaines et la demande sans cesse croissante d'aliments prêts à consommer, la consommation de l'*attiéké* a dépassé le cadre familial et s'est généralisée dans les centres urbains et sur toute l'étendue du territoire ivoirien. Ainsi, selon **Amani et Kamenan (2003)**, 30 % de la population abidjanaise préfèrent l'*attiéké* au petit déjeuner, 12 % au déjeuner et 15 % au dîner. Par ailleurs, avec son coût jugé à la portée de toutes les bourses, l'*attiéké* est devenu l'un des aliments les plus consommés dans plusieurs pays africains où l'urbanisation rapide et les difficultés économiques ont favorisé l'augmentation du nombre de consommateurs (**Sotomey et al., 2001 ; CNRA, 2003**). L'*attiéké* est aussi exporté en Europe précisément en France et en Belgique, en Amérique et en Asie par le biais de la diaspora noire africaine où il serait prisé et acheté à fort prix (**Kacou, 2000 ; Kouassi et al., 2008 ; Djéni, 2009**).

Parmi les différents types d'*attiéké* produits (*Attiéké* Adjoukrou, *Attiéké* Ebrié et *Attiéké* Alladjan), l'*attiéké* Adjoukrou est le plus apprécié par les abidjanais (**Assanvo et al., 2000**) tandis que l'*attiéké* Ebrié est l'*attiéké* le plus consommé (**Djéni, 2009**). L'*attiéké* est consommé accompagné de viande, de poisson, de légumes ou de soupe (**Djéni et al., 2014**).

### 2.2.5. Caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles de l'*attiéké*

L'*attiéké* fraîchement préparé est caractérisé par un pH acide. Le pH de l'*attiéké* fraîchement préparé varie de 3,9 à 5,0 (Sotomey *et al.*, 2001, Coulin *et al.*, 2006 ; Djéni *et al.*, 2011 ; Kouamé *et al.*, 2012) avec un pH moyen de 4,4 (Coulin *et al.*, 2006). L'acidité titrable varie de 1,7 % à 2,9 % en fonction des variétés d'*attiéké* (Djéni *et al.*, 2011) avec un pourcentage d'acide acétique moyen de 0,1 (Coulin *et al.*, 2006). Au cours de la conservation de l'*attiéké* à la température ordinaire entre 25 et 30 °C, son pH augmente tandis que son taux d'acidité diminue, résultats probables d'une fermentation de type acétique (Sotomey *et al.*, 2001). La quantité de matière sèche de l'*attiéké* préparé varie entre 49 % et 53,5 % constituée essentiellement d'amidon dont la teneur varie de 42,3 à 71,6 % (Sotomey *et al.*, 2001 ; Djéni *et al.*, 2011). La teneur en cendre calculée sur la base du poids sec est de 0,6 %. L'*attiéké* est caractérisée par une faible teneur en protéines brutes (1,9 %). Il renferme aussi des éléments minéraux dont le potassium (369,6 mg/100 g), le phosphore (172,7 mg/100 g), le magnésium (28,8 mg/100 g) et le calcium (26,1 mg/100 g). Le rapport calcium/phosphore égal à 0,15 est insuffisant pour permettre une bonne assimilation du calcium par l'organisme. L'*attiéké* est donc un aliment essentiellement énergétique (Sotomey *et al.*, 2001). Le potentiel cyanogène moyen de l'*attiéké* fraîchement préparé est de 0,40 mg/100 g d'*attiéké* fraîchement préparé. Il varie de 0,4 à 0,93 mg/100 g d'*attiéké* fraîchement préparé pour l'*attiéké* Garba et se situe dans la limite tolérée de 1 mg/100 g pour la farine de manioc recommandées par le *Codex Alimentarius* (Heuberger, 2005).

### 2.2.6. Caractéristiques microbiologiques de l'*attiéké* et risque de toxi-infection pour le consommateur

L'*attiéké* fraîchement préparé ne contient pas de coliformes, de moisissures, de *Escherichia coli*, de *Salmonella* sp et de spores d'anaérobies sulfite-réducteurs (Sotomey *et al.*, 2001 ; Djéni *et al.*, 2011). Il contient en outre des levures, des entérocoques de charges moyennes respectivement de  $3,5 \times 10^1$  UFC/g et  $5,9 \times 10^1$  UFC/g d'*attiéké*. De faibles quantités de germes aérobies mésophiles avec des charges variant entre  $9 \times 10^1$  et  $3,4 \times 10^3$  UFC/g d'*attiéké* y sont également trouvées. Malgré la présence de ces germes, l'*attiéké* fraîchement préparé est de qualité microbiologique satisfaisante selon Djéni *et al.* (2011). Cependant, Kouamé *et al.* (2012) ont rapporté dans l'*attiéké* en vente, des charges en spores de *Bacillus* spp. variant de  $2,7 \pm 0,4 \times 10^2$  à  $2,9 \pm 0,01 \times 10^4$  UFC/g.

Les conditions de conservation à la température ambiante (25 à 30 °C) favorisent la prolifération des germes contaminants, entraînant l'altération de la qualité de l'*attiéké* seulement après trois jours de conservation dans des emballages en plastiques (**Djéni et al., 2011**). La basse acidité de l'*attiéké* conservé et sa forte humidité (47 % en base humide) constituent donc un milieu favorable au développement des microorganismes. Ainsi, au cours de la conservation et de la vente, l'*attiéké* est le plus souvent contaminé par les levures, les moisissures, les germes aérobies mésophiles, les coliformes totaux, les coliformes thermotolérants, *Staphylococcus aureus* et les spores de *Bacillus* spp (**Sotomey et al., 2001 ; Djéni et al., 2011 ; Kouamé et al., 2012**). Les germes qui contaminent le plus l'*attiéké* sont les levures et les moisissures. Ces germes sont capables de se développer dans l'*attiéké* et altérer sa qualité marchande (**Djéni, 2009**). L'altération des qualités organoleptiques telles que la saveur, l'arôme et la couleur de l'*attiéké* devient remarquable dès le troisième ou le quatrième jour de conservation à la température ambiante. Par conséquent, l'*attiéké*, après trois jours de conservation à la température ambiante devient de qualité microbiologique insatisfaisante (**Djéni, 2009**). La présence de certaines bactéries (*Enterococcus*, Coliformes totaux, Coliformes thermotolérants, *Staphylococcus aureus* et les spores de *Bacillus* spp) et champignons (levure et moisissure) permet de déduire que l'*attiéké* vendu à Abidjan peut être considéré comme réservoir de microorganismes pathogènes pour l'homme (**Kouamé et al., 2012**) parmi lesquels, les espèces du groupe *Bacillus cereus*.

### 3. GÉNÉRALITÉS SUR LE GROUPE *BACILLUS CEREUS*

#### 3.1. Genre *Bacillus*

Le genre *Bacillus* appartient à la famille des *Bacillaceae*. C'est un genre bactérien particulièrement hétérogène. L'hétérogénéité extrême du genre est reflétée par la grande variété de places écologiques que les nombreuses espèces occupent et par l'extrême diversité de leurs statuts taxonomiques. Ce sont des bacilles à Gram positif, ou Gram variable, aérobies mais optionnellement aéro-anaérobies facultatifs (**Jay et al., 2005**). La forme végétative mesure de 2 à 5 µm de long sur 1 à 2 µm de diamètre. Ce sont des bactéries sporulées (**Dromigny, 2008**). La teneur en G + C de l'ADN des espèces varie de 32 à 69 %, ce qui est beaucoup plus large que ce qui est considéré comme raisonnable pour la définition d'un genre (**TSCA, 1997**).

*Bacillus cereus* et les genres apparentés ont subi d'énormes changements taxonomiques. Ces microorganismes se répartissent actuellement en 56 genres et 545 espèces (Logan et Halket, 2011).

### 3.2. Groupe *Bacillus cereus*

L'expression « groupe *Bacillus cereus* » est en fait une nomenclature considérée comme empirique et non-taxonomique (Vilas-Boas *et al.*, 2002), mais elle est de plus en plus utilisée par plusieurs auteurs (Rasko *et al.*, 2005 ; Carlin *et al.*, 2006 ; Guinebretiere *et al.*, 2008). Les espèces du groupe *Bacillus cereus* appartiennent au genre *Bacillus*. Le groupe *Bacillus cereus* comprend six espèces génétiquement très proches formant des endospores (Rasko *et al.*, 2005 ; Guinebretiere *et al.*, 2008) correspondant à *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus sensu stricto*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoïdes*, *Bacillus thuringiensis* et *Bacillus weihenstephanensis*. Ce sont des bacilles assez volumineux, mesurant de 1 à 1,8 µm de diamètre par 4 à 8 µm de long, produisant habituellement des chaînes courtes. Les extrémités des cellules adjacentes des chaînes courtes sont à angles droit. En revanche, les extrémités libres des bacilles sont arrondies. Ce sont des bacilles à coloration de Gram positif, sporogènes, aéro-anaérobies facultatives, produisant une catalase et mobiles par ciliature péritriche sauf *B. anthracis* qui est immobile (Dromigny, 2008).

Malgré leur proximité génétique, les relations phylogénétiques et taxonomiques précises des membres du groupe *B. cereus*, restent encore controversées car les caractéristiques phénotypiques sont instables (Helgason *et al.*, 2004 ; Van der Auwera *et al.*, 2007). La classification des bactéries de ce groupe était initialement basée sur des caractères phénotypiques tels que la formation d'inclusions cristallines parasporales composées de protéines insecticides chez *B. thuringiensis* et la présence de capsule chez *B. anthracis*.

À l'intérieur du groupe, trois bactéries, *B. anthracis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* ont une telle proximité génétique qu'elles sont considérées comme appartenant à une seule « espèce » dénommée *Bacillus cereus sensu lato* (Rasko *et al.*, 2005). En effet, les principales différences entre ces espèces sont basées sur leurs facteurs de virulence, codés par des gènes qui sont portés par des plasmides. En outre, certains de ces plasmides peuvent être échangés entre les membres du groupe *B. cereus* (Thomas *et al.*, 2000 ; Van Der Auwera *et al.*, 2007). Par conséquent, si une souche de *B.*

*thuringiensis* perd ses plasmides, elle devient indiscernable de *B. cereus sensu stricto*. Néanmoins, la pathogénicité de *B. anthracis* et l'utilisation de *B. thuringiensis* comme agent de lutte biologique en agriculture ont pris le dessus sur les considérations taxonomiques. Ces espèces sont par conséquent toujours considérées comme séparées.

Une division du groupe *B. cereus* en sept grands groupes phylogéniques (I-VII), basés sur les habitats, les limites de températures et les pouvoirs pathogènes a été proposée par **Guinebretiere et al. (2008)**. Dans cette classification, les espèces sont classées par profil thermique de croissance puis par leur cytotoxicité. Les souches impliquées dans des cas de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sont regroupées majoritairement dans les groupes III, IV et VII (**tableau 4**). Les souches psychrotrophes du groupe VI n'ont pas été associées à des TIAC et possèdent un faible potentiel cytotoxique *in vitro* (**Cadot et al., 2010**). Un nombre extrêmement faible des souches du groupe VI pourrait héberger des gènes similaires à ceux impliqués dans la synthèse du céréulide (toxine émétique). Il est donc conseillé d'effectuer le test de polymérisation en chaîne (PCR) décrit par **Ehling-Shulz et al. (2005)** pour s'assurer de l'innocuité de la souche. Ces gènes portés par un plasmide, pourraient être transférés d'une souche vers une autre (**Thorsen et al., 2006**). Il existe donc un risque d'émergence de souches productrices de toxine (s) et capables de s'adapter aux températures de réfrigération. De plus, le groupe VII fait en réalité référence à une nouvelle espèce appelée « *B. cytotoxicus* » (**Lapidus et al., 2008 ; Carlin et al., 2009**). Ainsi, cette nouvelle façon de faire révèle la complexité du groupe *Bacillus cereus* et démontre qu'une espèce peut être présente dans plusieurs groupes à la fois.

### 3.2.1. *Bacillus anthracis*

Sur le plan de l'étymologie, l'espèce *anthracis* vient du grec *anthrax* (le charbon) à cause de la maladie du charbon et des lésions noirâtres qu'elle provoque (**Dromigny, 2008**). *Bacillus anthracis* se distingue des autres membres du groupe *B. cereus* par son absence de mobilité, sa production de capsule, sa sensibilité à la pénicilline et son absence d'activité hémolytique (**Vilas-Boas et al., 2007**). Les spores de *B. anthracis* sont très résistantes aux conditions environnementales défavorables et sont capables de survivre dans les sols contaminés pendant de longues périodes (**Mock et Fouet, 2001**). Cet agent pathogène est responsable de l'anthrax, la maladie du charbon qui affecte les animaux, particulièrement les herbivores mais aussi les humains. La maladie se présente sous trois formes distinctes : pulmonaire, gastro-intestinale et cutanée. La forme pulmonaire contractée par inhalation est la plus sévère. La mort survient deux à trois jours après le

début de l'infection et la létalité avoisine les 90 % des cas humains (**Spencer, 2003**). Dans le cas de la maladie cutanée, l'infection se produit soit par pénétration de l'agent pathogène dans l'organisme lors de coupures ou de petites lésions cutanées, soit par contact avec des produits animaux contaminés (cuir) ou encore par contact direct avec des animaux infectés. La forme gastro-intestinale survient après ingestion de la viande mal cuite, provenant d'animaux ayant été contaminés par *B. anthracis*. Elle se traduit par une inflammation du tube digestif et provoque des nausées, des vomissements ainsi que des crampes d'estomac. Cette forme de l'anthrax est très rare, mais peut être fatale.

La virulence de *B. anthracis* est associée à deux grands plasmides : pXO1 et pXO2 (**Dromigny, 2008**). Le plasmide pXO1 contient les gènes *lef*, *cya*, et *pag* qui codent respectivement l'antigène protecteur (PA), le facteur létal (PF) et le facteur oedématogène (EF). La combinaison de ces composants forme la toxine oedématogène (PAEF) et la toxine létale (PA-LF). Le plasmide pXO2 contient les gènes *capA*, *capB*, et *capC*, nécessaires à la formation de la capsule. La présence de ces deux plasmides est nécessaire pour une virulence totale de la bactérie (**Dromigny, 2008; Wahab et al., 2005**).

**Tableau 4** : Nouvelle classification du groupe *Bacillus cereus*

Groupes phylogéniques	Espèces du groupe <i>Bacillus cereus</i>	Profils thermiques de croissance	Cytotoxicité
Groupe I	<i>B. pseudomycoïdes</i>	Mésophiles (de 10 à 43 °C)	Aucune observée
Groupe II	<i>B. cereus II</i>	Psychrotolérantes	Toxines diarrhéiques
Groupe III	<i>B. thuringiensis II</i>	(de 7 à 40 °C)	Toxines diarrhéiques et émétiques Anthrax
	<i>B. cereus III</i>	Mésophiles	
	<i>B. thuringiensis III</i>	(de 15 à 45 °C)	
Groupe IV	<i>B. anthracis</i>	Mésophiles (de 10 à 45 °C)	Toxines diarrhéiques
	<i>B. cereus IV</i>		
Groupe V	<i>B. thuringiensis IV</i>	Mésophiles intermédiaires (de 8 à 40 °C)	Toxines diarrhéiques
	<i>B. cereus V</i>		
Groupe VI	<i>B. weihenstephanensis</i>	Psychrotolérantes	Aucune observée
	<i>B. mycoïdes,</i>	(de 5 à 37 °C)	
	<i>B. thuringiensis VI</i>		
Groupe VII	<i>B. cytotoxicus</i>	Thermotolérantes (de 20 à 50 °C)	Toxines diarrhéiques

Source : **Guinebretiere et al. (2008)**

### 3.2.2. *Bacillus cereus sensu stricto*

Le mot *cereus* vient de l'adjectif latin *cereus* (qui ressemble à la cire) à cause de la morphologie des colonies de *Bacillus cereus sensu stricto* formées sur les géloses. Les spores de *B. cereus sensu stricto* sont très résistantes aux conditions défavorables telles que la chaleur, la déshydratation, le dessèchement, ainsi qu'aux désinfectants et agents de nettoyage. Elles sont hautement hydrophobes, adhèrent facilement aux équipements et sont difficiles à éliminer. En plus de l'hydrophobicité, la présence d'exosporium et d'appendices de 0,45 à 3,8 µm en longueur contribueraient à la persistance des spores sur les équipements de traitement des denrées alimentaires et également à la formation de biofilm (**Granum, 2007 ; Ankolekar et Labbé, 2010**). *Bacillus cereus sensu stricto* est un pathogène opportuniste pour les humains et les animaux. Il est responsable d'infections et surtout de toxi-infections alimentaires décrites chez l'homme et les animaux.

### 3.2.3. *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* est une bactérie ubiquiste, d'origines diverses telles que le sol, les insectes, les excréments d'animaux végétariens, les produits végétaux entreposés ainsi que les habitats aquatiques (**Dromigny, 2008**). C'est un agent pathogène des insectes. L'énorme succès biotechnologique de ce pathogène réside dans sa capacité à produire des inclusions cristallines protéiques ( $\delta$ -endotoxines) nommées « protéine Cry », au cours de la sporulation qui sont utilisées comme pesticides biologiques et du développement des plantes résistantes aux insectes transgéniques (**Bravo et al., 2007 ; Sauka et Benintende, 2008**). *B. thuringiensis* possède des similarités phénotypiques avec *B. cereus sensu stricto* incluant la mobilité, l'activité hémolytique, la résistance à l'ampicilline. La seule caractéristique qui permet de différencier ces deux espèces est la présence d'inclusions cristallines protéiques chez *B. thuringiensis*. Compte tenu de la similarité taxonomique de *B. thuringiensis* et de *B. cereus sensu stricto*, certaines infections alimentaires généralement attribuées à *B. cereus sensu stricto* auraient pu être causées par *B. thuringiensis* (**Rosenquist et al., 2005**). Des toxi-infections occasionnelles impliquant *B. thuringiensis* ont par ailleurs été rapportées (**Jackson et al., 1995**).

### 3.2.4. *Bacillus mycoides* et *Bacillus pseudomycoides*

Pour *Bacillus mycoides*, *mukes* signifie en grec un champignon et *oides* la forme. Cette nomenclature fait référence à l'aspect des colonies. *Bacillus pseudomycoides* est une bactérie proche de *Bacillus mycoides* (un « faux » *mycoides*). Sa nomenclature a été validée par

Nakamura (**Nakamura, 1998**). Ces deux bactéries se distinguent des autres membres du groupe par l'aspect particulier de leurs colonies rhizoïdes sur le milieu nutritif solide (**Nakamura, 1998**). Elles peuvent être isolées à partir du sol, de la boue et des rhizosphères. Elles se différencient de *B. cereus sensu stricto* par l'apparence rhizoïde de leurs colonies et par leur composition en acides gras. Cependant, des souches de *B. mycoides* ne présentant pas des colonies rhizoïde ont été identifiées (**Jensen et al., 2003**). Contrairement à la plupart des membres du groupe *B. cereus*, *B. mycoides* et *B. pseudomycoides* ne sont jusqu'à présent pas encore reconnus comme des agents pathogènes pour l'homme (**Guinebretiere et al., 2008**).

### 3.2.5. *Bacillus weihenstephanensis*

L'espèce *weihenstephanensis* fait référence à *Freising-Weihenstephan*, une ville allemande. Sa nomenclature a été validée en 1998 (**Lechner et al., 1998**). *Bacillus weihenstephanensis* est psychrotolérant. Plusieurs études concernant les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* ont été rapportées (**Pacova et al., 2003**). L'espèce *B. weihenstephanensis* a été initialement proposée par **Lechner et al. (1998)** pour désigner des souches du groupe *B. cereus*, capables de se développer entre 4 et 7 °C mais pas à 43 °C. Malgré ces différences, l'existence d'une espèce distincte de *B. weihenstephanensis* est controversée. **Guinebretiere et al. (2008)** ont montré que les espèces du groupe *B. cereus* peuvent être subdivisées en sept grands groupes génétiques (I à VII) sur la base de limites de température. Ainsi, les souches psychrotolérantes sont réparties en deux différents groupes (II et VI) selon ces auteurs. Cette division montre que toutes les souches de *B. weihenstephanensis* sont psychrotolérantes, mais toutes les souches psychrotolérantes du groupe *B. cereus* ne sont pas nécessairement des *B. weihenstephanensis* (**Stenfors et Granum, 2001**). Cette distinction soulève une question de discrimination des deux types de psychrotolérants. *B. weihenstephanensis* n'a pas encore été détecté dans des denrées impliquées dans une toxi-infection alimentaire, malgré son isolement à partir de différents produits alimentaires (**Carlin et al., 2009**). Ce constat n'est cependant pas le cas des psychrotolérants du groupe II. La structure génétique du groupe *B. cereus* regroupe donc au sein d'un même groupe phylogénétique, des souches appartenant à des espèces différentes mais partageant le même domaine de température de croissance (**Guinebretiere et al., 2008**).

### 3.3. Écologie du groupe *Bacillus cereus*

#### 3.3.1. Réservoirs primaires

Le sol est considéré comme le réservoir primaire du groupe *Bacillus cereus* (Vilain *et al.*, 2006). Un gramme de sol peut contenir de  $10^3$  à  $10^5$  spores de *B. cereus* (Christiansson *et al.*, 1999 ; Guinebretiere et Nguyen-the, 2003). Selon Vilain *et al.* (2006). Le groupe *B. cereus* est capable de se développer et d'avoir un cycle de vie dans le sol. Il est largement distribué dans l'environnement et possède plusieurs habitats. Outre le sol, les intestins des insectes, des invertébrés et des rongeurs pourraient également constituer des niches naturelles du groupe *B. cereus* (Margulis *et al.*, 1998 ; Jensen *et al.*, 2003 ; Swiecicka *et al.*, 2006). Les espèces du groupe *B. cereus* sont très répandues dans la nature et sont notamment retrouvées dans les fourrages pour animaux (Vaerewijck *et al.*, 2001 ; Magnusson, 2007) et dans les fèces de bovins (Slaghuis *et al.*, 1997).

#### 3.3.2. Présence du groupe *Bacillus cereus* dans les aliments

Le groupe *Bacillus cereus* peut être considéré comme un indicateur d'une contamination tellurique ou environnementale non maîtrisée par les traitements technologiques. Les contaminations des aliments par le groupe *B. cereus* sont associées à diverses sources en amont, en particulier l'environnement agricole et l'environnement industriel (Carlin, 2011). La présence du groupe *B. cereus* dans ces environnements entraîne ensuite la contamination des matières premières (Guinebretiere *et al.*, 2003) et des trayons des vaches laitières contaminant eux-mêmes le lait cru (Vissers *et al.*, 2007). Par sa capacité d'adhésion et de résistance, le groupe *Bacillus cereus* est capable de contaminer et de persister dans l'environnement agroalimentaire (Dromigny, 2008). Il produit des spores thermorésistantes qui survivent aux opérations de chauffage (pasteurisation) ou de déshydratation dans l'industrie alimentaire. En raison de son caractère hydrophobe, il peut former ou initier des biofilms durant les étapes du processus et se retrouver dans des équipements industriels, tout au long de la chaîne de fabrication et dans des échangeurs de chaleur (Scheldeman *et al.*, 2005 ; Oomes *et al.*, 2007 ; Scott *et al.*, 2007). Les emballages, l'air et l'eau sont également considérés comme d'éventuelles sources de contamination et de ré-contamination par le groupe *B. cereus* après pasteurisation (Eneroth *et al.*, 1998 ; Pirttijarvi *et al.*, 2000). Certaines souches du groupe *B. cereus* (psychrotrophes) sont capables de croître à des températures basses allant de 10 à 4 °C. Une conservation prolongée au réfrigérateur de produits et denrées traités par la chaleur entraîne en outre, une croissance spécifique des souches psychrotolérantes. D'autres souches thermorésistantes peuvent se

développer à des températures aussi élevées que 55 °C et se multiplier rapidement au cours du refroidissement des aliments traités thermiquement. Par conséquent, les denrées alimentaires chauffées telles que les produits laitiers pasteurisés, les plats de riz chinois et les REPFED's (Refrigerated Processed Foods of Extended Durability) dont font partie les préparations réfrigérées précuites et les repas prêts à consommer (**Wijnands et al., 2006**), les produits déshydratés tels que l'alimentation pour nourrissons, les épices et aromates, les soupes et champignons déshydratés, le riz, les céréales et les pâtes de même que les soupes, les œufs, l'*attiéké*, les ingrédients, les fruits et légumes préemballés, dont les graines germées, constituent des produits à haut risque (**Guinebretiere et Sanchis, 2003; Iurlina et al., 2006 ; Reyes et al., 2007 ; Witkowska et al., 2011 ; Kouamé et al., 2012**). En somme, le groupe *B. cereus* est ubiquiste du sol et leur présence dans la plupart des aliments crus apparaît comme inévitable. Ce qui complexifie l'identification du ou des cycles de contamination du groupe *B. cereus*.

### **3.4. Pathologies liées au groupe *Bacillus cereus***

Très largement répandu dans la nature, le groupe *B. cereus* se comporte comme un pathogène opportuniste responsable d'infections systémiques et locales. Il est également responsable de toxi-infections alimentaires.

#### 3.4.1. Atteintes non gastro-intestinales

Des infections non gastro-intestinales causées par le groupe *B. cereus* ont été rapportées avec une fréquence en augmentation, peut-être en raison d'une conscience croissante du potentiel pathogène de ces microorganismes. Le groupe *B. cereus* a été identifié comme agent de cas graves de septicémies, d'endocardites, de pneumonies, d'infections cutanées, d'infections orthopédiques, de méningites et d'infections de blessures traumatiques, en majorité chez des individus immunodéprimés. *B. cereus sensu stricto* peut être responsable, bien que rarement, de mammites chez les bovins et d'avortements chez les bovins et ovins (**EFSA, 2005**).

#### 3.4.2. Toxi-infections alimentaires au groupe *Bacillus cereus*

Une toxi-infection est par définition une maladie causée par l'ingestion d'aliments contaminés par certains agents infectieux ou d'aliments dans lesquels la toxine est préformée. Dans les cas d'intoxication, la pathologie n'est pas due à la prolifération d'un microorganisme

dans l'aliment mais à l'ingestion d'une toxine sécrétée par la bactérie et préformée dans l'aliment avant son ingestion.

Une toxi-infection alimentaire collective (TIAC) est définie comme l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont la cause peut être rapportée à une même origine alimentaire. Il n'est pas facile d'identifier les souches du groupe *B. cereus*, capables de causer le syndrome diarrhéique de même que leur incidence dans les aliments. Cependant, toutes les souches présentes dans les aliments peuvent ne pas être en mesure de provoquer des diarrhées. Les souches pathogènes du groupe *B. cereus* sont responsables de toxi-infections alimentaires se présentant sous deux formes : une forme diarrhéique, provoquant des crampes abdominales et une diarrhée profuse, et une forme émétique, déterminant de fortes nausées et des vomissements (Esbelin, 2009).

Dans les deux cas, il s'agit d'une infection opportuniste bénigne à résolution spontanée, le plus souvent dans les 24 heures. Cependant, si l'intoxication survient chez un sujet immunodéprimé, il peut y avoir dissémination bactérienne (Granum, 2007). Les toxi-infections alimentaires liées aux espèces du groupe *B. cereus* sont le plus souvent associées à une population égale ou supérieure à  $10^5$  à  $10^8$  UFC/g ou UFC/L d'aliments consommés, bien que des épidémies associées à des aliments contenant  $10^3$  UFC/g aient été décrites (Arnesen et al., 2008). Toutes les souches du groupe *B. cereus* n'ont pas la même capacité à provoquer des symptômes diarrhéiques, certaines étant même utilisées comme probiotiques (Hoa et al., 2000, Kniehl et al., 2003). De nombreux cas de toxi-infections alimentaires dans le monde ont été attribués à *B. cereus sensu stricto* (Mahler et al., 1997; Dierick et al., 2005 ; Shiota et al., 2010 ; Naranjo et al., 2011). Les méthodes d'analyse standard (ISO 7932 et 21871) pour la détection et le dénombrement du groupe *B. cereus* ne permettent pas de distinguer *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. weihenstephanensis*. De ce fait, les données d'incidence de *B. cereus* dans les aliments, ainsi que les rapports d'intoxication alimentaire mettant en cause *B. cereus sensu stricto*, peuvent concerner les trois espèces (EFSA, 2005).

#### 3.4.2.1. Syndrome émétique

Le syndrome émétique est généralement associé à la consommation d'aliments farineux tels que les nouilles, les pâtes, le riz ainsi que les préparations à base de riz. Il est caractérisé par des nausées et des vomissements, qui se manifestent entre 1 à 5 h après ingestion de l'aliment contaminé (EFSA, 2005). La rapidité de l'apparition des symptômes suggère que la toxine est préformée dans l'aliment (Agata et al., 2002 ; Ehling-Schulz et al.,

2004). L'agent responsable du syndrome émétique est un petit dodecadepsipeptide cyclique : le céréulide. La dose de céréulide suffisante pour provoquer des symptômes émétiques serait de l'ordre de 5 à 10 µg/kg de masse corporelle (EFSA, 2005), selon des essais sur singe et d'après l'analyse d'aliments impliqués dans des intoxications alimentaires chez l'Homme. Une telle quantité de céréulide peut être retrouvée dans les aliments lorsqu'une souche du groupe *B. cereus* atteint une concentration supérieure ou égale à 10<sup>5</sup> UFC/g. Aucune courbe dose-réponse n'a été établie pour *B. cereus sensu lato* et pour le céréulide. Compte tenu de sa résistance, cette toxine émétique n'est détruite ni par la cuisson, ni par les enzymes digestives. Le syndrome émétique est généralement peu sévère et ne dure pas plus de 24 heures (Dromigny, 2008). Cependant, des cas d'intoxications graves, voire létales ont été rapportés ces dernières années en Europe et en Asie (Mahler *et al.*, 1997; Dierick *et al.*, 2005 ; Shiota *et al.*, 2010 ; Naranjo *et al.*, 2011).

#### 3.4.2.2. Syndrome diarrhéique

Le syndrome diarrhéique est la forme la plus anciennement diagnostiquée des infections provoquées par les espèces du groupe *B. cereus*. Les premiers incidents, entraînant une hospitalisation de 300 personnes, furent décrits dès 1906. Une souche de *B. peptonificans* ayant toutes les caractéristiques de *B. cereus* actuel avait été identifiée. C'est en 1950 que *B. cereus* a véritablement été associé pour la première fois à une intoxication alimentaire de type diarrhéique (Dromigny, 2008). Le syndrome diarrhéique est caractérisé par des douleurs abdominales, une diarrhée et occasionnellement des nausées et vomissements. Le syndrome diarrhéique dû au groupe *B. cereus* rappelle les accidents dus à *Clostridium perfringens*. Les symptômes apparaissent 8 à 16 heures après l'ingestion d'aliments contenant un nombre élevé de *B. cereus*, environ 10<sup>5</sup> à 10<sup>9</sup> cellules/spores par gramme d'aliment. Les symptômes disparaissent en moins de 24 à 48 heures (Dromigny, 2008). En pratique, aucun traitement antibiotique n'est administré, car le syndrome diarrhéique est considéré comme une maladie bénigne (Dromigny, 2008).

Le consommateur peut être exposé soit à des spores de *B. cereus*, soit à des formes végétatives ou à la combinaison des deux, en fonction du type d'aliment consommé ou du traitement subi par l'aliment. Selon Dromigny, (2008), la forme sous laquelle *B. cereus* est ingéré peut avoir un effet sur la production de la toxine dans l'intestin grêle.

Quatre entérotoxines sont proposées comme étant la cause des symptômes diarrhéiques : HBL et NHE qui sont des entérotoxines à trois composantes, BceT et CytK qui sont des protéines cytotoxiques (Michelet et Mahillon, 2003; Granum, 2007).

### 3.5. Importance du groupe *Bacillus cereus* dans les toxi-infections alimentaires

Plusieurs pays ont enregistré des cas d'intoxication liés à l'ingestion des espèces du groupe *Bacillus cereus*. En effet, les États-Unis et l'Angleterre ont enregistré 235 cas (MMWR, 2013) et 130 cas (HPA, 2011) respectivement dans la même période de 1998 à 2008. En Europe, 124 (2,2 %) des cas d'intoxication dus à l'ingestion de *Bacillus* spp. ont été rapportés pour 11 pays membres de l'Union Européenne en 2009 (FSAI, 2011).

En France, cette bactérie est considérée comme la troisième cause (17 % des cas) de TIAC (Delmas *et al.*, 2010).

En Afrique, à Bizerte en Tunisie, *B. cereus* a été suspecté dans deux cas de toxi-infection alimentaire selon les symptômes en 2010-2011 (Anonyme 1, 2011). En outre, certains travaux ont identifié des souches de *Bacillus cereus* à partir d'aliments incriminés dans les intoxications surtout au Maroc (Merzougui *et al.*, 2014) et en Tunisie (Aouadhi *et al.*, 2013). Par ailleurs, Al-Abri *et al.* (2011) ont isolé des souches de *Bacillus cereus* incriminés dans des TIAC à Oman (Moyen-Orient). Par contre, en Côte d'Ivoire, aucun cas d'intoxication associé au groupe *B. cereus* n'a été déclaré à ce jour. Mais, Kouamé *et al.* (2012) ont isolé des spores de *B. cereus* dans l'*attiéké* commercial produit dans le sud de la Côte d'Ivoire.

### 3.6. Pouvoir pathogène de *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* est reconnu comme un pathogène du groupe de risque 2. Il représente un risque pour la santé des êtres humains s'il est suffisamment nombreux. C'est un pathogène qui peut causer des maladies, mais en temps normal, ne devrait pas constituer un danger pour l'homme. Il représente une situation qui pourrait avoir sur la santé de l'homme des répercussions indésirables temporaires, sans menacer leur vie. La probabilité de répercussions indésirables graves est jugée éloignée. *Bacillus cereus* peut aussi être associé à la présence d'un indicateur de contamination tel que *Escherichia coli* (Anonyme 2, 2011).

*Bacillus cereus* tire son pouvoir pathogène de sa capacité d'adaptation aux conditions environnementales et de sa capacité à sécréter des toxines. Alors que le syndrome émétique a pour agent étiologique une toxine unique, le syndrome diarrhéique est probablement causé par la combinaison et l'action synergique de plusieurs toxines et enzymes de dégradation (Arnesen *et al.*, 2008).

### 3.6.1. Toxine émétique

Le céréulide est la toxine responsable du syndrome émétique. Le céréulide est un dodecadepsipeptide cyclique ([D-O-Leu-D-Ala-L-O-Val-L-Val]<sub>3</sub>) c'est-à-dire qu'il est composé de l'alternance de douze acides aminés et esters (Agata *et al.*, 1994). Il est produit à partir d'une charge microbienne de 10<sup>5</sup> UFC/g de produit (EFSA, 2005). Le céréulide est extrêmement stable et résiste à une large gamme de pH compris entre 2 et 11, à des hautes températures (121°C pendant 15 min) ainsi qu'à des traitements à la trypsine ou à la pepsine ; ce qui lui permet de ne pas être détruit par l'acide gastrique, par les enzymes protéolytiques du tractus intestinal ainsi que par la cuisson des aliments (Agata *et al.*, 1994 ; Shinagawa *et al.*, 1996). C'est le gène *ces* qui est responsable de la production du céréulide. Le céréulide est produit dans l'aliment avant sa consommation et il s'agit d'une véritable intoxication. Sa synthèse ne résulte pas de l'expression d'un gène mais de l'assemblage enzymatique de sous-unités par une peptide synthétase codée par les gènes *ces* portés par un plasmide (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). De structure semblable à la valinomycine produite par *Streptomyces tsusimaensis*, le céréulide agit en provoquant la formation d'un canal ionophore au travers de la membrane des mitochondries, ce qui bloque la phosphorylation oxydative des acides gras (Mikkola *et al.*, 1999). Le céréulide stimule le nerf vague ou pneumogastrique et provoque le vomissement (Agata *et al.*, 1995). Il provoque aussi des lésions réversibles du foie et est toxique pour les cellules NK (Natural Killer ; Shinagawa *et al.*, 1996).

### 3.6.2. Entérotoxines

#### 3.6.2.1. Hémolysine BL

La première entérotoxine décrite est l'hémolysine BL (Hbl: H pour hémolysine, B pour binding component et L pour lytic component). Cette entérotoxine est un métabolite produit pendant la croissance végétative de la bactérie, à mi-chemin de la phase exponentielle de croissance, avec un maximum à la fin de cette phase. Elle est composée de trois sous-unités comprenant deux composants lytiques L2 et L1 codés respectivement par les gènes *hblC* et *hblD* et la protéine de liaison B codée par le gène *hblA*. Un quatrième composant HblB', dont la fonction est inconnue, codé par le gène *hblB'*, est produit chez la souche ATCC 14579 (Clair *et al.*, 2010). L'entérotoxine Hbl est une toxine hémolytique, cytotoxique, dermonécrotique. Elle entraîne une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'établissement du syndrome diarrhéique par cette toxine a été montré *in vitro* par l'accumulation de liquide dans une anse iléale de lapin ligaturée (Beecher et Wong, 2000). L'interaction des trois sous-unités est nécessaire pour la formation de pores

transmembranaires et le ratio optimal des composants L2, L1 et B requis pour une cytotoxicité maximale est de 1:1:1. Chacun des composants de l'entérotoxine Hbl est sécrété via le système Sec et se lie à la membrane cellulaire de manière indépendante. Cependant, les composants L2 et L1 présentent une vitesse de fixation plus rapide que le composant B (Beecher et Wong, 2000 ; Fagerlund *et al.*, 2010). L'alignement des séquences en acides aminés montre 20 à 24 % d'identité entre les composants L2, L1 et B. De plus, l'analyse structurale de ces protéines indique qu'elles sont presque entièrement constituées d'hélices alpha. Enfin, plusieurs souches de *B. cereus* présentent plusieurs copies des gènes *hbl* dans leur génome. Toutes ces données suggèrent que les gènes *hbl* résultent de la duplication d'un gène ancestral commun.

### 3.6.2.2. Entérotoxine non-hémolytique

L'entérotoxine non-hémolytique (Nhe) se présente également sous la forme d'un complexe protéique tripartite codé par l'opéron *nheABC* (Granum *et al.*, 1999). Elle est constituée d'un composant NheA codé par le gène *nheA*, d'un composant NheB codé par le gène *nheB* et d'un composant NheC codé par le gène *nheC* (Granum *et al.*, 1999; Moravek *et al.*, 2004). Cet opéron est systématiquement retrouvé chez les souches du groupe *B. cereus* isolées de TIAC (Guinebretiere *et al.*, 2008). L'entérotoxine Nhe est aussi cytotoxique que l'entérotoxine Hbl, mais elle est non hémolytique. L'activité cytotoxique maximale est observée sur les cellules épithéliales (cellules Vero) lorsque le ratio molaire entre NheA, NheB et NheC est de 10:10:1 respectivement (Lindbäck *et al.*, 2004). Un excès de NheC inhibe la fixation de NheB et réduit l'activité cytotoxique. La faible quantité de NheC par rapport à celle de NheA et NheB est due à la présence d'un atténuateur de transcription situé en amont du gène *nheC*. Cet atténuateur de transcription stoppe la transcription 9 fois sur 10. De plus, un ordre de fixation des trois composés sur les cellules épithéliales doit être respecté afin de conserver l'activité cytotoxique. L'entérotoxine NheA n'a pas la capacité de se lier directement aux cellules cibles. Les entérotoxines NheB et NheC qui présentent une région hydrophobe sont responsables de l'adhérence de l'entérotoxine aux cellules cibles (Lindbäck *et al.*, 2004 ; 2010). Les composants de l'entérotoxine Nhe présentent des homologies entre eux mais aussi avec les composants de Hbl. L'entérotoxine NheB est identique à 44 % à NheC. Les pourcentages d'identité entre l'entérotoxine NheB et L1 puis l'entérotoxine NheC et B sont 37 % et 25 % respectivement. Ces données supposent une origine commune entre les gènes *hbl* et *nhe*.

### 3.6.2.3. Cytotoxine K

La cytotoxine K, codée par le gène *cytK*, a été isolée en 1998 chez une souche du groupe VII de *B. cereus sensu lato* (NVH391/98) qui a provoqué une toxi-infection alimentaire ayant causé la mort de trois personnes dans une maison de retraite française (**Lund et al., 2000**). Cette cytotoxine de 34 kDa appartient à la famille des "toxines formant des pores bêta-barrel". Elle est nécrotique, hémolytique et cytotoxique pour l'épithélium intestinal (**Hardy et al., 2001**). Deux variants du gène *cytK* ont été caractérisés : (i) le gène *cytK-1* correspondant au variant original, présent chez toutes les souches du groupe VII et (ii) le gène *cytK-2* présent chez la majorité des souches des autres groupes (**Brillard et Lereclus, 2004**). Les séquences en acides aminés des protéines CytK-1 et CytK-2 sont à 89 % identiques. Cependant, il a été montré que la cytotoxine CytK-1 est cinq fois plus toxique que la cytotoxine CytK-2 sur cellules épithéliales de type Caco-2 et Vero (**Fagerlund et al., 2004**).

### 3.6.2.4. Entérotoxine T et entérotoxine FM

L'entérotoxine T de *B. cereus* (BceT), codée par le gène *bceT*, a une masse moléculaire de 41 kDa (**Agata et al., 1995**). Elle est cytotoxique pour les cellules Véro, entérotoxique, augmente la perméabilité capillaire, provoque une accumulation de liquide lorsqu'elle est administrée dans une anse iléique ligaturée de souris, mais n'est pas hémolytique. Cette entérotoxine est dépourvue de séquence signal et elle serait libérée qu'après une lyse des cellules bactériennes.

L'entérotoxine FM est constituée d'une seule sous-unité d'une masse moléculaire de 45 kDa. Cette entérotoxine semble identique à l'entérotoxine EntFM décrite par **Asano et al. (1997)** chez la souche FM1. Elle est inactivée par la trypsine, la pepsine, les pH acides et elle est thermolabile. Son pouvoir entérotoxique n'a cependant pas été démontré.

### 3.6.3. Autres facteurs de virulence

Les espèces du groupe *B. cereus* sécrètent d'autres facteurs qui leurs permettent par exemple de contourner le système immunitaire de l'hôte. *Bacillus cereus* peut produire une variété d'autres facteurs de virulence, regroupant des phospholipases spécifiques aux phosphatidylcholine et phosphatidylinositol, des sphingomyelinases, des collagénases, des protéines hémolytiques (céréolysine O, hémolysine II etc.) ou encore des protéases comme la métalloprotéase InhA1, qui confèrent à la bactérie la capacité d'échapper aux macrophages

---

(Beecher *et al.*, 2000; Gohar *et al.*, 2002; Pomerantsev *et al.*, 2003; Ramarao et Lereclus, 2005 ; Guillemet *et al.*, 2010).

### 3.7. Résistance aux antibiotiques

Les souches du groupe *B. cereus* sont résistantes aux antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, y compris les céphalosporines de troisième génération (Luna *et al.*, 2007; Park *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2012), mais sont sensibles à Chloramphénicol, à Clindamycine, à Vancomycine, à Ciprofloxacine, à Érythromycine, à Gentamycine, à Tétracycline et à Streptomycine (Luna *et al.*, 2007 ; Chaves *et al.*, 2011 ; Chon *et al.*, 2012).

### 3.8. Surveillance des bactéries du groupe *Bacillus cereus* dans les aliments

Les espèces du groupe *B. cereus* sont ubiquistes du sol et de l'environnement. Par conséquent leur présence dans les aliments est inévitable. Les traitements par la chaleur, à l'exception de l'appertisation, n'éliminent pas les spores dans les denrées alimentaires. Les spores sont présentes dans quasiment toutes les catégories d'aliments avant leur conservation, généralement en nombre trop peu élevé pour causer une toxi-infection alimentaire (TIA). Les risques pour la santé humaine pourraient provenir de contaminations initiales anormalement élevées. Cependant, ils sont dus le plus souvent à la multiplication de ce groupe de bactéries lors de l'exposition des aliments à des températures inappropriées. Elles peuvent se développer dans la plupart des aliments, entre 4 et 48 °C (55 °C pour quelques souches) dès lors que le pH et l'activité de l'eau (*aw*) sont favorables à leur croissance. Les mesures majeures de contrôle sont la maîtrise de la température et la mise en place d'un plan HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point). Une combinaison appropriée de la température et de la durée de conservation doit permettre de prévenir la croissance des bactéries du groupe *B. cereus* jusqu'à des charges ne dépassant pas les limites acceptables au stade de la consommation où la production de la toxine émétique n'est pas possible. Ceci devrait être vérifié par des analyses microbiologiques.

Les espèces du groupe *B. cereus* ne font pas l'objet de critères de sécurité des aliments selon la réglementation européenne. Toutefois, le règlement (CE) N° 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) N° 2073/2005 du 5 décembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, définit un critère d'hygiène des procédés pour les « présomptions de *B. cereus* » dans le cas des préparations en poudre pour nourrissons et pour les aliments diététiques en poudre destinés à des utilisations médicales spécifiques pour nourrissons âgés de plus de six mois

---

(**Communauté Européenne, 2007b**). En Côte d'Ivoire, la présence de spores de *B. cereus* fait l'objet de critère de fin de procédé de l'*attiéké* (**NI 484, 2013**).

### 3.9. Techniques d'isolement et d'identification du groupe *Bacillus cereus*

La méthode de référence officielle actuellement préconisée pour l'énumération du groupe *Bacillus cereus* est la norme NF EN ISO 7932 (**ISO 7932, 2004**) qui permet le dénombrement des souches présomptives de *B. cereus* revivifiable. Selon cette méthode, l'isolement et le dénombrement du groupe *B. cereus* à partir des aliments doivent se faire sur la gélose conventionnel MYP (Mannitol-Egg Yolk Polymyxine-Agar) ou gélose Mossel proposé par **Mossel et al. (1967)**.

La norme NF EN ISO 21871 (**ISO 21871, 2006**) est utilisée pour la recherche et le dénombrement de *B. cereus* présumé viable en petit nombre. La confirmation de l'identité des colonies nécessite l'observation des spores, la mise en évidence de l'hémolyse et de la mobilité ou une série de tests biochimiques. Les techniques de microbiologie « classique » ne permettent pas de différencier nettement *B. cereus sensu stricto* des autres *Bacillus* biochimiquement apparentés. Classiquement, à partir de cultures, c'est l'observation microscopique de la présence d'un cristal protéique qui permet de distinguer *B. thuringiensis* de *B. cereus sensu stricto*. Pour une identification plus sûre, des méthodes moléculaires ont été développées : MultiLocus Enzyme Electrophoresis (MLEE ; **Carlson et al., 1994; Helgason et al., 2000**), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP ; **Ticknor et al., 2001, Hill et al., 2004**), Repetive Extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction (rep-PCR ; **Cherif et al., 2003 ; Reyes-Ramirez et Ibarra, 2005**) et MultiLocus Sequence Typing (MLST ; **Helgason et al., 2004; Sorokin et al., 2006**).

La discrimination entre *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis*, *Bacillus mycoides* et *B. anthracis* en utilisant le gène *gyrB* a également été décrite (**Park et al., 2007**). Cependant, la différenciation des espèces de ce groupe demeure encore difficile. De plus, des méthodes de détection de *B. cereus* par PCR en temps réel ont été récemment développées. La recherche des entérotoxines connues peut être effectuée par plusieurs techniques dont le test ELISA, l'agglutination passive reverse (RPLA), l'immuno-diffusion ou encore par l'immunoélectrophorèse. Les techniques d'amplification par PCR sont plus utilisées pour caractériser le potentiel toxigène des différentes souches du groupe *B. cereus*, mais le polymorphisme des gènes rend difficile leur application sur toutes les souches (**Guinebretiere et al., 2002**).

---

## 4. GÉNÉRALITÉS SUR L'ANALYSE DES RISQUES

### 4.1. Historique, base légale de l'analyse des risques et définitions

À l'origine, l'analyse des risques était conçue comme un outil devant aider à prendre les décisions adéquates concernant le risque de certains dangers carcinogènes. En 1983, le "National Research Council" (**NRC, 1983**) a publié le document « Risk Assessment in the Federal Government : Managing the Process », qui a constitué la base de la notion générale d'évaluation des risques et a posé une base claire pour l'évaluation des risques chimiques et la gestion des risques.

En 1994, l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) a conclu un accord (Accord SPS) pour l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires qui avait pour objectifs d'éviter les entraves au commerce international et d'instituer des règles selon lesquelles un pays peut refuser de commercialiser un produit sur son territoire s'il présente un risque de maladie pour la population (**OMC, 1994**). L'analyse des risques a été érigée comme principe de référence par l'Organisation Mondiale du Commerce lors de l'application des accords des mesures Sanitaires et Phytosanitaires, autrement connus sous le nom d' « accords SPS », datant du 1<sup>er</sup> janvier 1995.

En 1999, l'Union Européenne a rédigé le Livre Blanc sur la sécurité alimentaire où les principes généraux de la politique européenne en matière de sécurité alimentaire ont été exposés (**Communautés Européennes, 2000**). Dans ce texte fondateur, l'insistance a été faite sur l'application et la mise en œuvre de l'analyse de risque et du respect des accords internationaux. Depuis lors, l'Union Européenne a remplacé son ancienne législation par un ensemble de nouveaux règlements communément appelé « le paquet hygiène ». Parmi les différents règlements du paquet hygiène, c'est le règlement (CE) N°178/2002 (**Communautés Européennes, 2002**) établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, appelé « General Food Law », qui, dans son article 6, met en place l'analyse des risques comme une démarche systématique dans la sécurité alimentaire. Le règlement (CE) n°2073/2005 (**Communautés Européennes, 2005**) recommande des révisions des critères microbiologiques concernant les denrées alimentaires en tenant compte des progrès scientifiques, technologiques et méthodologiques, l'évolution des niveaux de prévalence et de contamination, l'évolution de la population de consommateurs vulnérables ainsi que les résultats éventuels d'analyses des risques.

La systématique de l'analyse des risques est appliquée à des dangers et situations, parmi lesquels les dangers microbiologiques, physiques et chimiques qui sont importants dans l'industrie alimentaire. L'objectif final d'une analyse des risques est de pouvoir prendre une

décision stratégique bien fondée sur la base d'un résultat qualitatif ou quantitatif (OMC, 1994). Sur la base du résultat d'une évaluation des risques (quantitative et qualitative), l'Autorité établit une gestion des risques avec une communication pour les groupes ou personnes concernés. Les données d'analyse quantitative des risques peuvent être comprises dans cette communication.

Malgré le fait que la même systématique de base est utilisée, des différences perceptibles existent dans l'approche et la terminologie de l'analyse des risques. Avant d'aborder l'analyse de risque, il est nécessaire de définir quelques notions.

- **Un danger** correspond à une notion qualitative. C'est un agent physique, chimique ou biologique présent dans un aliment, ou un état de cet aliment pouvant avoir un effet adverse pour la santé (FAO/OMS, 2007). Selon Toma *et al.* (2002), cette notion peut être considérée sous deux angles. Pour certains, un danger est constitué par « tout agent biologique, chimique ou physique pouvant avoir un effet néfaste pour la santé ». Il est alors représenté par des agents biologiques comme des virus (virus de la fièvre aphteuse...), des bactéries (*Salmonella*, *Listeria*, *Bacillus*...), des parasites (*Trichinella spiralis*...), des substances chimiques (anabolisants) ou des particules (radionucléides). Pour d'autres, le danger correspond à la maladie elle-même (la fièvre aphteuse, la salmonellose, la trichinellose, etc.).

- **Le risque** correspond à une notion quantitative. C'est la probabilité de la survenue des effets néfastes d'un danger, combinée à l'importance des conséquences indésirables (Toma *et al.*, 2002). Il se définit également comme étant une fonction de la probabilité d'un effet adverse pour la santé et de sa gravité, du fait de la présence d'un (de) danger(s) dans un aliment (FAO/OMS, 2007). Le risque est lié à l'exposition au danger, c'est-à-dire à la consommation de la denrée contaminée (quantité et fréquence de consommation). Il existe donc deux composantes dans la notion de risque : d'une part, la fréquence d'apparition des effets néfastes du danger (d'où découle la probabilité de survenue) et d'autre part, l'importance des conséquences du danger (la gravité). Selon les dangers, la fréquence peut être faible, moyenne ou élevée. Il en est de même pour les conséquences, en termes de morbidité, de mortalité et de pertes économiques. Le niveau de risque de maladie d'un danger est une fonction de ces deux composantes (Toma *et al.*, 2002).

- **Le facteur de risque** est un élément de nature collective ou individuelle qui interfère de telle façon sur le danger qu'il augmente ou réduit la probabilité de survenance des effets néfastes ainsi que leur ampleur.

- **La dose-réponse ou dose-effet** est la détermination de la relation entre l'ampleur de l'exposition (dose) à un agent chimique, biologique ou physique, et la gravité et/ou la fréquence des effets associés sur la santé (réponse).

- **L'analyse des risques** : Plusieurs définitions ont été données pour l'analyse des risques. L'analyse des risques est définie comme « une démarche scientifique dont le but est d'identifier les dangers connus ou potentiels, d'en apprécier les risques, de les gérer et de communiquer à leur propos » (Ahl *et al.*, 1993). C'est également une manière d'organiser les informations disponibles sur un évènement potentiel donné, de les traduire en probabilités en tenant compte d'hypothèses, de la variabilité et de l'incertitude et d'en déduire logiquement des décisions (Toma *et al.*, 2002). Elle permet de mieux déterminer les risques de survenue de problèmes prioritaires pour la protection de la santé publique et animale et d'améliorer la qualité des mesures adoptées par les pouvoirs publics (Nairaud et Pruneaux, 2003). Elle cherche à quantifier à la fois la probabilité et l'ampleur de conséquences négatives pour les individus ou les populations exposé(e)s à des dangers spécifiques. L'analyse des risques sert à effectuer une estimation des risques de maladie pesant sur la santé et la sécurité des personnes, afin de définir et de mettre en œuvre des mesures appropriées visant à les maîtriser et à communiquer avec les parties prenantes au sujet des risques et des mesures appliquées (FAO/OMS, 2007). Elle est axée sur la maîtrise d'un problème sanitaire courant, et est appliquée à la denrée alimentaire telle que présentée au consommateur. L'analyse des risques reste généralement limitée à un type de denrée en combinaison avec un danger spécifique (ex. *Salmonella* Enteritidis dans les œufs, *E. coli* O157:H7 dans les hamburgers, etc.).

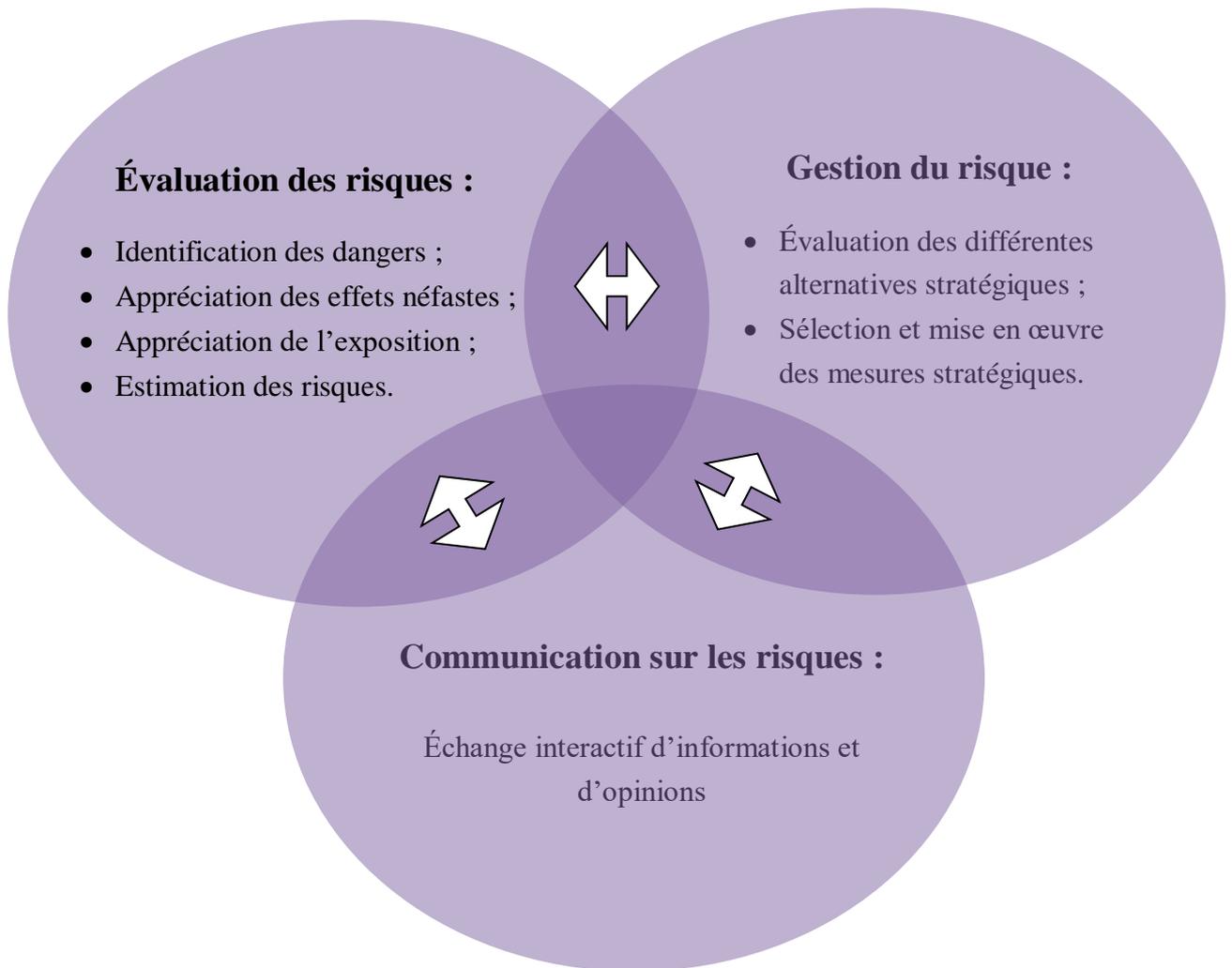
#### 4.2. Principaux concepts de l'analyse des risques

Il coexiste deux modèles de description et d'appellation des étapes de la démarche en analyse de risque en santé animale et en santé publique. Il y a d'une part, le modèle de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale, anciennement dénommée Office International des Epizooties, OIE et d'autre part, le modèle du *Codex Alimentarius*, issu du groupe de travail de l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture ; et de l'Organisation Mondiale de la Santé (FAO/OMS, 2007). En plus de ces deux modèles, il y a

le système HACCP (Hazards Analysis of Critical Control Point) qui identifie les dangers spécifiques et les mesures pour leur contrôle dans le but d'assurer la sécurité des aliments. Le système HACCP est utilisé en entreprise (**ISO 22000, 2005**). Malgré le fait que la terminologie utilisée soit différente (et précédée par l'identification du danger pour l'OIE), une évaluation des risques concerne, dans tous les cas, un processus structuré logiquement dans le cadre duquel un certain nombre d'étapes doivent être accomplies. Le modèle le plus largement utilisé en hygiène alimentaire est celui du *Codex Alimentarius* qui est par conséquent détaillé dans la suite du texte.

#### 4.2.1. Analyse des risques selon le *Codex Alimentarius*

L'analyse des risques constitue la nouvelle approche de la politique sanitaire des États. Selon le *Codex Alimentarius*, c'est une démarche structurée de prise de décisions comprenant les trois volets distincts mais intimement liés : **l'évaluation des risques, la gestion des risques et la communication autour des risques**. Chacun de ces volets fait partie intégrante de l'ensemble de l'analyse des risques. Ces trois volets sont des éléments complémentaires essentiels de cette discipline. Bien qu'ils soient présentés sur la **figure 2** comme des éléments dissociés, ils sont en réalité très intégrés. Au cours d'une analyse classique des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments, des interactions ont généralement lieu de manière quasi-permanente entre les gestionnaires et les évaluateurs des risques à l'intérieur d'un environnement caractérisé par la communication autour des risques. C'est quand les trois volets sont bien intégrés par les gestionnaires des risques qui dirigent le processus que l'analyse des risques est le plus efficace. Au sein du *Codex Alimentarius*, des directives spécifiques ont été, dès lors, rédigées pour l'évaluation et la gestion des risques biologiques (**AFSCA, 2005**).



**Figure 2 :** Systématique de l'analyse des risques selon le *Codex Alimentarius*

**Source :** AFSCA (2005)

#### 4.2.1.1. Évaluation des risques

L'évaluation des risques microbiologiques est un nouvel instrument pour évaluer la sécurité sanitaire des aliments et de l'eau (FAO/OMS, 2004). Elle est définie par la Commission du *Codex Alimentarius* comme un processus scientifique se composant de quatre parties (Codex Alimentarius, 1995) : l'identification du danger ; l'appréciation des effets néfastes du danger, l'appréciation de l'exposition et l'estimation des risques.

L'identification du danger correspond à l'identification qualitative des agents biologiques (microorganismes et/ou leurs toxines), chimiques (pesticides, antibiotiques) et physiques (Morceaux de métal et de verre, Bijoux, Sable), susceptibles de provoquer des effets néfastes ou adverses sur la santé du consommateur et qui peuvent être présents dans un aliment spécifique ou un groupe d'aliments. Cette étape consiste en une recherche de littérature c'est-à-dire à recueillir toutes les informations ou connaissances sur le danger. En général, ces informations complètes sont aisément disponibles. Il s'agit de déterminer la nature du danger, son origine, ses effets qualitatifs, sa pathogénie, son incidence chez l'homme, le rôle des aliments dans sa transmission, etc. (Assidjo *et al.*, 2013). Il s'agit d'une démarche purement qualitative qui est liée à la veille scientifique.

L'appréciation (caractérisation) des effets néfastes du danger ou évaluation du rapport dose-effet est l'évaluation qualitative et/ou quantitative de la nature des effets néfastes sur la santé à la suite d'une exposition à différentes doses, aux agents biologiques, chimiques et physiques qui peuvent être présents dans un aliment. Les évaluateurs des risques examinent les caractéristiques du pathogène, de l'hôte et de la matrice alimentaire. Pour les agents chimiques, il y a lieu de procéder à une détermination de la courbe dose-réponse. Pour les agents biologiques et physiques, la détermination de la dose-réponse est effectuée si les données sont disponibles. Lorsque des données sont disponibles, la caractérisation ou l'appréciation des effets néfastes du danger est censée fournir des informations quantitatives sur la relation dose-réponse et sur la probabilité d'effets néfastes (FAO/OMS, 2004). Il s'agit donc de l'établissement de la relation dose-effet ou nombre-effet qui est une estimation de la relation entre la dose d'un danger (le nombre de microorganismes ou le niveau d'exposition d'une substance) et l'incidence et la sévérité d'un effet. C'est la description quantitative de la relation entre le degré d'exposition à un danger (dose) et la gravité et/ou la fréquence des effets néfastes qui en résulte sur la santé du consommateur (réponse).

Cette phase vise à chercher une réponse à des questions telles que:

- Quelle est la probabilité que la maladie se produit et pour quelle proportion de la population ?

- Est-ce que l'évolution de la maladie est bénigne ou grave ?
- Quelle est la prévalence du danger dans l'aliment ?
- Quelle en est sa concentration ?

L'appréciation de l'exposition ou évaluation de l'exposition est une estimation qualitative et/ou quantitative du niveau du danger auquel le consommateur est exposé au moment de la consommation (AFSCA, 2005). C'est en fait l'évaluation de l'ingestion probable du danger via la consommation de l'aliment et, le cas échéant, le contact par d'autres voies d'exposition. La détermination de l'exposition quantitative nécessite la connaissance d'une part, du schéma de consommation et, d'autre part, du taux et du niveau de contamination de la denrée alimentaire au moment de la consommation. Le schéma de consommation est déterminé par la quantité consommée et la fréquence de consommation ainsi que le mode de préparation de l'aliment. Ces données permettront d'évaluer l'exposition, pendant un intervalle de temps donné, au danger présent dans les aliments tels qu'ils sont réellement consommés. Pour la détermination du niveau de contamination microbiologique, une approche du type « de la fourche à la fourchette » peut être appliquée. Cette approche comporte comme principal avantage, la reprise dans le modèle, du processus complet. Ce qui permet de contrôler par simulation l'efficacité d'éventuelles stratégies de gestion. L'inconvénient de ces techniques est qu'une grande quantité de données, relatives à l'effet des différentes étapes sur le niveau de contamination, doit être disponible. Lorsqu'une approche « de la fourche à la fourchette » n'est pas possible, à cause d'un manque de données, une approche plus simple partant du niveau de contamination du produit fini prêt à consommer est utilisée (FAO/OMS, 2004).

Pour l'évaluation de l'exposition à l'aide de données sur la consommation et de données sur la contamination, la méthode déterministe, la méthode probabiliste ou une combinaison des deux méthodes est utilisée. La méthode déterministe utilise des estimations ponctuelles, aussi bien pour la consommation que pour la contamination, par exemple la moyenne, le 95<sup>ème</sup> percentile et le maximum. Dans l'estimation probabiliste de l'exposition, sont utilisées les distributions de la consommation et de la contamination de la population. La distribution de l'ingestion du contaminant pour la population est ensuite déterminée à l'aide des simulations de Monte Carlo. Une combinaison des deux techniques est également possible, en utilisant par exemple une estimation ponctuelle pour la consommation (par exemple la moyenne) et en prenant en compte la distribution complète pour les données de consommation. Plusieurs composantes sont à estimer. Il s'agit de la probabilité que le produit

consommé soit contaminé, la concentration du danger dans l'aliment contaminé, la fréquence de consommation du produit alimentaire et la quantité d'aliment consommé. Chacune de ces quatre composantes est une variable aléatoire.

L'estimation des risques ou caractérisation des risques consiste à intégrer les étapes précédentes en une estimation quantitative (probabilité) des effets indésirables susceptibles de se produire dans une population donnée, due à l'exposition réelle ou prévue à un danger, et pouvant inclure l'estimation du risque, à savoir la quantification de cette probabilité (**Assidjo et al., 2013**). Cette phase est un cadre développé pour définir l'importance du risque. Toutes les hypothèses, les incertitudes et les jugements scientifiques des trois étapes précédentes sont pris en compte. Ce classement permet ensuite de prendre une décision concernant l'acceptation ou non d'un risque donné. La caractérisation des risques englobe également tous les facteurs qui peuvent avoir un effet sur le risque et indique le degré de fiabilité de l'estimation du risque. La probabilité avec laquelle un danger donné se présente ne peut jamais être réduite à zéro. Un certain niveau de risque est donc toujours accepté et cette acceptation dépend fortement de l'effet induit sur la santé de l'homme, de la perception des risques, des aspects culturels, des aspects sociaux et des problèmes économiques qui y sont liés, ainsi que de la législation en vigueur (**FAO/OMS, 2004**). La probabilité de survenue des effets néfastes sur la santé est généralement difficile à estimer puisqu'elle dépend de la nature de l'effet, de l'importance et de la durée de l'exposition qui dépasse les valeurs seuils de référence.

Le risque d'être malade pour un individu est calculé à partir de l'équation suivante :

$$\text{Probabilité (Malade)} = 1 - \prod_{i=1}^c (1 - f(D_i)) \quad \text{Formule 1 (Sanaa et Cerf, 2002)}$$

Dans cette formule,  $c$  est la fréquence de consommation pour un individu donné,  $D_i$  la dose ingérée lors de la consommation  $i$ , et  $f$  la fonction dose/effet. Une distribution de la probabilité du risque de tomber malade par individu est ainsi obtenue. À partir de cette distribution, celle du nombre attendu de malades pour une période de temps donnée est déduite. Les méthodes les plus répandues sont celles de la simulation. Au lieu des valeurs moyennes ou extrêmes, une loi de distribution est associée à toutes les variables et paramètres du modèle. Les simulations du type Monte-Carlo permettent d'estimer la distribution marginale du risque étudié (**Vose, 2000**).

#### *4.2.1.2. Gestion des risques*

La gestion des risques est un « processus d'identification, de sélection et de mise en œuvre de mesures permettant de réduire le risque ». Elle consiste à mettre en balance les différentes politiques possibles en consultation avec l'ensemble des parties intéressées, en tenant compte des résultats de l'évaluation des risques et d'autres facteurs pertinents pour la protection de la santé des consommateurs et la promotion de pratiques commerciales loyales et, au besoin, à choisir les mesures de prévention et de contrôle appropriées (FAO/OMS, 2004). La gestion des risques comprend en général trois étapes que sont la définition des options de réduction du risque, l'estimation du risque réduit, puis son évaluation. Cependant, deux étapes supplémentaires peuvent y être ajoutées : la mise en œuvre des mesures de gestion du risque ainsi que leur suivi et leur révision en fonction des besoins. La gestion des risques est considérée comme le volet de l'analyse des risques où l'information scientifique et d'autres facteurs, comme par exemple des considérations d'ordre économique, social, culturel et éthique, sont intégrés et évalués lorsqu'il s'agit de choisir les options préférentielles en matière de gestion des risques. Une gestion rigoureuse des risques nécessite la participation de toutes les parties prenantes dans le processus de l'analyse des risques.

Dans le cas où les données scientifiques ne permettent pas une évaluation complète du risque lorsqu'un phénomène, un produit ou un procédé peut avoir des effets potentiellement dangereux, identifiés par une évaluation scientifique et objective, si cette évaluation ne permet pas de déterminer le risque avec suffisamment de certitude, le principe de précaution est appliqué. Il permet de réagir rapidement face à un possible danger pour la santé humaine, animale ou végétale, ou pour la protection de l'environnement. Toutefois, dans la pratique, son champ d'application est beaucoup plus large et s'étend également à la politique des consommateurs. Le recours au principe de précaution n'est donc justifié que lorsque trois conditions préalables sont remplies, à savoir, l'identification des effets potentiellement négatifs, l'évaluation des données scientifiques disponibles et l'étendue de l'incertitude scientifique. Il ne peut en aucun cas justifier une prise de décision arbitraire.

#### *4.2.1.3. Communication sur les risques*

La communication du risque correspond à un échange d'informations et d'opinions concernant le risque, les facteurs liés aux risques et les perceptions des risques, entre les responsables de l'estimation du risque, les responsables de la gestion du risque et les autres parties intéressées telles que les milieux professionnels et le public. Ce n'est pas une opération finale dédiée aux gestionnaires, aux décideurs, les milieux professionnels et le

public, mais un échange entre les différentes parties intéressées par ou impliquées dans l'analyse de risque, et ce, tout au long de la démarche.

#### 4.2.2. Analyse participative des risques

Dans les pays développés, l'analyse des risques est une pratique courante et représente la clé de voûte de la réglementation à la fois de la sécurité alimentaire domestique et du commerce international. Cependant, son utilisation dans les pays en développement est limitée par les coûts élevés et surtout par l'importance du marché informel. En effet, l'analyse des risques est rarement appliquée aux marchés nationaux où les populations pauvres vendent et achètent la nourriture, où les niveaux d'hygiène et de sécurité sont les plus bas, et où la vulnérabilité de ces populations aux maladies d'origine alimentaire est la plus élevée (**Grace et al., 2008**). Ceci conduit à un déficit d'informations sur les risques et les moyens de leur gestion.

À la fin des années 1970 de nouvelles méthodologies de recherche participative et d'outil d'apprentissage ont été développées pour combler le vide laissé par les méthodes de recherche traditionnelles (enquêtes structurées, questionnaires), qui ne permettent pas de mieux comprendre la réalité des populations. Ces méthodes de recherche participative se trouvent entre la recherche formelle (coûteuse et longue) et la recherche informelle (trop courte pour donner des résultats fiables et qualifiés). Elles sont plus efficaces, plus durables et plus éthiques avec la prise en compte des pauvres dans la planification et dans la prise des décisions qui les touchent (**Duraiappah et al., 2005**). Elles reposent sur le respect accordé aux capacités et aux savoirs locaux, la volonté des experts venus de l'extérieur de laisser aux populations locales la possibilité de prendre en charge le processus et de contribuer à la prise des décisions. Ces méthodes ont été appliquées dans une variété de contextes et de secteurs, y compris la gestion de l'élevage, la promotion de la santé dans les villages, la gestion des bassins versants, l'assainissement urbain, les études d'impact, la conscience de genre et la construction d'organisations de micro-crédit (**Duraiappah et al., 2005**).

Les approches participatives de développement sont promues sur la base qu'elles soutiennent la mise en œuvre efficace des projets et améliorent le bien-être des pauvres. Parmi ces méthodes, il y a l'Analyse Participative des Risques (APR) mise en œuvre en Afrique subsaharienne par le Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS) et l'International Livestock Research Institute (ILRI) au Kenya (**Grace et al., 2010**). L'APR est une méthode adaptée à l'analyse des risques pour assurer la participation volontaire des communautés (**Barker et al., 2010**) dans la planification, les enquêtes, l'échantillonnage

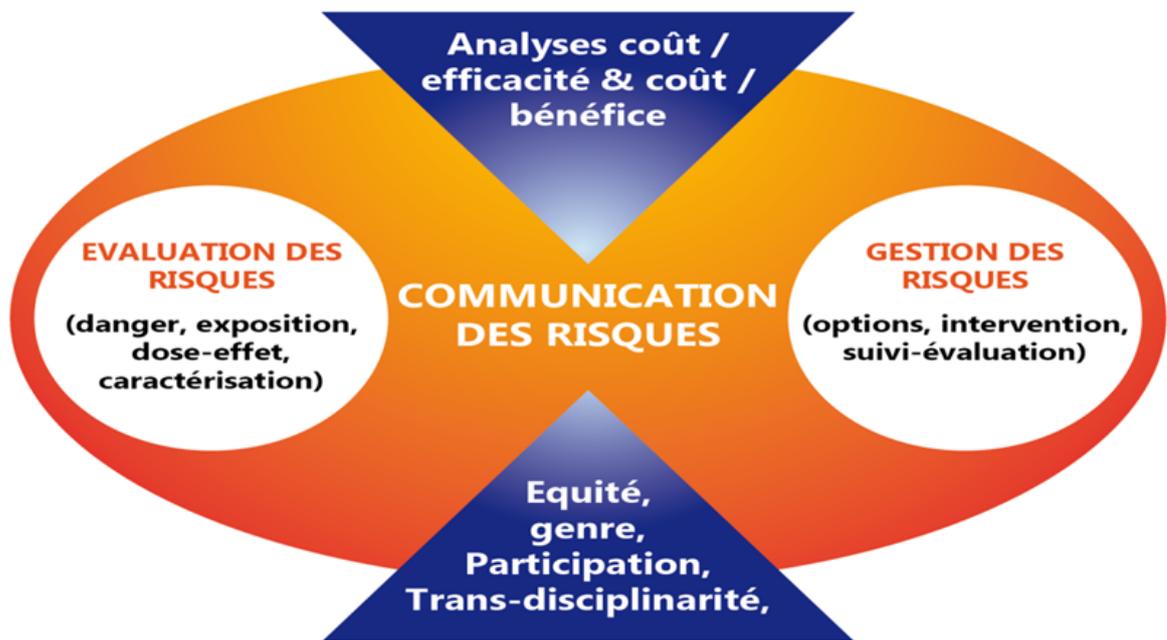
aléatoire, la collecte de données en vue de faciliter la surveillance, les études épidémiologiques et le contrôle des maladies. L'APR est une combinaison des approches participatives (équité, inter – et transdisciplinarité) et des méthodes HACCP, ou *Codex Alimentarius* (OIE /OMS /FAO) qui prennent en compte la variabilité, l'incertitude, la relativité des risques et la complexité des prises de décisions face à ces risques (**figure 3**).

L'analyse des dangers par les méthodes HACCP ou l'analyse des risques par le *Codex Alimentarius* est un processus linéaire, complexe et difficile à mettre en œuvre dans le secteur informel, d'où l'émergence des guides de bonnes pratiques et de la participation pour prendre en compte les données qualitatives.

L'APR pourrait contribuer à la gestion efficace, concertée et durable du risque. Elle prône l'implication de tous les acteurs de la chaîne des denrées alimentaires et permet de capter à travers des observations directes, des entretiens et des groupes focaux ou « *focus group* », des informations qui pourraient échapper aux évaluateurs de risques surtout en matière d'exposition, de dose-effet et de caractérisation du risque (**Bonfoh, 2010 ; Bonfoh et al., 2013**).

Un groupe focal est un groupe de discussion qui rassemble des personnes de même milieu ou ayant des expériences semblables pour discuter d'un thème précis présentant un intérêt pour le chercheur. Ce groupe de participants est dirigé par un modérateur (ou facilitateur) qui introduit les sujets à débattre et aide le groupe à développer une discussion animée et naturelle. Les groupes focaux sont excellents pour l'obtention d'informations auprès des communautés analphabètes. Cette technique d'enquête qualitative a été récupérée dans les années 1980 par la recherche universitaire dans des domaines de l'éducation, de la santé publique, de l'environnement et des sciences sociales (**Moreau et al., 2004**). L'objectif est de susciter une discussion spontanée contradictoire entre les participants qui expriment leurs opinions, donnent des informations sur leurs habitudes et les disparités qui existent dans leur communauté quant à leurs croyances, leurs expériences et leurs coutumes.

Ces entretiens servent donc à la fois à identifier, dans la complexité des participants, les comportements et opinions ainsi que la représentation d'un danger ou de la qualité d'un produit dans une communauté (**Kouamé-Sina, 2013**).



**Figure 3** : Concept d'analyse participative des risques dans la chaîne de valeur informelle des produits d'origine animale

Source : Bonfoh *et al.* (2013)

A decorative horizontal scroll graphic with a light gray textured background and a black border. The scroll is partially unrolled at both ends, with the top corners curled upwards. The text is centered on the scroll.

## **II- MATÉRIEL ET MÉTHODES**

# 1. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA CHAÎNE DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DU LAIT CRU LOCAL

## 1.1. Matériel

### 1.1.1. Population d'étude

La population d'étude, pour déterminer les caractéristiques de la chaîne de production à la commercialisation et le profil du risque de contamination du lait cru local de la ferme au marché de vente, était constituée d'éleveurs et de vendeurs de lait.

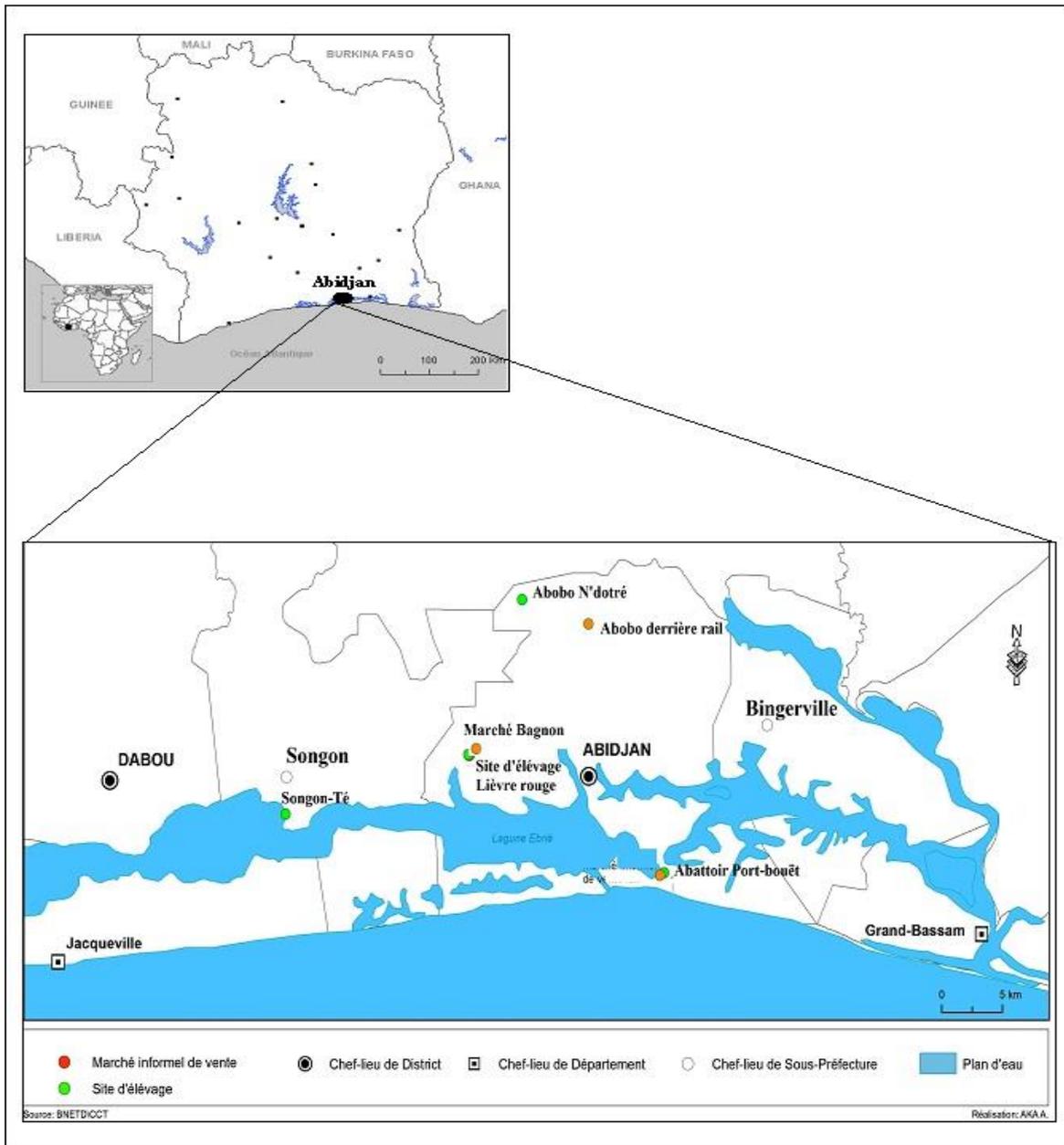
### 1.1.2. Fiches d'enquête

Deux fiches d'enquête ont été élaborées. Une fiche sur le système de production et de distribution (collecte et transport), et la seconde sur le système de vente du lait cru à Abidjan (**Annexes 2 et 3**). Par ailleurs, deux guides d'entretien participatif ont été utilisés (**Annexes 4 et 5**).

## 1.2. Méthodes

### 1.2.1. Sites d'étude

L'étude a été réalisée dans de petites exploitations laitières informelles à Abidjan. Une enquête de prospection dans les zones de production et sur les marchés de vente de lait à Abidjan et périphérie a été effectuée en Septembre 2008. À la suite de cette enquête, quatre sites de production de lait cru ont été sélectionnés dans les zones périurbaines d'Abidjan. C'étaient le site de l'abattoir de Port-Bouët au sud, le site de Lièvre rouge dans la commune de Yopougon à l'ouest, le site de Songon-té à la périphérie de Dabou et le site de N'dotré à Abobo au nord d'Abidjan. Trois de ces quatre sites qui avaient un marché informel de vente de lait ont été sélectionnés pour le prélèvement de lait cru chez le vendeur. Il s'agissait du marché de l'abattoir de Port-Bouët, du marché Bagnon à Lièvre rouge dans la commune de Yopougon et le marché d'Abobo Derrière Rails (**figure 4**). Les sites de production et les marchés de vente de lait cru ont été sélectionnés à dessein, sur la base de la densité de la population, l'importance des marchés pour le secteur informel laitier traditionnel et surtout selon le consentement des acteurs (propriétaires, éleveurs, bergers, collecteurs, vendeurs et gestionnaires) à participer à l'étude.



**Figure 4** : Carte d'Abidjan matérialisant les sites de production et les marchés informels de vente du lait cru de vache

### 1.2.2. Sélection des éleveurs et des vendeurs de lait cru local

Sur les sites sélectionnés, les éleveurs qui disposaient de vaches laitières pendant la période d'étude et qui livraient régulièrement du lait sur les marchés de distribution et de vente de lait cru local ont été sélectionnés. De même, les vendeurs (collecteurs-vendeurs) qui vendaient du lait aux alentours des zones de production et dans les marchés de distributions et de vente de lait cru local ont été inclus dans l'étude. Les éleveurs et les vendeurs de lait cru local ont été sélectionnés sur la base de leur consentement. Au total, 15 éleveurs (fermes) numérotés de F1 à F15 ont été sélectionnés dont quatre à l'abattoir de Port-Bouët, deux à Lièvre rouge dans la commune de Yopougon, un à Songon-té et huit à N'dotrè à Abobo. Pour les échantillons de lait de vente, 17 vendeurs numérotés de V1 à V17 ont été recrutés dont six au marché de l'abattoir de Port-Bouët, quatre au marché Bagnon à Lièvre rouge dans la commune de Yopougon et sept au marché d'Abobo Derrière Rails.

### 1.2.3. Détermination des caractéristiques de la chaîne de production à la vente du lait cru

Une enquête avec un questionnaire structuré à passage unique a été réalisée dans les fermes laitières auprès des éleveurs (producteurs de lait). Les questions ont porté entre autres sur le système de production, de distribution, de conservation et de vente du lait. Elles ont porté aussi sur les conditions sanitaires des élevages telles que l'hygiène générale et l'hygiène du lait à la production, conformément aux recommandations de la Fédération Internationale de Laiterie (**IDF, 1990**) et le *Codex Alimentarius* sur l'hygiène alimentaire (**FAO/OMS, 1997**). Les questions ont aussi concerné le respect d'un plan de prophylaxie médicale et des délais d'attente concernant l'utilisation de médicaments vétérinaires chez les animaux en lactation (**Annexe 1**). En outre, le comportement des trayeurs et la pratique de la traite ont été observés pendant la traite. Une deuxième enquête a été réalisée sur les trois marchés informels de vente de lait, sélectionnés pour suivre le sort du lait après la traite et identifier les facteurs de risque de contamination du lait sur les lieux de vente. Les questions ont porté sur l'origine du lait, la quantité moyenne de lait cru reçue et vendue par jour lors des trois dernières ventes (jours), les pratiques d'ébullition, le mode de transport et sur le mode de conservation du lait non-vendu (**Annexe 2**).

#### 1.2.4. Perceptions des acteurs de la qualité du lait

La perception ou l'appréciation des acteurs de l'hygiène et de la qualité du lait a été évaluée à travers la réalisation de groupes focaux « *focus group* » (**annexes 3 et 4**). Au total, quatre groupes focaux ont été réalisés en Janvier 2010 sur les sites de Lièvre-rouge, de l'abattoir de Port-Bouët, d'Abobo Derrière Rails et de N'dotré avec les producteurs (les trayeurs, les éleveurs) et les vendeurs (collecteurs-vendeurs) de lait cru afin de comprendre les pratiques et les comportements à risque observés tout au long de la chaîne de production et au cours de la consommation. Les discussions en groupes focaux, sur les sites de N'dotré et d'Abobo Derrière Rails, se sont déroulées respectivement avec 8 producteurs et 8 vendeurs. Les discussions en groupes focaux, sur les sites de Livre rouge et l'abattoir de Port-Bouët se sont déroulées avec un mélange de producteurs et de vendeurs. Les participants étaient sélectionnés sur chaque site comme suit : Lièvre rouge : 3 producteurs et 3 vendeurs ; Port- Bouët : 4 producteurs et 6 vendeurs. Les discussions ont porté entre autres sujets, sur la représentation de la qualité et de l'hygiène du lait par les acteurs, leur connaissance des maladies d'origine alimentaire, les pratiques à risques, les modes de conservation et de consommation du lait.

## 2. DÉTERMINATION DES CARACTÉRISTIQUES DE LA CHAÎNE DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DE L'ATTIÉKÉ

### 2.1. Matériel

#### 2.1.1. Population d'enquête

La population enquêtée, pour déterminer les caractéristiques de la chaîne de production jusqu'à la commercialisation et du profil du risque de contamination de l'*attiéké*, était constituée par les productrices et vendeuses d'*attiéké*.

#### 2.1.2. Matériel d'enquête

Une grille d'observations a été utilisée pour déterminer les caractéristiques de la chaîne de production à la commercialisation et du profil du risque de contamination de l'*attiéké* à Abidjan.

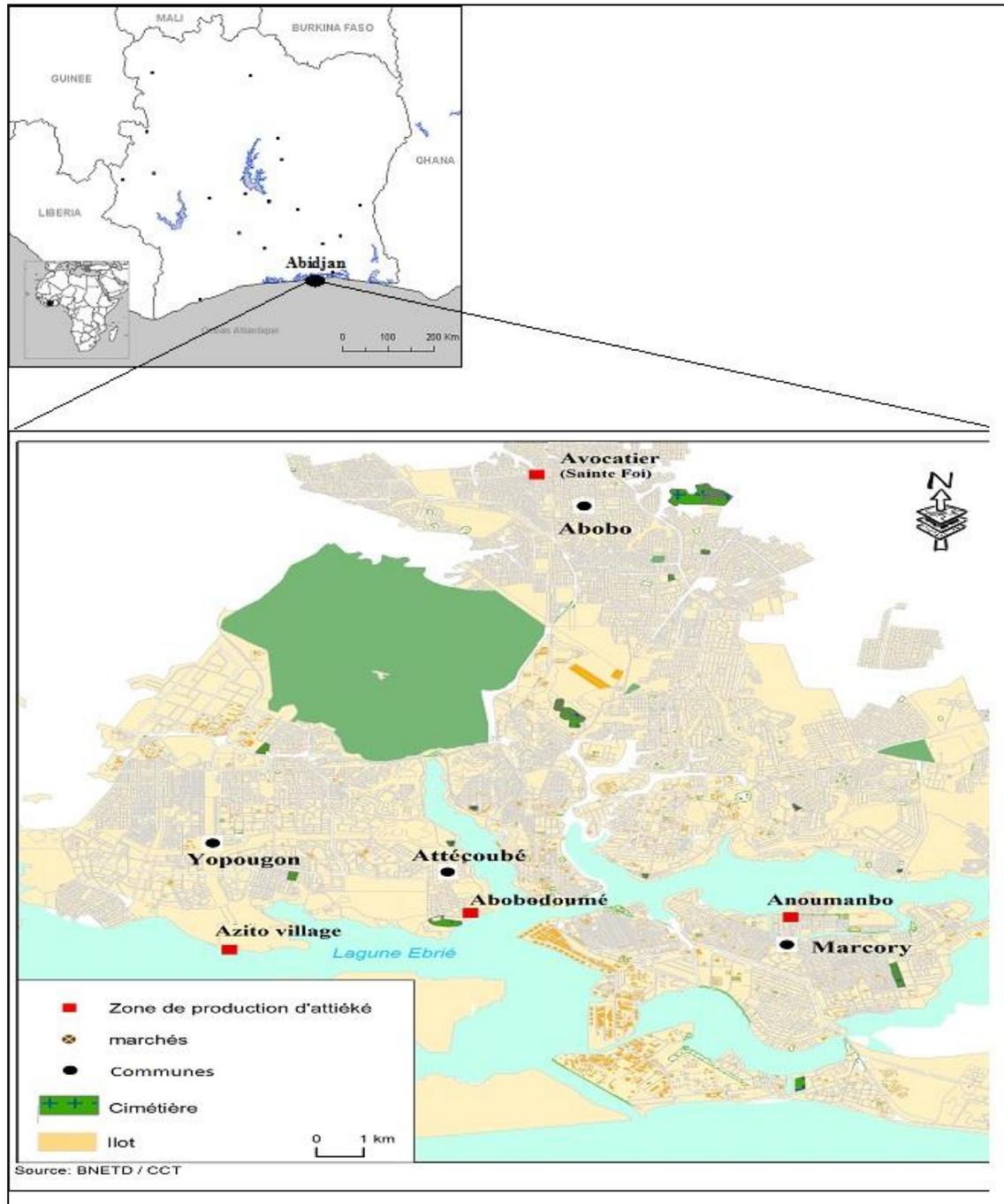
## 2.2. Méthodes

### 2.2.1. Sites d'étude et nombre de productrices sélectionnées

L'étude est de type transversal et a été réalisée sur des sites du circuit de production, de distribution et de commercialisation de l'*attiéké*, dans la ville d'Abidjan. Abidjan est la capitale économique de la Côte d'Ivoire et situé au bord de la lagune Ebrié, au sud de la Côte d'Ivoire (**figure 5**). La justification du choix de cette ville est que c'est l'une des zones d'origine, de forte production et de consommation de l'*attiéké*. La production quotidienne artisanale d'*attiéké* fraîchement préparé atteint plus de 100 tonnes pour la filière artisanale (**Djéni, 2009**). Dans le cadre de cette étude, une enquête de prospection a été effectuée en Janvier 2010 à Abidjan, dans les dix communes de la ville. L'enquête a permis de sélectionner cinq communes en fonction de l'importance des circuits de production et de commercialisation d'*attiéké* qu'elles abritent. Il s'agissait de Yopougon, Abobo, Treichville, Marcory et Attécoubé. Dans ces communes, quatre sites de production artisanale de l'*attiéké* ont été sélectionnés. Ce sont Avocatier dans la commune d'Abobo, Anoumambo dans la commune de Marcory, Abobodoumé dans la commune d'Attécoubé et Azito dans la commune de Yopougon. Sur chaque site de production, quatre productrices d'*attiéké* ont été choisies. Au total, 16 productrices d'*attiéké* ont été incluses dans l'étude sur la base de leur consentement.

### 2.2.2. Détermination des caractéristiques de la chaîne de production à la commercialisation de l'*attiéké*

L'identification du circuit de production, de distribution et de vente de l'*attiéké* à Abidjan s'est faite à travers une enquête de prospection sur le terrain. L'enquête a consisté en une observation directe des sites et circuits de production, distribution et de vente de l'*attiéké*, pour identifier les pratiques à risques et évaluer le niveau de salubrité. L'opération a été réalisée à l'aide d'une grille d'observations préalablement élaborée. Les observations ont porté entre autre sur la présence d'un circuit de distribution d'eau potable et sur l'état sanitaire du site de production, à savoir la présence ou non de dispositif de gestion des déchets solides et liquides, d'aires d'éviscération et de parages collectives ainsi que la qualité de leur entretien.



**Figure 5 :** Carte d'Abidjan matérialisant les sites de production d'*attiéké*

### 3. ÉVALUATION DE LA CONTAMINATION DU LAIT ET DE L'ATTIÉKÉ PAR LE GROUPE *B. CEREUS*

#### 3.1. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé était constitué de lait cru de vache et d'*attiéké*.

En plus du lait et de l'*attiéké*, d'autres échantillons ont été prélevés pour déterminer les points critiques et les sources de contamination. Il s'agissait pour la chaîne de production du lait, de l'eau utilisée pour les opérations de traite du lait, de l'eau de rinçage des ustensiles de traite, de l'eau stérile exposée aux contaminants de l'environnement et des écouvillons des mains des trayeurs et de la peau des mamelles des vaches laitières.

Concernant la chaîne de production de l'*attiéké*, il s'agissait d'huile de palme décolorée, de racine fraîche de manioc, de ferment (intrants), de pâte de manioc broyée avec le ferment additionné d'huile de palme décolorée, de pâte de manioc fermentée, de pâte de manioc fermentée pressée et de pâte de manioc fermentée pressée et séchée (produits intermédiaires). Il y avait aussi l'eau utilisée sur les sites et l'eau stérile exposée aux contaminants de l'environnement de production de l'*attiéké*.

#### 3.2. Souches de référence

Dans cette étude, la souche de *Streptococcus thermophilus* 20617<sup>T</sup> a été utilisée comme témoin positif pour la mise en évidence du gène *16S rADN*, celle de *Bacillus thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup> et *Bacillus cereus* DSM 4312 pour le gène *motB*. Pour l'identification des espèces par amplification du gène *gyrB*, les souches de *Bacillus thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup>, *Bacillus cereus* DSM 4312, *Bacillus mycoides* ATCC 6462 et *Bacillus anthracis* ATCC 14578 ont été utilisées. *Bacillus cereus* DSM 4312 a été aussi utilisée pour la mise en évidence du gène *ces* (céréulide), responsable de la sécrétion de la toxine émétique. La souche *Bacillus cereus* DSM 31<sup>T</sup> a été aussi utilisée pour la mise en évidence des gènes de virulence *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *bceT*, *cytK*, *cytK-1* et *cytK-2*. Toutes ces souches provenaient de la collection de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig, en Allemagne.

Par ailleurs, *Escherichia coli* ATCC 25922 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ont été utilisées pour le contrôle de la qualité de l'antibiogramme.

### 3.3. Échantillonnage de lait

#### 3.3.1. Taille des échantillons de lait

Un échantillon de lait est une aliquote de 100 mL de lait prélevé dans un pot stérile de 150 mL. L'enquête de prospection a permis d'enregistrer au total 119 vaches laitières et 17 vendeurs de lait cru local. Un sondage préliminaire effectué sur 30 échantillons de lait individuel de vache (lait de quartiers) prélevé directement du pis à Abobo-N'dotré et de 10 échantillons de lait de pool du bidon du vendeur (lait de vente) à Abobo-Derrière-Rail et à l'abattoir de Port-Bouët a permis de déterminer le taux de contamination du lait par *B. cereus*. Ce taux était de 23,3 % (7/30) pour le lait de quartiers et de 30 % (3/10) pour le lait de vente. La taille minimum d'échantillon de lait a été calculée d'abord à l'aide de la **formule 2 (OMS, 1991)**.

$$n_0 = \frac{pq}{(E/1,96)^2}$$

**Formule 2**

Où  $n_0$  est taille de l'échantillon pour une population-mère indéfinie,  $p$  représente le taux de contamination du lait par *Bacillus cereus*,  $q = 100 - p$ ,  $E$  est la marge d'erreur tolérée (%) estimé ici à 5 %.

La taille minimum d'échantillon de lait de quartiers et le lait de vente calculée avec la formule est respectivement 272 et 323. Le nombre total de vaches laitières des éleveurs ayant accepté de participer à l'étude étant inférieur à la valeur calculée à l'aide de la formule 2, une correction a été faite en utilisant la **formule 3 (OMS, 1991)**.

$$n = \frac{n_0}{1 + \frac{(n_0 - 1)}{N}}$$

**Formule 3**

Où  $n$  est la taille minimum de l'échantillon nécessaire ;  $N$  est la taille de la population-mère.

Ainsi, la taille minimum d'échantillon de lait de quartiers calculée avec la **formule (3)** est de 83 tandis que celle du lait de vente est de 15. Compte tenu du fait qu'un seul passage de prélèvement est effectué, tous les vendeurs et les vaches laitières ont été

sélectionnés. Au total, 320 échantillons ont été prélevés (**tableau 5**). Il s'agissait de 150 échantillons de lait cru de vache dont 119 échantillons de lait de quartiers, 14 échantillons de lait de tank et 17 échantillons de lait de vente. Il y avait aussi 113 écouvillons de mamelles de vache, 22 écouvillons de mains des trayeurs, 15 échantillons d'eau de rinçage (100 mL) des ustensiles de traite, 15 échantillons de l'environnement (Air) et 5 échantillons d'eau de traite (100 mL d'eau provenant de la barrique de l'éleveur).

**Le lait de quartiers** est le lait traité des quatre pis (ou quartiers) d'une seule vache tandis que **le lait de tank** est le lait de l'ensemble des vaches d'une ferme, conditionné dans un tank ou bidon. **Le lait de vente** est le lait pris dans le bidon du vendeur sur les lieux de vente ou lait de pool du vendeur.

**Tableau 5 :** Répartition des échantillons provenant de la chaîne de production du lait par site de production et par marché

Nature de l'échantillon	Sites de prélèvement					Total
	Port-Bouët	Songon-té	Yopougon Lièvre-rouge	Abobo- Derrière-Rail	Abobo- N'dotré	
<b>Lait</b>	<b>28</b>	<b>10</b>	<b>40</b>	<b>7</b>	<b>65</b>	<b>150</b>
Lait de quartiers	21	9	33	0	56	119
Lait de tank	1	1	3	0	9	14
Lait de vente	6	0	4	7	0	17
<b>Autres</b>	<b>31</b>	<b>13</b>	<b>43</b>	<b>0</b>	<b>83</b>	<b>170</b>
Écouvillon surface des mamelles vaches	15	9	33	0	56	113
Écouvillon mains des trayeurs	5	1	5	0	11	22
Eau de rinçage des ustensiles de traite	4	1	2	0	8	15
Environnement (Air)	4	1	2	0	8	15
Eau de traite	3	1	1	0	0	5
<b>Total</b>	<b>59</b>	<b>23</b>	<b>83</b>	<b>7</b>	<b>148</b>	<b>320</b>

### 3.3.2. Prélèvement des échantillons de lait

Les prélèvements de lait ont été effectués tôt le matin entre 6 h 30 min et 8 h, d'Octobre 2008 à Septembre 2009. Pour déterminer les sources de la contamination du lait de vache par le groupe *B. cereus*, différents types d'échantillons ont été collectés de façon aseptique avant la traite. Un pot contenant 100 mL d'eau distillée stérile a été exposé pendant 15 min dans la zone où se déroulait la traite pour évaluer la pollution de l'environnement. Il a constitué l'échantillon de l'environnement (Air). Les ustensiles utilisés pour la traite ont été rincés avec 100 mL d'eau distillée stérile et l'eau de rinçage a été collectée dans un pot stérile pour évaluer la contamination des ustensiles de traite. Un écouvillon de la surface des mamelles et un autre des mains (nues) des trayeurs ont été collectés chacun dans 10 mL d'eau physiologique (1 ‰). Si l'éleveur disposait d'un récipient de stockage d'eau utilisée pour la traite, 100 mL de cette eau ont été collectés dans un pot de 150 mL et a constitué l'échantillon d'eau de traite.

Pour déterminer les points de contamination du lait par le groupe *B. cereus*, tout au long de la chaîne de production à la vente, des aliquotes de 100 mL de lait ont été prélevés dans des pots stériles de 150 mL. Il s'agissait du lait de quartiers, prélevé après le rejet des premiers jets de lait, du lait de tank et du lait de vente, prélevés après homogénéisation du lait contenu dans le bidon respectivement de l'éleveur et du vendeur. Immédiatement, tous les échantillons collectés ont été conservés à + 4 °C dans une glacière contenant des carboglaces et transportés au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire. Les analyses ont été effectuées dans les deux heures qui suivaient le prélèvement. La méthode de prélèvement est décrite dans **l'annexe 5**.

### 3.3.3. Détermination de paramètres physico-chimiques du lait

Les paramètres physico-chimiques du lait ont permis de déterminer si le lait est normal, mouillé ou écrémé/chauffé (**Annexe 6**).

#### 3.3.3.1. Détermination de la température du lait

La température du lait cru juste après la traite à la ferme et du lait de vente sur les marchés de vente a été mesurée en plongeant directement une sonde du thermomètre digital (thermomètre DT 150, Summit) dans 20 mL de lait. De plus, la température ambiante de la ferme et celle du lieu de vente du lait ont été déterminées au moment des prélèvements, en exposant une sonde d'un thermomètre digital (thermomètre DT 150,

Summit) à l'air libre pendant environ 2 min. Pour chaque mesure, la valeur de la température a été lue directement sur l'écran du thermomètre (**IDF, 1990**).

### 3.3.3.2. Détermination du pH du lait

Le pH du lait a été déterminé en plongeant directement l'électrode d'un pH-mètre (Microprocessor pH-Meter, pH 211, HANNA Instruments) dans 20 mL de lait. La valeur du pH a été lue sur l'écran du pH-mètre. Le pH a permis de définir la nature du lait (frais ou fermenté). Un lait normal a un pH neutre qui est compris entre 6,4 et 6,8 (**IDF, 1990**).

### 3.3.3.3. Détermination de la densité du lait à 20°C

Pour déduire les pratiques frauduleuses des vendeurs par ajout d'éléments extérieurs, la densité des échantillons du lait de pool de chaque vendeur a été déterminée selon la **formule 4** suivante :

$$d = \frac{m_l}{m_e}$$

**Formule 4 (Pointurier, 2003)**

Où  $d$  = densité du lait de pool du vendeur à 20 °C ;  $m_l$  = masse de 10 mL de lait de pool du vendeur;  $m_e$  = masse de 10 mL d'eau de robinet.

Lorsque la température du lait au moment de la mesure était supérieure à 20 °C, la densité calculée était augmentée de 0,0002 par degré au-dessus de 20 °C. Lorsque la température du lait au moment de la mesure était inférieure à 20 °C, la densité calculée était diminuée de 0,0002 par degré au-dessous de 20 °C.

Un lait normal a une densité à 20 °C comprise entre 1,028 et 1,032. Une densité inférieure à 1,028 indique l'ajout d'eau dans le lait (lait mouillé) alors qu'une densité supérieure à 1,032 indique que le lait a été chauffé ou écrémé.

### 3.3.3.4. Mise en évidence des résidus d'antibiotiques dans le lait

La mise en évidence de résidus d'antibiotique dans le lait de quartiers a été réalisée à l'aide du test de yaourt (**IDF, 1990 ; Bonfoh et al., 2003**). Un témoin négatif a été constitué avec 10 mL de lait en poudre testé négatif. Deux témoins positifs dont l'un contenait 10 mL de lait en poudre testé négatif additionné de 0,5 µg / mL d'oxytétracycline et l'autre 10 mL de lait en poudre testé négatif ajoutés de 0,04 UI / mL de pénicilline G,

ont été constitués. Un volume de 10 mL de lait de quartiers a été chauffé dans un bain-marie à 90 °C pendant 5 min et refroidi à 45 °C afin de réduire la charge bactérienne. Un mL de ferment (yaourt nature Danone) a été ajouté au tube contenant du lait de quartiers et à chacun des tubes témoins positifs. Chacun des 4 tubes a été additionné de 2 gouttes d'indicateur coloré (solution de bromocrésol pourpre) puis incubé pendant 3 heures à 45 °C. La coagulation du lait avec acidification du milieu (virage de l'indicateur du bleu au jaune) indiquent l'absence de résidus d'inhibiteurs de croissance (résidus de médicaments vétérinaires ou d'antibiotiques). L'absence de coagulation (lait liquide) et d'acidification (couleur bleu) indique la présence de résidus d'inhibiteurs de croissance ou d'antibiotiques.

#### 3.3.3.5. Qualité globale du lait

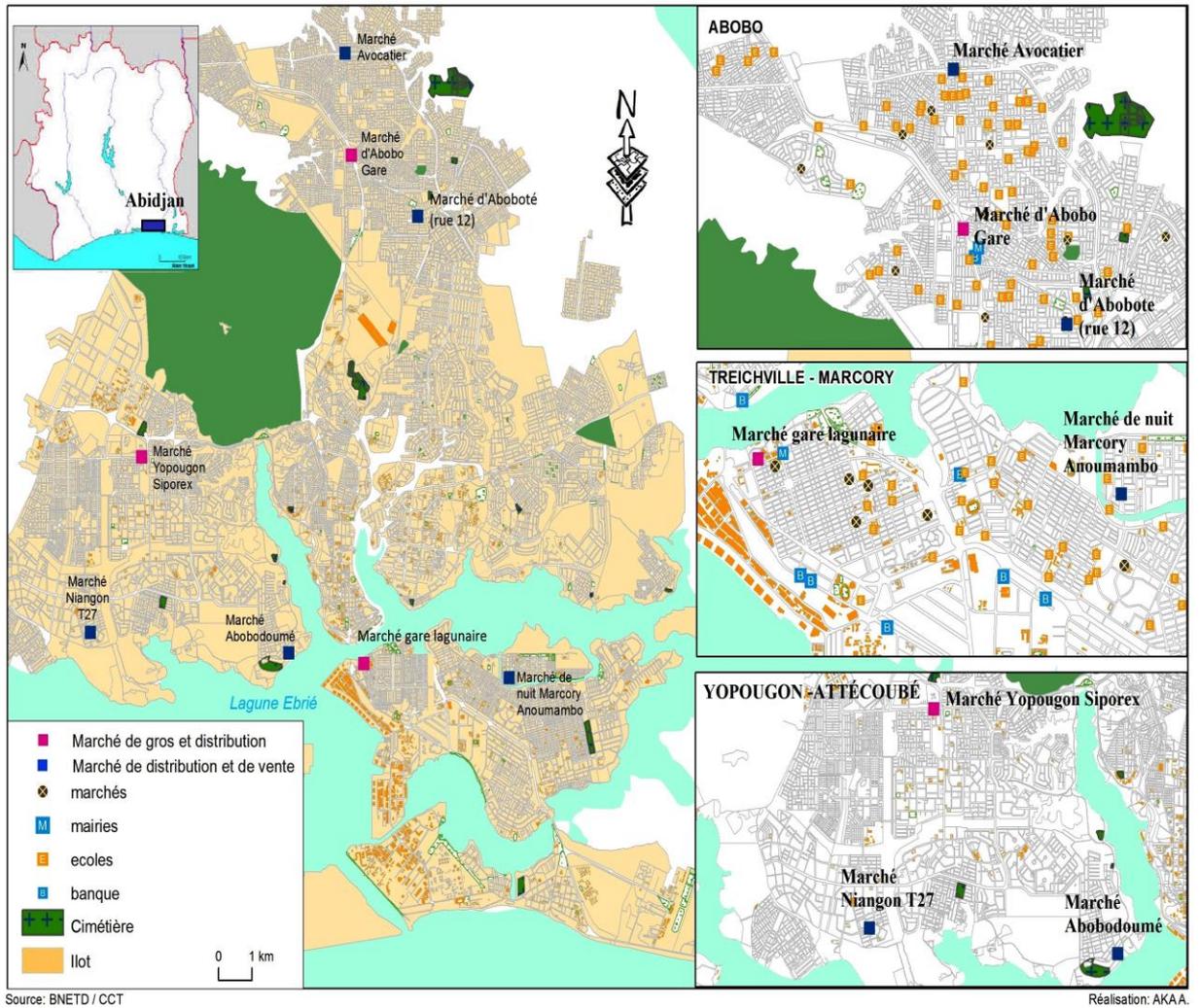
La contamination microbienne globale du lait a été déterminée par le test à la résazurine (IDF, 1990). Le réactif a été préparé en dissolvant un comprimé de résazurine dans 50 mL d'eau distillée stérile. Un millilitre de réactif de résazurine a été ajouté à 10 mL de lait cru et incubé à 37 °C pendant 1 à 3 heures avec une lecture à chaque heure. La couleur obtenue est fonction de la charge bactérienne du lait et détermine la qualité sanitaire du lait. Le lait est de bonne qualité, de qualité moyenne ou de mauvaise qualité si la couleur obtenue est respectivement bleue-mauve à bleu, rose ou blanc à clair.

### 3.4. Échantillonnage d'*attiéké*

#### 3.4.1. Sites d'étude

Trois marchés de distribution et de vente d'*attiéké* à Abidjan, notamment le marché de Siporex à Yopougon, le marché d'Abobo gare à Abobo et le marché de la gare lagunaire à Treichville ont été sélectionnés (**figure 6**) sur la base de leur importance dans la chaîne de distribution et de vente de l'*attiéké*.

Enfin, cinq quartiers ont été choisis au hasard pour le prélèvement d'échantillons d'*attiéké* vendu au détail aux abords des rues et devant les "maquis". Il s'agissait d'Avocatier et d'Aboboté à Abobo, d'Abobodoumé à Attécoubé, d'Anoumambo à Marcory et de Niangon sud à gauche à Yopougon (gare d'Azito).



**Figure 6 :** Carte d'Abidjan avec matérialisation des marchés de gros et demi-gros et des marchés informels de distribution et de vente d'*attiéké*

### 3.4.2. Taille des échantillons d'*attiéké*

La taille des échantillons d'*attiéké* a été calculée en utilisant la **formule (2)**. Pour déterminer le taux de contamination de l'*attiéké* par le groupe *B. cereus*, un sondage a été effectué sur 30 échantillons d'*attiéké* collectés aux marchés de Siporex et d'Abobo gare. Les résultats ont donné une prévalence de 26,7 % qui a été utilisée pour calculer le nombre d'échantillons d'*attiéké* prélevés. Les calculs ont donné une taille minimale de 301 échantillons d'*attiéké*. Ce nombre d'échantillons a été réparti sur l'ensemble des sites de prélèvement susmentionnés. Un échantillon d'*attiéké* a été prélevé par producteur et par vendeur. Au total, 16 échantillons de 500 g d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons de 500 g d'*attiéké* en vente conditionnés dans un sachet en plastique ont été retenus (**tableau 6**). Les échantillons d'*attiéké* prélevés sur les marchés étaient constitués de 153 échantillons d'*attiéké* en vente un à deux jours après production et de 153 échantillons d'*attiéké* de trois à cinq jours de vente.

**Tableau 6 :** Répartition des échantillons d'*attiéké* par site de production et par marché

Communes	Sites	Nombre d'échantillons d' <i>attiéké</i> fraîchement préparé	Nombre d'échantillons d' <i>attiéké</i> en vente sur le marché
Abobo	Marché d'Abobo Gare	-	40
	Avocatier	4	30
	Marché d'Aboboté*	-	30
Yopougon	Azito	4	-
	Marché de Yopougon Siporex	-	50
	Marché de Niangon sud à gauche	-	40
Marcory	Anoumambo	4	30
Attécoubé	Abobodoumé	4	41
Treichville	Gare lagunaire Treichville	-	45
<b>Total</b>		<b>16</b>	<b>306</b>

(-) : uniquement marché de vente d'*attiéké* ou uniquement site de production d'*attiéké*

### 3.4.3. Prélèvement des échantillons d'*attiéké*

Pour évaluer la contamination post-cuisson et la qualité sanitaire, 500 g d'*attiéké* fraîchement préparé ont été prélevés à l'aide d'une spatule stérile et conditionnés dans des sachets Stomacher stériles dans les conditions aseptiques. En outre, des échantillons d'*attiéké* en vente, de masse variant de 174 à 1368 g, conditionnés dans des sachets plastiques (**boule d'*attiéké*, figure 7**), ont été collectés sur les différents marchés ou dans les quartiers proches des zones de production.

Pour déterminer l'origine de la contamination de l'*attiéké* vendu sur les marchés à Abidjan, des échantillons ont été prélevés des sachets Stomacher stériles aux différentes étapes de la chaîne de production de l'*attiéké*. Il s'agit de 500 g de racine fraîche de manioc (Cossette de manioc), de 500 g de ferment, de 100 mL d'huile de palme décolorée, de 500 g de pâte de racine de manioc broyée (ferment + racine fraîche de manioc + huile de palme décolorée), de 500 g de pâte de manioc fermentée, de 500 g de pâte de manioc fermentée pressée et de 500 g de pâte de manioc fermentée pressée et séchée (PMFPS).

Un pot contenant 100 mL d'eau stérile a été exposé pendant 15 min (échantillon d'air ou de l'environnement) pour évaluer la pollution de l'environnement. Avant le lavage des cossettes, 100 mL d'eau utilisée pour le lavage des cossettes ont été collectés. Les échantillons ont été transportés à + 4 °C dans une glacière contenant des carboglaces, au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire et analysés dans l'heure.



**Figure 7 :** Échantillons d'*attiéké* conditionné en sachets plastiques pour la vente au détail

### 3.4.4. Détermination de paramètres physico-chimiques de l'*attiéké*

#### 3.4.4.1. Détermination du temps et de la température de cuisson de l'*attiéké*

Au cours de la production de l'*attiéké*, le temps de cuisson a été déterminé à l'aide d'un chronomètre (Chronomètre C300B, France). La température de cuisson de l'*attiéké* a été mesurée à la surface et au cœur du couscoussier à la cuisson. De même, la température de l'*attiéké* fraîchement préparé à la sortie du couscoussier, de l'*attiéké* une heure après la sortie du couscoussier et de l'*attiéké* vendu sur le marché a été déterminée à l'aide d'un thermomètre à alcool (Total IMM, VWR, Paris, France).

#### 3.4.4.2. Détermination du pH de l'*attiéké*

Pour déterminer le pH de l'*attiéké*, 10 g d'*attiéké* prélevés à différents endroits de l'unité d'échantillonnage ont été homogénéisés à l'aide d'un Stomacher (Colworth 400, Angleterre), dans 90 mL d'eau distillée stérile. L'homogénéisat a été filtré puis 10 mL du filtrat ont été utilisés pour la mesure du pH en y plongeant l'électrode d'un pH-mètre (Microprocessor pH-Meter, pH 211, HANNA Instruments). La valeur du pH a été directement lue sur l'écran du pH-mètre.

#### 3.4.4.3. Détermination du taux d'humidité de l'*attiéké*

Le taux d'humidité de l'*attiéké* fraîchement préparé et de l'*attiéké* prélevé sur les marchés a été déterminé par dessiccation dans une étuve isotherme à  $105 \pm 5$  °C jusqu'à masse constante (**24 ± 1 h ; Kimaryo et al., 2000**). La différence de masse avant et après séchage a été utilisée pour la mesure du taux d'humidité qui a été exprimé en pourcentage de masse (**Annexe 7**).

Un creuset en verre a été séché à l'étuve à  $105 \pm 5$  °C pendant 15 min puis refroidi dans un dessiccateur pendant 45 min et pesé ( $m_0$ ). Le creuset contenant 10 g d'*attiéké* a été à nouveau pesé ( $m_1$ ) et séché à l'étuve à  $105 \pm 5$  °C jusqu'à l'obtention d'une masse constante (24 ± 1 h). Après refroidissement pendant 45 min au dessiccateur, le creuset contenant l'échantillon séché a été pesé ( $m_2$ ). Les mesures ont été effectuées en double. La teneur en eau ou taux d'humidité de l'*attiéké* a été calculée suivant la **formule 5**.

$$T_{\text{H}_2\text{O}} = \left( \frac{m_1 - m_2}{m_1 - m_0} \right) \times 100$$

**Formule 5**

Avec  $T_{H2O}$  = Taux d'humidité,  $m_0$  = masse vide du creuset en verre,  $m_1$  = masse totale de l'échantillon + le creuset en verre,  $m_2$  = masse totale de l'échantillon sec + le creuset en verre.

### 3.5. Isolement et identification du groupe *Bacillus cereus*

La phase d'isolement et d'identification présomptive du groupe *B. cereus* a été réalisée au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire.

#### 3.5.1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales

Le lait étant liquide, il constitue la suspension mère. Pour cette étude, la suspension mère de lait a été obtenue en prélevant après homogénéisation, dans un tube à essai stérile, un aliquot de 10 mL de lait auprès de la flamme d'un bec Bunsen.

Un écouvillon des mains des trayeurs ou de la peau des mamelles, émulsionné dans 10 mL d'eau physiologique a été considéré comme étant une suspension mère.

Pour l'*attiéké*, une suspension au 1 : 10 a été préparée en constituant 10 g d'*attiéké* par prélèvement de petites portions à différents endroits de l'échantillon, puis homogénéisés pendant 3 min avec 90 mL d'eau peptonée 0,1 % (Oxoid LTD, Angleterre) dans un sachet Stomacher à l'aide d'un Stomacher (Colworth 400, Angleterre). Un volume de 10 mL du surnageant a été recueilli dans un tube à essai et a constitué la suspension mère qui a servi à la préparation des dilutions décimales.

Pour la recherche de spores du groupe *B. cereus*, 15 mL de la solution mère ont été prélevés dans un tube à essai et chauffés à 80 °C (température interne) sous agitation pendant 10 min dans un bain-marie, puis immédiatement refroidis pendant 5 min sur un bain de glace broyée.

À partir de chacune des suspensions mères obtenues (lait et *attiéké*) et de la suspension ayant fait l'objet du traitement thermique, des dilutions décimales successives jusqu'à  $10^{-4}$  ont été obtenues en ajoutant à chaque fois, 1 mL de la dilution inférieure dans 9 mL d'eau peptonée 0,1 % selon la norme NF V 08-010 (AFNOR, 1996).

#### 3.5.2. Isolement et dénombrement des bactéries du groupe *Bacillus cereus*

L'isolement et le dénombrement du groupe *B. cereus* dans le lait et dans l'*attiéké* s'est effectué selon la norme NF EN ISO 7932 (ISO 7932, 2004). Un millilitre de la suspension mère, de la suspension ayant fait l'objet du traitement thermique ainsi que de

chacune des dilutions décimales successives jusqu'à  $10^{-4}$  (non chauffé et chauffé) a été étalé à la surface d'une boîte de Petri, contenant 15 mL de gélose Mossel (Merck, Allemagne) préalablement coulés et séchés, puis incubé à  $30 \pm 1$  °C pendant 18 – 24 heures. Les suspensions mères, la suspension ayant fait l'objet du traitement thermique et les dilutions décimales successives ont étéensemencées en double.

Sur ce milieu, *les colonies caractéristiques du groupe B. cereus sont rugueuses, sèches, roses (mannitol négatif), entourées d'un halo de précipitation de couleur rose et d'une zone transparente indiquant la production d'une lécithinase.*

Les colonies caractéristiques ont été entourées puis comptées et notées. Les boîtes ont été incubées pendant 24 heures à la température du laboratoire et puis comptées à nouveau lorsque les colonies n'étaient pas bien visibles. Les boîtes contenant moins de 150 colonies ont été retenues.

#### 3.5.2.1. Identification des isolats présomptifs du groupe *Bacillus cereus*

L'identification des colonies présomptives des bactéries du groupe *Bacillus cereus* s'est effectuée par caractérisation morphologique et par la réalisation de tests biochimiques de caractérisation complémentaires en remplacement du test d'hémolyse. Ainsi, cinq colonies caractéristiques bien isolées, par boîte retenue, ont étéensemencées en doubles par stries sur gélose Plate Count Agar (PCA, Merck, Allemagne) pour une purification. Ainsi, les colonies purifiées ont été utilisées pour la réalisation de quelques tests biochimiques. Les caractères morphologiques recherchés ont été la morphologie et le mode de groupement par l'observation microscopique d'une lame de frottis (x 100), la coloration de Gram par le test de l'hydroxyde de potassium à 3 % (KOH) et le type de mobilité par observation microscopique (x 40) d'un bouillon de cultures (bouillon cœur cerveau) de 3 heures.

Le test de l'hydroxyde de potassium à 3 % (KOH) est basé sur le fait que la paroi des bactéries à Gram négatif est lysée par le KOH, alors que celle des bactéries à Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries à Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui forme une substance visqueuse au contact du KOH (**Annexe 6**).

Les caractères biochimiques recherchés ont concerné la production d'une catalase avec 3 % d'eau oxygénée, la fermentation du glucose en anaérobiose sur la gélose Kligler-Hajna (Bio-Rad, France), l'hydrolyse des lécithines par la lécithinase sur la gélose à l'œuf (Bio-Rad, France), l'utilisation ou non du mannitol sur gélose mannitol-mobilité (Bio-Rad,

France) et l'utilisation du citrate comme seule source de carbone sur la gélose citrate de Simmons (**Bio-Rad, France ; Annexe 6**).

*Les espèces du groupe *B. cereus* sont des bacilles à Gram positif souvent groupées en chaînette, lécithinase positif, catalase positif, généralement mobiles grâce à une ciliature péritriche (sauf *B. anthracis* qui est immobile), mannitol négatif et citrate positif.*

Après l'identification présomptive des isolats, le dénombrement moyen a été calculé selon les **formules 6 et 7 (ISO 7218, 2007)**.

$$C = \frac{b}{A} \times N_p$$

**Formule 6**

Où *C* est le nombre de colonies par boîtes retenues après identification biochimique, *b* est le nombre de colonies confirmées du groupe *B. cereus*, *A* est le nombre total de colonies présumées du groupe *B. cereus* testé, *N<sub>p</sub>* est le nombre de colonies comptées présumées du groupe *B. cereus* en UFC/g ou UFC/mL.

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

**Formule 7**

Où *n<sub>1</sub>* est le nombre de boîtes de la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées. *n<sub>2</sub>* est le nombre de boîtes de la dilution qui précède la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées. *d* est le taux de dilution de la première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées. *N* est le dénombrement moyen du groupe *B. cereus* en UFC/g ou UFC/mL.  $\sum C$  est la somme des colonies dans toutes les boîtes retenues après identification biochimique.

Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont été conservés à -20 °C et -80 °C en double dans du lait écrémé stérile contenant 0,2 % d'extrait de levure et 30 % de glycérol (**Saidi et al., 2002**).

### 3.5.2.2. Formulation de l'interprétation des résultats microbiologiques

La qualité microbiologique du lait a été déterminée par l'application combinée de deux normes européennes (**Communauté Européenne, 2007b ; Anonyme 2, 2011**). Pour l'*attiéké*, en plus des deux normes européennes suscitées, la norme ivoirienne NI 484 (**NI**

484, 2013) a été utilisée. Ainsi, *B. cereus* étant considéré comme un pathogène du groupe de risque 2, la formulation de l'interprétation des dénombrements a été basée sur celle d'un plan à 3 classes avec  $m = 1,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g),  $M = 2,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) et  $D_i = 5 \log$  (UFC/mL) ou  $5 \log$  (UFC/g) (Communauté Européenne, 2007b).

$m$  représente des concentrations acceptables de microorganismes. La valeur numérique de  $m$  sert à distinguer les produits de qualité satisfaisante ou acceptable de ceux qui sont de qualité médiocre.

$M$  représente des concentrations inacceptables de microorganismes, présentant des conditions d'insalubrité ou d'avarie. La valeur numérique de  $M$  permet de distinguer les produits de qualité médiocre de ceux qui sont de qualité insatisfaisante présentant un risque pour le consommateur.

$D_i$  représente la dose infectieuse. Elle permet de distinguer les produits présentant un risque pour le consommateur de ceux qui présentent un risque réel ou élevé pour le consommateur lorsque la valeur numérique de  $M$  est dépassée.

L'échantillon est de qualité microbiologique satisfaisante ou acceptable si le nombre de formes végétatives dénombrées est inférieur ou égal à  $1,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) et le nombre de spores est inférieur à  $1,0 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g). Il est de qualité microbiologique marginale ou médiocre lorsque tous les dénombrements (formes végétatives et/ou de spores) sont supérieurs à  $1,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) sans dépasser  $2,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) ( $1,7 < N \leq 2,7$ ). La qualité microbiologique est qualifiée d'insatisfaisante ou inacceptable avec un risque pour la santé humaine lorsque tous les dénombrements (formes végétatives et/ou de spores) sont supérieurs à  $2,7 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) sans dépasser  $5 \log$  (UFC/mL) ou  $\log$  (UFC/g) ( $2,7 < N < 5$ ). Enfin, la qualité microbiologique est insatisfaisante ou inacceptable avec un risque élevé pour la santé humaine lorsque tous les dénombrements (formes végétatives et/ou de spores) sont supérieurs à la dose infectieuse qui est égale à  $5 \log$  (UFC/mL).

### 3.5.3. Identification par réaction de polymérisation en chaîne

L'identification présomptive du groupe *B. cereus* a été effectuée au laboratoire de biotechnologie alimentaire de l'École Polytechnique Fédérale de Zürich (ETH Zürich), en Suisse de Novembre 2010 à Août 2011. Le transport des isolats a été effectué dans un

milieu stock semi-solide maison composé de 5 g d'extrait de viande, 10 g de peptone, de 5 g de NaCl, de 10 g d'agar (pour 1 litre) additionné de 10 % de glycérol stérile.

Le groupe *B. cereus* étant constitué de six espèces génétiquement proches, l'identification biochimique ne permettait pas de différencier les différentes espèces (**Dromigny, 2008**). Une identification par polymérisation en chaîne a complété l'identification biochimique selon les méthodes décrites par **Park et al. (2007)** et **Oliwa-Stasiak et al. (2010)**.

Pour l'identification moléculaire, un seul isolat a été utilisé par échantillon positif. Au total 184 isolats présomptifs du groupe *B. cereus* dont 94 de la filière lait et 90 de l'*attiéké* (12 de l'*attiéké* fraîchement préparé et 78 de l'*attiéké* en vente) ont fait l'objet d'une caractérisation moléculaire (**tableau 7**). L'identification moléculaire des espèces du groupe *B. cereus* a été décrite en quatre étapes, notamment l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification d'une région spécifique du gène *16S rADN*, l'amplification d'un fragment spécifique du gène flagellaire *motB* caractéristique du groupe *B. cereus* et des gènes *gyrB* correspondant à chaque espèce (**Annexe 7**).

**Tableau 7** : Répartition des isolats présomptifs du groupe *Bacillus cereus* étudiés

Origines	Nombre d'isolats		Total
	Filière laitière	Filière <i>attiéké</i>	
Lait de quartiers	24	-	24
Lait de tank	3	-	3
Lait de vente	3	-	3
Écouvillon Mamelle	48	-	48
Écouvillon Mains Trayeur	8	-	8
Eau de rinçage ustensiles de traite	3	-	3
Environnement Air	4	-	4
Eau de traite	1	-	1
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	-	12	12
<i>Attiéké en vente</i>	-	78	78
<b>Totaux</b>	<b>94</b>	<b>90</b>	<b>184</b>

(-) : pas d'isolats présomptifs

### 3.5.3.1. Extraction de l'ADN génomique

Les isolats présomptifs des bactéries du groupe *B. cereus* ont été revivifiés dans 10 mL d'eau peptonée 0,1 % (Oxoid LTD, Angleterre) pendant une nuit à 30 °C. Le bouillon de culture a été ensemencé par stries sur une boîte de gélose Mossel (Merck, Allemagne) préalablement coulée, puis incubé à 30 °C pendant 18-24 heures. Une colonie bien isolée a été purifiée par un ensemencement en stries sur une gélose Plate Count Agar (PCA, Merck, Allemagne) et incubée à 30 °C pendant 18-24 h.

L'ADN génomique a été extrait par lyse thermique selon la méthode décrite par **Goldenberger *et al.* (1995)** avec une légère modification. Selon la taille des colonies sur la gélose PCA (Merck, Allemagne), 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées et triturées dans 0,2 mL de tampon Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl à pH 8 ; 1 mM EDTA ; 0,5 % SDS et 200 µg/mL de protéinase K) dans les microtubes de 1,5 mL (Eppendorf, France). Le mélange a été mixé puis incubé à 55 °C pendant 3 heures avec agitation (Thermomixer, Eppendorf). Après l'inactivation thermique de la protéinase K (Applichem, Germany) à 95 °C pendant 10 min, les tubes ont été refroidis à 4 °C sur de la glace pendant 5 min puis centrifugés à 20'000 x g à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN a été recueilli dans un cryotube stérile. La concentration (ng/µL) et la pureté de l'ADN ont été déterminées respectivement à 260 nm et à 280 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Nano-drop ND-100 Spectrophotometer). Un volume de 50 µL d'ADN génomique obtenu a été dosé grâce à un spectrophotomètre d'absorption moléculaire (Nano-drop ND-100 Spectrophotometer). L'absorbance de l'ADN génomique a été mesurée dans le spectre de la lumière Ultraviolette (UV) de 220 à 300 nm. L'ADN a été dilué avec de l'eau Milli-Q stérile afin d'obtenir une concentration voisine de 100 ng/µL. L'ADN dilué a été conservé à -20 °C et a servi de matrice d'ADN pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR). La valeur de rapport  $A_{260\text{ nm}}/A_{280\text{ nm}}$  d'un ADN pur est comprise entre 1,8 et 2 en termes d'absorbance.

### 3.5.3.2. Préparation du mélange réactionnel (*mix*)

Le mélange réactionnel a été préparé comme décrit précédemment par **Zhou *et al.* (2008)** et **Oliwa-Stasiak *et al.* (2010)** avec une légère modification. Le mélange réactionnel de 25 µL était composé d'eau Milli-Q stérile, de 2 % de Tween 20 (Sigma, Suisse), de 12,5 µL de PCR Master Mix 2X (4mM MgCl<sub>2</sub>, 0,4 mM de chaque dNTPs, 0,05 mM Taq polymérase ; Fermentas, Suisse), de 1 µM de chaque amorce (Microsynth, Balgach, Suisse) et de 1 µL de la matrice d'ADN. Les PCRs multiplex étaient réalisées

avec un mélange réactionnel de 30 µL constitué de 15 µL de PCR Master Mix 2X, de 5 µL de matrice d'ADN et des autres réactifs susmentionnés. Un témoin négatif contenant 1 µL d'eau Milli-Q stérile à la place de matrice d'ADN et l'ADN des souches de référence utilisées pour le contrôle positif ont été inclus dans chaque réaction PCR.

#### 3.5.3.3. Amplification du gène *16S rADN*

L'amplification du gène *16S rADN* s'est effectuée à l'aide du couple d'amorces bak4 et bak11 (**tableau 8**). Elle a été réalisée selon la méthode décrite par **Schwenninger et al. (2005)** dans un thermocycleur (T3000 Thermocycler, Block type standard 3a, Biometra, Allemagne) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 3 min à 95°C suivie d'une phase cyclique répétée 40 fois. Chaque cycle d'amplification était constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95 °C, d'une étape de fixation (hybridation) des amorces de 30 secondes à 60 °C et d'une étape d'élongation de 2 min à 72 °C. La réaction était terminée par une élongation finale de 7 min à 72 °C. Les échantillons étaient conservés à +4 °C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

#### 3.5.3.4. Détection du groupe *Bacillus cereus*

La détermination du groupe *Bacillus cereus* s'est effectuée par amplification d'un fragment spécifique du gène flagellaire *motB*, caractéristique du groupe. L'amplification du gène *motB* s'est effectuée à l'aide du couple d'amorces BCFomp1 et BCRomp1 (**tableau 8**). Elle a été réalisée selon la méthode décrite par **Oliwa-Stasiak et al. (2010)** dans un thermocycleur (T3000 Thermocycler, Block type standard 3a, Biometra, Allemagne) selon le programme suivant : une dénaturation initiale de 5 min à 94 °C suivie d'une phase cyclique répétée 30 fois. Chaque cycle d'amplification était constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 94 °C, d'une étape de fixation des amorces d'une minute à 54,5 °C et d'une étape d'élongation d'une minute à 72 °C. La réaction était terminée par une élongation finale de 5 min à 72 °C. Les échantillons étaient conservés à +4° C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

#### 3.5.3.5. Détection des espèces du groupe *Bacillus cereus*

L'ADN des échantillons positifs à l'amplification de la région spécifique de gène *motB* a été utilisé pour distinguer *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. mycoides* par PCR multiplex (**Park et al., 2007**). Le programme d'amplification comprenait une dénaturation initiale de 5 min à 95 °C suivie d'une phase cyclique répétée

30 fois. Chaque cycle d'amplification était constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95 °C, d'une étape de fixation des amorces de 30 secondes à 63 °C et d'une étape d'élongation de 30 secondes à 72 °C (**tableau 8**). La réaction était terminée par une élongation finale de 5 min à 72 °C. Les échantillons étaient conservés à +4 °C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur.

#### 3.5.3.6. Analyse électrophorétique des produits d'amplification

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 %. Un volume de 10 µL de chaque produit PCR mélangé dans 2 µL d'un colorant de charge (20 % orange G, 60 % de glycérol) a été migré horizontalement dans un tampon TAE 1X pH 8,0 (0,89 mol/L de Tris-base, 20 mmol/L EDTA, 0,89 mol/L d'acide acétique) pendant 1 h 30 min à 90 V. Les gels ont été colorés dans un tampon TAE 1X contenant 2,5 mg/L d'une solution de bromure d'éthidium puis lavés à l'eau distillée, visualisés par illumination sur une plaque UV d'un dispositif d'éclairage et photographiés (Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+, Bio-Rad). Les amplicons des gènes *gyrB* ont été révélés sur un gel d'agarose de 2,5 % pendant 25 min à 100 V. Un volume de 5 µL d'un marqueur de masse moléculaire (TriDye<sup>TM</sup>, 100 pb DNA Ladder, Biolabs) a été inclus dans tous les gels pour estimer la taille des bandes d'ADN.

### 3.6. Recherche des gènes de virulence du groupe *Bacillus cereus*

Les espèces du groupe *B. cereus* ont été testées pour la mise en évidence des gènes des entérotoxines responsables du syndrome diarrhéique (*hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *cytK*, *cytK1*, *cytK2* et *bceT*) et du gène de la toxine émétique appelé "céréulide" (*ces*) responsable du syndrome émétique. Les amplifications ont été réalisées par simple PCR ou par une PCR multiplex en fonction de la température d'hybridation des couples d'amorces utilisés (**tableau 9**). Les PCRs multiplex ont concerné les gènes *hblA*, *nheA* et *bceT*, les gènes *nheB* et *nheC* et les gènes *hblC* et *hblD*. En outre, parmi les isolats qui hébergeaient le gène *cytK*, une discrimination des deux formes différentes de la cytotoxine K, constituées par les gènes *cytK-1* et *cytK-2*, a été effectuée en utilisant la méthode décrite par **Guinebretiere et al. (2006)**. Toutes les amorces (Microsynth, Balgach, Suisse) utilisées et les programmes d'amplification ainsi que la taille des amplicons sont consignés dans le **tableau 9**. Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose 1,5 % comme susmentionné.

**Tableau 8 :** Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'identification des espèces du groupe *Bacillus cereus* et leur programme d'amplification

Gènes cibles	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille des amplicons (pb)	Température hybridation (°C)	Références
<i>16S</i> rADN des eubactéries	bak4	AGGAGGTGATCCARCCGCA	95 °C, 3 min	~1500	60	Schwenninger <i>et al.</i> (2005)
	bak11w	AGTTTGATCMTGGCTCAG	40 x [95 °C, 15 s; 60 °C, 30 s; 72 °C, 120 s] 72 °C, 7 min			
<i>motB</i>	BCFomp 1	ATCGCCTCGTTGGATGACGA	94 °C, 5 min	575	54,5	Oliwa-Stasiak <i>et al.</i> (2010)
	BCRomp 1	CTGCATATCCTACCGCAGCTA	30 x [94 °C, 30 s; 54,5 °C, 60 s; 72 °C, 60 s] 72 °C, 7 min			
<i>gyrB</i> de <i>B.</i> <i>anthracis</i>	BASH-2F	GGTAGATTAGCAGATTGCTCTT CAAAAGA		253	63	Park <i>et al.</i> (2007)
	BASH-2R	ACGAGCTTTCTCAATATCAAAA TCTCCGC				
<i>gyrB</i> de <i>B.</i> <i>cereus sensu</i> <i>stricto</i>	BCJH-F	TCATGAAGAGCCTGTGTACG	94 °C, 5 min	475	63	Park <i>et al.</i> (2007)
	BCJH-1R	CGACGTGTCAATTCACGCGC	30 x [94 °C, 30 s; 63 °C, 30 s; 72 °C, 30 s]			
<i>gyrB</i> de <i>B.</i> <i>mycoides</i>	BMSH-F	TTTTAAGACTGCTCTAACACGT GTAAT	72 °C, 5 min	604	63	Park <i>et al.</i> (2007)
	BMSH-R	TTCAATAGCAAAATCCCCACCA AT				
<i>gyrB</i> of <i>B.</i> <i>thuringiensis</i>	BTJH-1F	GCTTACCAGGGAAATTGGCAG		299	63	Park <i>et al.</i> (2007)
	BTJH-R	ATCAACGTCGGCGTCGG				

**Tableau 9** : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour la détection des gènes de virulence des espèces du groupe *Bacillus cereus* et leur programme d'amplification

Gènes de virulence	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille amplicon (pb)	Température hybridation (°C)	Références
<i>bceT</i>	ETF	TTACATTACCAGGACGTGCTT	94 °C, 2 min	428	56	Minnaard <i>et al.</i> (2007)
	ETR	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG	35 x [94 °C, 60 s; 56 °C, 60 s; 72 °C, 120 s]			
<i>hblA</i>	HBA F	AAGCAATGGAATACAATGGG	72 °C, 5 min	1154	56	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	HBA R	AGAATCTAAATCATGCCACTG				
<i>nheA</i>	NHA F	GTTAGGATCACAATCACCGC		755	56	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	NHA R	ACGAATGTAATTTGAGTCGC				
<i>hblC</i>	HBC F	GATACTCAATGTGGCAACTGC	94 °C, 2 min	740	58	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	HBC R	TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG	35 x [94 °C, 60 s; 58 °C, 60 s; 72 °C, 120 s]			
<i>hblD</i>	HBD F	ACCGGTAACACTATTCATGC	72 °C, 5 min	829	58	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	HBD R	GAGTCCATATGCTTAGATGC				
<i>nheB</i>	NHB F	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC	94 °C, 2 min	743	54	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	NHB R	TTAATGTTTCGTTAATCCTGC	35 x [94 °C, 60 s; 54 °C, 60 s; 72 °C, 120 s]			
<i>nhe C</i>	NHC F	TGGATTCCAAGATGTAACG	72 °C, 5 min	683	54	Guinebretiere <i>et al.</i> (2002)
	NHC R	ATTACGACTTCTGCTTGTGC				

Tableau 9 (Suite)

<i>Gènes</i>	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille amplicon (pb)	Température hybridation (°C)	Références
<i>cytK</i>	CKF	ACAGATATCGG(G,T)CAAAATGC	30 x [94 °C, 15 s; 54 °C, 30 s; 72 °C, 30 s] 72 °C, 7 min	809	54	Guinebretiere <i>et al.</i> <b>(2006)</b>
	CKR	TCCAACCCAGTT(A,T)(GC)CAGTTC				
<i>cytK1</i>	CK1F	CAATTCCAGGGGCAAGTGTC	30 x [94 °C, 15 s; 57 °C, 30 s; 72 °C, 30 s] 72 °C, 7 min	426	57	Guinebretiere <i>et al.</i> <b>(2006)</b>
	CK1R	CCTCGTGCATCTGTTTCATGAG				
<i>cytK2</i>	CK2F	CAATCCCTGGCGCTAGTGCA	72 °C, 7 min	585	57	Guinebretiere <i>et al.</i> <b>(2006)</b>
	CK2R	GTGIAGCCTGGACGAAGTTGG				
<i>ces</i>	CES F1	GGTGACACATTATCATATAAGGTG	5 x [95 °C, 60 s; 53° C, 75 s; 72° C, 50 s] 25 x [95 °C, 60 s; 58 °C, 75 s; 72 °C, 50 s] 72 °C, 5 min	1271	58	Ehling-Schulz <i>et al.</i> <b>(2005)</b>
	CES R2	GTAAGCGAACCTGTCTGTAACAACA				

**pb:** paire de bases

### 3.7. Détermination de la résistance aux antibiotiques

Un antibiogramme du groupe *B. cereus* a été réalisé sur gélose Mueller-Hinton (Bioline and BD, Suisse) et selon la méthode classique de diffusion en gélose (CA-SFM, 2010). Un total de 12 disques imprégnés d'antibiotiques (Becton, Dickinson and Company, Suisse) a été testé. Il s'agissait de : Ampicilline (10 µg), Pénicilline (10 U), Céfépime (30 µg), Chloramphénicol (30 µg), Ciprofloxacine (5 µg), Clindamycine (2 µg), Vancomycine (30 µg), Gentamicine (10 µg), Imipénème (10 µg), Tétracycline (30 µg), Triméthoprim-Sulfaméthoxazole (1.25 µg/23.75 µg) et Érythromycine (15 µg).

À partir d'une culture pure de 18 à 24 heures réalisée sur gélose nutritive (Bioline and BD, Suisse), une suspension équivalente au standard McFarland 0,5 ( $\sim 10^8$  UFC/mL) a été préparée en émulsionnant 2 à 3 colonies prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans un tube à essai contenant 10 mL de solution saline stérile (0,9 % NaCl). Cette suspension obtenue a constitué la solution mère et a été diluée au 1/1000<sup>ème</sup>.

La gélose Mueller-Hinton (Bioline and BD, Suisse) préalablement coulée en boîtes de Pétri (120 mm de diamètre) a été séchée pendant 30 min à 37 °C en gardant les boîtes entrouvertes pour faciliter l'évaporation complète de toute trace d'eau. L'ensemencement a été effectué par inondation avec l'inoculum dilué au 1/1000<sup>ème</sup>. Des mouvements de rotation dans les deux axes imprimés par la main ont été effectués avec la boîte de Pétri pour accélérer le recouvrement. L'excès de l'inoculum est aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur stérile après inclinaison de la boîte afin d'éliminer tout résidu d'inoculum. Les boîtes inoculées ont été refermées et séchées à température ambiante sur la pailleuse pendant 15 min.

Les disques imprégnés d'antibiotique ont été posés à l'aide d'une pince fine stérile. Ils ont été appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Une distance minimale de 15 mm sépare un disque périphérique du bord de la boîte et deux disques étaient éloignés au minimum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas. Les boîtes ont été séchées à la température ambiante pendant 30 min pour la pré-diffusion puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures, couvercle renversé afin d'éviter que l'eau de condensation ne tombe dans la boîte pour contaminer et/ou diluer les disques imprégnés d'antibiotique. Un contrôle négatif sans antibiotique et un contrôle positif avec les souches de référence susmentionnées, ont été réalisés et incubés dans les mêmes conditions. Les zones d'inhibition, comprenant le

diamètre de l'antibiotique, ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les diamètres ont été interprétés en suivant les recommandations du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**tableau 10 ; CA-SFA, 2010**).

**Tableau 10 :** Molécules d'antibiotiques, diamètres critiques et lecture interprétative pour l'antibiogramme du groupe *Bacillus cereus*.

Familles	Antibiotiques	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques	
			S	R
<b>Pénicillines*</b>	Ampicilline	10	≥ 21	< 16
	Pénicilline	10 U	≥ 29	< 18
<b>Céphalosporines*</b>	Céfépime	30	≥ 21	< 19
<b>Carbapénèmes*</b>	Imipenème	10	≥ 24	< 17
<b>Phénicoles</b>	Chloramphénicol	30	≥ 23	< 19
<b>Fluoroquinolones</b>	Ciprofloxacine	5	≥ 25	< 22
<b>Lincosamides</b>	Clindamycine	2	≥ 15	< 15
<b>Macrolides</b>	Érythromycine	15	≥ 22	< 17
<b>Aminosides</b>	Gentamicine	10	≥ 18	< 16
<b>Tétracyclines</b>	Tétracycline	30	≥ 19	< 17
<b>Sulfamides-Triméthoprime</b>	Triméthoprime +			
	Sulfametoxazole	1,255 / 23,75	≥ 16	< 10
<b>Glycopeptides</b>	Vancomycine	30	≥ 17	nd

\* β-lactamines

nd : non déterminé

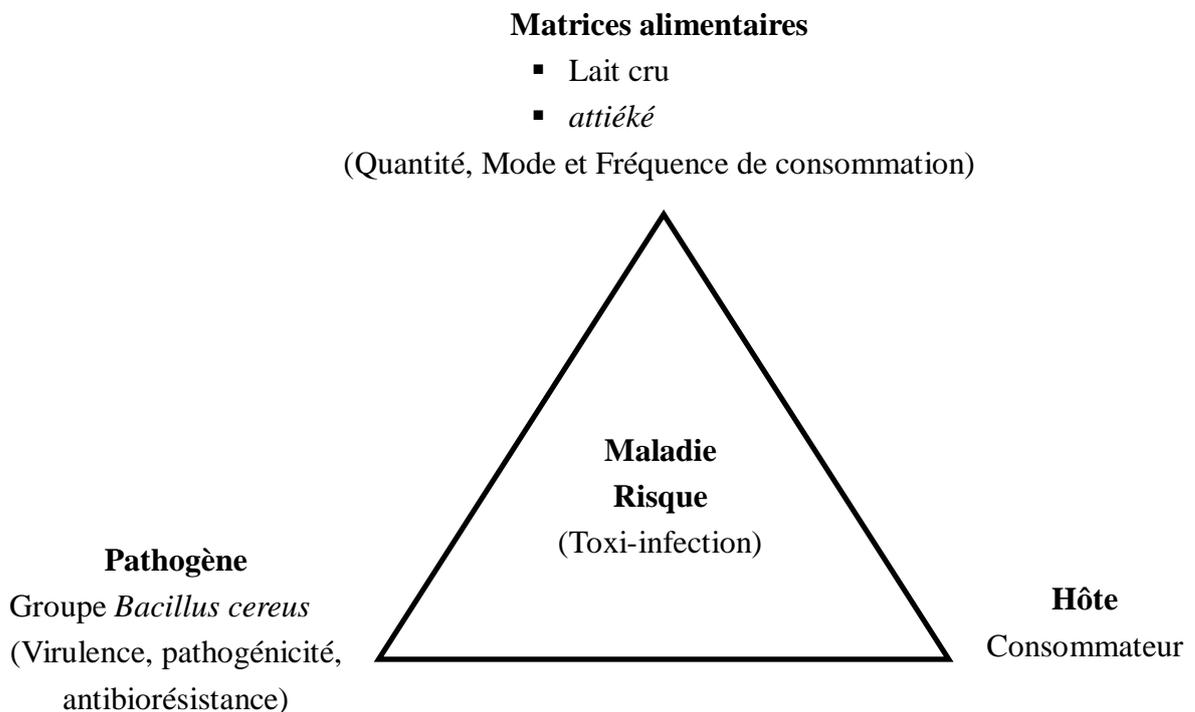
**Source : CA-SFM (2010)**

[http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm\\_2010.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm_2010.pdf), consulté le 06/10/2010

#### 4. ANALYSE DES RISQUES

##### 4.1. Évaluation des risques de toxi-intoxication liés au groupe *B. cereus*

L'évaluation des risques de toxi-infection liée à la consommation du lait cru local et de l'*attiéké* en vente à Abidjan a été réalisée selon le modèle recommandé au *Codex Alimentarius* par le comité mixte **FAO/OMS (FAO/OMS, 2004)**. Le modèle d'évaluation des risques, utilisé dans cette étude a mis en adéquation, un pathogène (le groupe *B. cereus*), deux matrices Alimentaires (le lait cru et l'*attiéké*) et un hôte (le consommateur), comme le montre la **figure 8**. Ainsi, les caractéristiques des matrices alimentaires ont été examinées pour déterminer leur niveau de contamination par le pathogène. Les caractéristiques de la population exposée qui pourraient avoir une incidence sur sa sensibilité (socio-démographiques, caractéristiques comportementales), les effets néfastes sur la santé qui peuvent être associés à une exposition au pathogène (depuis les symptômes bénins et les maladies autolimitantes, jusqu'aux maladies potentiellement mortelles) ont été analysés. Enfin, les caractéristiques du pathogène susceptibles d'avoir une incidence sur son aptitude à causer une maladie chez l'hôte ont été déterminées (virulence, pathogénicité, antibiorésistance).



**Figure 8** : Modèle d'évaluation du risque utilisé dans cette étude

Source : **FAO/OMS, 2004, modifié**

#### 4.1.1. Identification du groupe *Bacillus cereus* comme danger microbien

Le choix du groupe *Bacillus cereus* comme danger microbien s'est effectué après une revue de littérature. Dans un contexte où l'assurance qualité est un élément incontournable de la stratégie du développement industriel, l'intérêt du groupe *B. cereus* réside dans le fait qu'il est présent sur toute la chaîne alimentaire dans des conditions variables. Il est donc un bon marqueur pour estimer l'influence des pratiques des producteurs et des procédés de production alimentaire dans l'émergence des microorganismes sporulés, qui peuvent éventuellement acquérir des propriétés pathogènes (**Dromigny, 2008**). En effet, les pratiques d'hygiène et d'assainissement qui prévalent lors de la préparation et de la commercialisation des aliments traditionnels offrent de nombreuses possibilités de contamination par des bactéries pathogènes d'origine alimentaire parmi lesquelles le groupe *Bacillus cereus*.

Dans cette étude, les espèces du groupe *B. cereus* (*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* et *B. weihenstephanensis*) ont été identifiées comme danger car elles sont ubiquistes du sol, de l'environnement, sporogènes et leur présence dans une vaste gamme d'aliments apparaît comme inévitable. Ce sont des pathogènes opportunistes émergents des aliments chauffés, des produits prêts à consommer, des produits déshydratés et des produits amyliacés (**Rajkovic et al., 2006 ; Bartoszewicz et al., 2008**). Certaines espèces pathogènes du groupe *Bacillus cereus* dont *B. anthracis*, *B. cereus* et *B. thuringiensis* sont responsables de toxi-infections alimentaires qui se présentent sous deux formes. Une intoxication émétique caractérisée par des vomissements et des nausées due à l'ingestion d'une toxine (céréulide) préformée dans les aliments et une infection diarrhéique provoquant des douleurs abdominales et une diarrhée profuse, due à l'ingestion de formes végétatives ou de spores bactériennes produisant des entérotoxines dans l'intestin grêle. Les espèces du groupe *B. cereus* sauf *B. anthracis*, sont reconnus comme des pathogènes du groupe de risque 2 et sont pathogènes à tout âge mais les personnes à risques sont particulièrement les enfants, les femmes enceintes, les personnes âgées et les immunodéprimés chez lesquelles des cas graves et des décès ont été constatés (**Dierick et al., 2005 ; Shiota et al., 2010 ; Naranjo et al., 2011**). La dose infectieuse est de  $10^5$  UFC/g ou mL d'aliment mais des épidémies ont été associées à des aliments contenant  $10^3$  UFC/g d'aliment (**Arnesen et al., 2008**). Le lait cru qui est le produit le plus impliqué dans les toxi-infections à *B. cereus* et l'*attiéké* qui fait partie des habitudes alimentaires de la population ivoirienne ont été utilisés comme matrice

alimentaire. La composition physico-chimique du lait ou de l'*attiéké* est favorable au développement du groupe *B. cereus*.

Le groupe *B. cereus* n'est pas qu'un problème de santé publique potentiel, mais aussi un modèle susceptible de caractériser les bactéries pouvant gêner l'innovation des procédés de fabrication des produits alimentaires.

#### 4.1.2. Appréciation des risques de toxi-infection liés à la consommation de lait

##### 4.1.2.1. Population et fiche d'enquête

La population enquêtée pour l'évaluation des risques de toxi-infection liés à la consommation du lait était constituée de clients ou consommateurs de lait. Une fiche d'enquête a été élaborée sur la consommation du lait cru à Abidjan (**Annexe 8**).

##### 4.1.2.2. Sélection et taille des consommateurs de lait

Sur les sites de vente de lait cru sélectionnés, sur une journée entière, de 7 h à 18 h, tous les clients de lait ont été enrôlés sur chaque point de vente de lait cru. Au total, 188 personnes qui achetaient du lait sur les trois marchés de vente de lait cru ont été inclus dans l'étude notamment 86 personnes au marché de l'abattoir de Port-Bouët, 25 personnes au marché Bagnon à Lièvre rouge Yopougon et 77 personnes au marché d'Abobo Derrière Rails.

##### 4.1.2.3. Réalisation de l'enquête consommation

Le risque de toxi-infection lié à la consommation du lait a été évalué grâce à une enquête de consommation réalisée à l'aide d'un questionnaire individuel structuré à passage unique (**annexe 8**). Le questionnaire comprenait des rubriques relatives à la perception des consommateurs des bienfaits du lait, aux modes de consommation, la quantité et la fréquence de la consommation, l'historique et la gravité de la maladie suite à la consommation de lait cru. Les renseignements démographiques de bases telles que l'âge, le niveau d'éducation et la religion ont également été recueillis. La gravité des effets néfastes sur la santé due à la consommation du lait a été déterminée à l'aide d'une échelle allant de 1 à 10, définie comme suit: (1-3) la maladie est bénigne, (4-8) la maladie est grave et (9-10) la maladie est très grave accompagnée d'une hospitalisation.

#### 4.1.3. Appréciation des risques de toxi-infection liés à la consommation d'*attiéké*

Le risque de toxi-infection lié à la consommation de l'*attiéké* pour la santé des consommateurs a été évalué grâce à une enquête de consommation.

##### 4.1.3.1. Population enquêtée

La population enquêtée pour l'évaluation des risques de toxi-infection liés à la consommation d'*attiéké* était constituée de consommateurs d'*attiéké*.

##### 4.1.3.2. Matériel d'enquête

Une fiche d'enquête a été utilisée pour déterminer le mode de consommation d'*attiéké* à Abidjan et le risque de toxi-infection pour le consommateur (**Annexe 9**).

##### 4.1.3.3. Calcul de la taille de consommateurs d'*attiéké* enquêtés à Abidjan

La taille minimale des consommateurs d'*attiéké* enquêtés a été calculée selon la **formule 2 (OMS, 1991)**. Selon **Amani et Kamenan (2003)**, 30 % des Abidjanais consomment l'*attiéké* au moins une fois par jour. Avec cette prévalence, au minimum 323 consommateurs d'*attiéké* doivent faire l'objet d'enquête. Suite à une harmonisation, l'enquête a porté sur 360 consommateurs. Ils ont été répartis dans l'ensemble des dix communes de la ville d'Abidjan au prorata de la population totale de chaque commune obtenue grâce au recensement général de la population ivoirienne de 1998 (**INS, 1998**). Un quartier par commune a été choisi de manière aléatoire et l'enquête s'y est déroulée (**tableau 11**).

##### 4.1.3.4. Réalisation de l'enquête consommateur

Au total, 360 consommateurs d'*attiéké* ont été interrogés à l'aide d'un questionnaire individuel à un seul passage (**Annexe 9**), soit à leur domicile respectif, soit dans les lieux de vente et de consommation d'*attiéké* (maquis, restaurants, "garbadrômes"). Le questionnaire comprenait des rubriques relatives à la quantité, la fréquence de consommation, l'historique, la fréquence d'apparition et la gravité de la maladie liée à la consommation d'*attiéké*, aux lieux et aux modes de consommation. Les renseignements démographiques de bases telles que l'âge, le niveau d'éducation et la religion ont également été recueillis. La gravité des effets néfastes sur la santé due à la consommation d'*attiéké* a été déterminée à l'aide d'une échelle allant de 1 à 10, définie

comme suit : (1-3) la maladie est bénigne, (4-8) la maladie est grave et (9-10) la maladie est très grave accompagnée d'une hospitalisation.

**Tableau 11** : Répartition des consommateurs d'*attiéké* enquêtés

Communes	Quartiers	Nombre de consommateurs enquêtés
Yopougon	Selmer	79
Abobo	Sagbé	71
Koumassi	Remblais	43
Cocody	Plateau-dokui	32
Adjamé	Williamsville	31
Port-bouet	Adjouffou	31
Attécoubé	Abobodoumé	27
Marcory	Anoumambo	24
Treichville	Entente	12
Plateau	Camp Gallieni	10
<b>Total</b>		<b>360</b>

4.1.4. Évaluation de l'exposition et estimation du risque de toxi-infection alimentaire suite à la consommation de lait ou d'*attiéké*

L'évaluation de l'exposition est l'évaluation de l'ingestion probable du groupe *B. cereus* via la consommation du lait ou de l'*attiéké*. Elle a consisté à déterminer la probabilité de consommer le lait ou l'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus*, puis à déterminer la dose de microorganismes du groupe *B. cereus* ingérée. Cette évaluation s'est effectuée par type d'aliment compte tenu du fait que les consommateurs de lait diffèrent de ceux de l'*attiéké*. Les paramètres tels que le taux de contamination de l'aliment par le groupe *B. cereus*, la concentration du microorganisme dans l'aliment contaminé au point de vente, la quantité d'aliment consommé par jour, la fréquence de consommation, la proportion de personnes consommant l'aliment en l'état c'est-à-dire sans aucun traitement thermique ont été déterminés.

La probabilité d'ingérer un aliment (lait ou *attiéké*) contaminé par le groupe *B. cereus* a été calculée en faisant le produit de la proportion de personnes consommant l'aliment sans aucun traitement thermique et de la proportion d'aliment en vente au point

de vente dépassant les limites d'acceptabilité. Les limites d'acceptabilité ont été définies selon la réglementation en vigueur (EFSA, 2005 ; AFSSA, 2009 ; Communauté Européenne, 2007b ; NI 484, 2013).

Le risque relatif (RR) a été calculé selon la méthode de Thrusfield (2005) et de Dohoo *et al.* (2010) pour évaluer l'effet du traitement thermique du lait ou de l'*attiéké* sur la survenue de la maladie. La formule 8 a été utilisée à cet effet.

$$\text{RR} = \frac{a/(a + b)}{c/(c + d)} \quad \text{Formule 8}$$

où *a* est le nombre de personne malade qui consomment le lait cru ou l'*attiéké* sans traitement thermique, *b* est le nombre de personne saine (non malade) qui consomment le lait cru ou l'*attiéké* sans traitement thermique, *c* est le nombre de personne malade qui consomment le lait ou l'*attiéké* réchauffé et *d* est le nombre de personne saine (non malade) qui consomment le lait ou l'*attiéké* réchauffé.

La fraction étiologique (FE) chez les exposés est la proportion de toxi-infections attribuable à l'exposition (consommation de lait ou d'*attiéké* sans traitement thermique) parmi les exposés. Elle a été calculée selon la formule 9.

$$\text{FE} = \frac{\text{RR} - 1}{\text{RR}} \quad \text{Formule 9}$$

Avec *FE* la fraction étiologique et *RR* le risque relatif.

Pour mesurer l'impact global de la consommation de lait ou d'*attiéké* sans traitement thermique dans la population consommatrice de chacun de ces deux produits, la fraction étiologique du risque dans la population a été estimée selon la formule 10.

$$\text{FER} = \frac{p_e (\text{RR} - 1)}{1 + p_e (\text{RR} - 1)} \quad \text{Formule 10}$$

Avec *FER* la fraction étiologique du risque, *p<sub>e</sub>* la proportion de sujets exposés dans la population, *RR* est le risque relatif.

Elle a permis de quantifier la proportion de cas évitables si l'exposition est éliminée.

La dose de bactéries ingérées a été calculée en multipliant la concentration moyenne (charge moyenne) de lait de vente ou d'*attiéké* en vente sur le marché par la quantité moyenne de lait ou d'*attiéké* consommée par jour par personne sans traitement thermique.

La croissance du groupe *B. cereus* au cours de la vente du lait à la température ambiante a été déterminée selon la **formule 11** (Sanaa, 2002) en tenant compte du principe de scissiparité des bactéries.

$$\log N_t = \log N_0 + \frac{t}{d} \times \log 2$$

**Formule 11**

$N_t$  est nombre de bactéries du groupe *B. cereus* au temps  $t$ ,  $N_0$  est la charge en groupe *B. cereus* au point de vente,  $t$  est le temps ou la durée de vente et  $d$  est le temps de dédoublement de la bactérie ou temps de génération.

Cette formule a permis de montrer le risque de développement du groupe *B. cereus* dans le lait à des doses susceptibles de provoquer des intoxications alimentaires au cours de la vente ou au moment de la consommation.

## 4.2. Gestion du risque de toxi-infection suite à la consommation de lait ou d'*attiéké* contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

### 4.2.1. Réduction du risque de toxi-infection lié à la consommation du lait contaminé par le groupe *B. cereus*

#### 4.2.1.1. Détermination de la durée limite de vente du lait à la température ambiante

À partir de la concentration en bactéries du groupe *B. cereus* des échantillons de lait contaminés au point de vente, le temps nécessaire pour atteindre les concentrations inacceptables  $M$  (2,7 log (UFC/g)) et la dose infectieuse moyenne (5 log (UFC/g)) a été évalué à l'aide de la **formule 11**. De plus, la durée limite de vente ou de consommation du lait sans réchauffage a été estimée.

#### 4.2.1.2. Réduction du risque par le chauffage du lait

La proportion de toxi-infections imputable à la consommation de lait non réchauffé a été estimée par le calcul de la fraction du risque attribuable ou fraction étiologique. Ce calcul a permis de déduire le pourcentage de toxi-infection qui pourrait être évité par la

sensibilisation des consommateurs au chauffage systématique du lait avant toute consommation.

#### 4.2.2. Réduction du risque de toxi-infection suite à la consommation d'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* par réchauffage hydrothermique

##### 4.2.2.1. Détermination de la température de réchauffage de l'*attiéké*

La température de réchauffage de l'*attiéké* a été déterminée par le réchauffage à la vapeur d'eau de 150 g, de 300 g et de 450 g d'*attiéké* dans un couscoussier sur une cuisinière à gaz pendant 20 min. Le dispositif utilisé était constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. La température de l'*attiéké* réchauffé au cœur du couscoussier a été déterminée, par intervalle de 5 min, à l'aide d'un thermomètre à alcool (Total IMM, VWR, Paris, France). La température maximale atteinte a été utilisée comme température de réchauffage de l'*attiéké* pour déterminer le taux de survivants du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique. Dans cette étude, le pH a été considéré comme constante et il est égal au pH moyen de l'*attiéké*.

##### 4.2.2.2. Étude de la survie des spores du groupe *Bacillus cereus* au réchauffage de l'*attiéké*

Dans cette étude, la distribution du groupe *B. cereus* dans un échantillon d'*attiéké* a été considérée comme homogène. Ainsi, pour déterminer la courbe de survie ou la cinétique de destruction microbienne, 5 échantillons d'*attiéké* de 600 g chacun et contaminés par les spores du groupe *B. cereus* à des charges de 4,2 log (UFC/g) ont été utilisés. Chaque échantillon a été réparti en quatre portions de 150 g d'*attiéké* chacune. Chaque portion a été réchauffée à la vapeur d'eau à 90 °C (température maximale de réchauffage sus déterminée), dans un couscoussier sur une cuisinière à gaz pendant 20 min. À des intervalles de 5 min, une portion de 10 g d'*attiéké* réchauffé a été prélevée du couscoussier puis immédiatement refroidie pendant 5 min sur un bain de glace concassée et broyée dans 90 mL d'eau peptonée 0,1 %. Après broyage au Stomacher, une série de dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  a été réalisée. Un volume d'un mL de la solution mère et de chaque dilution décimale a été ensemencé pour le dénombrement des spores survivantes du groupe *B. cereus* sur gélose Mossel. Les boîtes ensemencées en double ont été incubées à 30 °C pendant 72 h. Pour toutes les portions, les dénombrements ont été effectués en double. Le temps de régénération a été noté.

## ❖ Calcul du taux de survivants

Le taux de survivants ou le taux de survie est le nombre d'unité formant colonie (UFC) survivants au réchauffage hydrothermique au temps  $t$  rapporté au nombre initial de bactérie au temps  $t_0$  (**Roig-Saguès et al., 2009**).

## ❖ Calcul du temps de réduction décimale

La cinétique de destruction microbienne ou la courbe  $\log N$  (UFC/g) a été tracée en fonction du temps de réchauffage en minute. Le temps de réduction décimale (D-valeur) ou le temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) la concentration initiale en bactéries du groupe *B. cereus* à la température létale constante de 90 °C a été calculée à partir de l'inverse de la pente négative de chaque essai, en utilisant la partie linéaire de la courbe des survivants, en  $\log$  (UFC/g) en fonction du temps en minutes, tracée sur une échelle semi-logarithmique. Ainsi, l'équation de **Caudrillier, (2008)** a été utilisée pour déterminer la valeur de D (**Formule 12**).

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D}$$

**Formule 12 (Caudrillier, 2008)**

Avec  $t$  le temps de réchauffage hydrothermique,  $N$  le nombre de bactérie du groupe *B. cereus* au temps  $t$ ,  $N_0$  la concentration initiale en groupe *B. cereus* et  $D$  le temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) la concentration initiale en spore du groupe *B. cereus* à la température létale constante de 90 °C.

## ❖ Calcul du temps de génération

Le temps de génération ou temps de dédoublement de la population du groupe *B. cereus*, après le réchauffage, a été déduit de la **formule 11 (Sanaa, 2002)** en tenant compte du principe de scissiparité des bactéries. Ainsi, le temps de génération a été calculé à partir de la **formule 13** suivante :

$$d = \frac{t \times \log(2)}{\log N_t - \log N_0}$$

**Formule 13**

Avec  $d$  le temps de génération ou temps de dédoublement de la population,  $t$  le temps d'incubation,  $N_0$  est la concentration initiale en groupe *B. cereus*,  $N_t$  le nombre de bactéries du groupe *B. cereus* au temps  $t$ .

## 5. ANALYSE STATISTIQUE

Les données ont été saisies avec le logiciel de traitement de données IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, SPSS Inc, Chicago, USA) et transférés sur Excel. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT 2014.1. Les méthodes statistiques descriptives (Fréquence, moyenne, écart-type) ont été utilisées pour les variables quantitatives. Une Analyse multivariée visant à mettre en relation la qualité ou le type de lait de vente et les pratiques des vendeurs a été effectuée avec le logiciel statistica 7.5. Pour cela, une Analyse en Composantes Principales (ACP) suivie d'une Classification Ascendante Hiérarchique (CAH) a été réalisée. Pour la CAH, le critère de Ward servant à l'analyse hiérarchique a été retenu. Une répartition en trois classes de laits selon la qualité physique (température, pH et densité) a été adoptée.

Les moyennes géométriques ont été utilisées pour le calcul des dénombrements. Les dénombrements ont été transformés en logarithme à base 10 (Log10), dans le but de normaliser les distributions, pour subir une régression avec les points critiques (pis, bidon du berger, bidon du vendeur). La régression logistique sur la présence ou l'absence de résidus d'antibiotiques comme variable dépendante a été utilisée, de même entre le mode de consommation et l'apparition de maladie. Le test de Chi carré a été utilisé pour tester les relations entre les variables. La différence entre les variables a été considérée comme significative à  $p < 0,05$ .

La probabilité d'ingérer du lait cru ou d'*attiéké* contaminé par *B. cereus* a été calculée en faisant le produit de la proportion de lait cru ou d'*attiéké* qui n'a subi aucun traitement thermique et de la proportion de lait de vente ou d'*attiéké* vendu sur les marchés dépassant les limites d'acceptabilité. La dose de bactérie du groupe *B. cereus* ingérée par jour a été calculée en multipliant la concentration moyenne (charge moyenne) du lait de vente ou de l'*attiéké* en vente par la quantité moyenne de lait ou d'*attiéké* consommée par jour par personne.

L'Analyse de variance (ANOVA) à un facteur a été utilisée pour déterminer la relation entre les variables dépendantes (le temps de cuisson, la teneur en eau, profil toxigénique) et les variables indépendantes (l'origine, le site, espèce). L'ANOVA était suivie d'un test post-hoc avec la comparaison de Bonferroni lorsqu'il existe des différences entre les groupes.

Les discussions en groupe focal ont été transcrites sur Word puis transférées sur le logiciel MAXQDA. Des codes ont été élaborés et transférés sur Word pour les analyses.

A decorative scroll graphic with a light gray background and a black border. The scroll is unrolled in the middle, with the top and bottom edges curled up. The text is centered on the unrolled portion.

### **III- RESULTATS ET DISCUSSION**

---

# 1. CARACTÉRISTIQUES DU SYSTÈME DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DU LAIT CRU LOCAL

## 1.1. Résultats

### 1.1.1. Caractéristiques des fermes, des exploitants et des vendeurs

La production du lait se fait à travers un système traditionnel d'élevages laitiers à structure individuelle. Les animaux vivent dans des enclos de fortune en bois non paillés et non couverts. Dans toutes les fermes, les vaches laitières sont nourries à l'aide de pâturages ou aux herbes fauchées comme principale source d'alimentation.

Les épluchures de manioc et la coque du coco sont utilisées pour compléter l'alimentation. La moyenne de l'effectif des vaches laitières en lactation est de  $8 \pm 4,5$  vaches par ferme (min = 2 vaches, max = 19 vaches). Au total, 141 litres de lait sont produits par jour dans les 15 fermes d'études (**tableau 12**). La production moyenne de lait est de  $9,4 \pm 7,5$  litres/ferme/jour (min : 2 L, max : 30 L).

Les fermes appartiennent à des hommes d'affaires ivoiriens et étrangers. Elles sont à majorité (80 %) gérées par un éleveur. Les éleveurs/trayeurs sont tous de sexe masculin et majoritairement Peuls (86,7 %) originaires du Burkina Faso (53,3 %) et du Mali (40 %). L'âge moyen des éleveurs/trayeurs est de  $34,3 \pm 9,3$  ans (**tableau 13**). Les éleveurs/trayeurs assurent le gardiennage, la conduite du troupeau et font paître le bétail. Le lait produit dans les fermes est destiné à la vente et les recettes sont utilisées pour les besoins de l'alimentation des animaux et le salaire du berger.

Comme les éleveurs, les vendeurs sont majoritairement Peuls (41,2 %) originaires du Burkina Faso (23,5 %). Seulement une seule femme (6 %) s'adonne à cette activité de vente de lait (Abobo-Derrière-Rail). Ces vendeurs travaillent à leur propre compte.

### 1.1.2. Facteurs de risque de contamination du lait local à la ferme

#### 1.1.2.1. *État sanitaire des animaux et utilisation des médicaments vétérinaires*

Des cas de diarrhées depuis 2 mois ont été enregistrés dans 73,3 % des fermes. Au cours des deux derniers mois qui ont précédés l'étude, des cas de suspicions d'infections de pathogènes ont été enregistrés dans la majorité (86,7 %) des fermes (**tableau 14**). Il s'agissait principalement des pathologies des trayons (40 %) et des pathologies respiratoires (20 %).

Dans toutes les fermes, aucune vache laitière n'a subi d'analyse de laboratoire depuis une année. Aucune ferme n'est assistée par un vétérinaire, ni inscrite dans un programme de

---

prophylaxie. Aucun des éleveurs ne respecte le délai d'attente de 16 jours entre l'administration d'antibiotique et la traite du lait et 93,3 % éleveurs utilisaient, dans les fermes, des médicaments vétérinaires parmi lesquels 92,9 % pratiquaient l'automédication avec des médicaments de rue (**tableau 15**). Au total, 85,7 % des éleveurs utilisaient les médicaments vétérinaires pour le traitement des pathologies des animaux et 14,3 % les utilisent simultanément comme facteurs de croissance et pour le traitement des pathologies. Les médicaments vétérinaires utilisés sont principalement l'oxytétracycline (57,1 %) et dans une moindre mesure le levozan (7,1 %). Pendant les 15 derniers jours qui ont précédé l'enquête, les médicaments vétérinaires ont été utilisés majoritairement pour le traitement de mammites (35,7 %) suivi de pathologies des trayons (28,6 %).

#### *1.1.2.2. État sanitaire des fermes*

Dans les fermes, l'état sanitaire et les pratiques, soit favorisent la contamination du lait, soit préservent la qualité microbiologique du lait. Les conditions qui sont supposées favoriser la contamination du lait sont présentes dans toutes les fermes. Ainsi, dans toutes les fermes, les abreuvoirs ne sont pas lavés régulièrement. En effet, 46,7 % des éleveurs ne lavent pas les abreuvoirs, tandis que 33,3 % les lavent tous les 2 mois contre 20,0 % une fois par semaine (**tableau 16**).

Il y avait la présence de boue et d'excréments d'animaux dans l'espace où se déroulait la traite avec une absence de système d'évacuation des déjections qui étaient laissés au sol. Une forte humidité a été observée dans 93,3 % des fermes. Les pratiques et facteurs qui sont supposés influencer la qualité microbiologique du lait à la ferme sont présentés dans le **tableau 17**.

Par contre, les conditions qui sont supposées préserver la qualité microbiologique du lait n'ont été observées dans aucune ferme. Ainsi, il y avait un manque d'eau potable dans toutes les fermes. L'eau utilisée dans les fermes provenait des étangs (53,3 %) et du réseau de distribution d'eau domestique (46,7 %). L'eau provenant du réseau de distribution d'eau domestique était stockée dans la barrique au domicile de l'éleveur et était utilisée pour le lavage des ustensiles ayant servi à la traite. L'eau provenant des étangs était stockée dans les abreuvoirs et servait de boisson aux animaux. Seulement, 6,7 % des fermes présentaient un état de salubrité (**tableau 17**).

**Tableau 12** : Répartition de la production moyenne journalière de lait dans les fermes

<b>Sites</b>	<b>N° de la ferme</b>	<b>Nombre de vaches laitières en lactation</b>	<b>Quantité de lait livrée par traite (litre)</b>	<b>Production moyenne de lait (litre/vache/jour)</b>
Abattoir Port-Bouët	*F1	6	7	1,2
	F2	5	5	1,0
	F3	6	10	1,7
	F4	4	6	1,5
Songon-té	5	9	12	1,3
Lièvre Rouge	F6	14	15	1,1
	F7	19	20	1,1
Abobo N'dotré	F8	14	30	2,1
	F9	7	10	1,4
	F10	2	2	1,0
	F11	7	6	0,9
	F12	4	3	0,8
	F13	7	6	0,9
	F14	7	5	0,7
	F15	8	4	0,5
<b>Total</b>		<b>119</b>	<b>141</b>	<b>17</b>
<b>Moyenne</b>		<b>8 ± 4,5</b> vaches/ferme		<b>9,4 ± 7,5</b> litres/ferme/jour

\*F = Ferme

**Tableau 13** : Caractéristiques socio-démographiques des éleveurs et des vendeurs de lait

	<b>Caractéristiques</b>	<b>Nombre de personnes enquêtées</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Éleveurs (N = 15)</b>	<b>Gestion des fermes</b>		
	Éleveurs	12	80
	Membre de la famille	3	20
	<b>Sexe des éleveurs</b>		
	Homme	15	100
	Femme	0	0
	<b>Nationalité des éleveurs</b>		
	Burkinabé	8	53,3
	Malienne	6	40
	Ivoirienne	1	6,7
	<b>Ethnie des éleveurs</b>		
	Peuls	13	86,7
	Mossi	1	6,7
Malinké	1	6,7	
<b>Vendeurs de lait (N = 17)</b>	<b>Sexe des vendeurs</b>		
	Homme	16	94
	Femme	1	6
	<b>Nationalité des vendeurs</b>		
	Burkinabé	4	23,5
	Guinéenne	3	17,6
	Malienne	3	17,6
	Autres	7	41,2
	<b>Ethnie des vendeurs</b>		
	Peuls	7	41,2
	Bambara	4	23,5
Djallo	4	23,5	
Non déterminée	2	11,8	
	<b>Age des éleveurs</b>		
	Minimum	28	
	Maximum	45	
	Moyenne	34,3 ± 9,3 ans	

**Tableau 14** : État sanitaire des animaux au cours des deux derniers mois précédant l'enquête

<b>Paramètres</b>	<b>Nombre de fermes enquêtées (N=15)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
Vaches atteintes de mammites cliniques	4	26,7
Diarrhées	11	73,3
✓ Vaches laitières	6	40,0
✓ Vaux	5	33,3
Vaches mortes ou reformées pour maladie	5	33,3
Mort de veaux	8	53,3
Avortements/Vêlage avant terme de vaches	8	53,3
Cas de suspicion d'infection de pathogène	13	86,7
✓ Pathologies des trayons	6	40,0
✓ Pathologies respiratoires	3	20,0
✓ Autres pathologies	4	26,7

**Tableau 15** : Mode d'usage des antibiotiques dans les fermes

<b>Paramètres</b>	<b>Nombre de fermes enquêtées (N=15)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Vaches laitières ont subi une analyse de laboratoire depuis un an</b>		
oui	0	0
non	15	100
<b>Ferme assistée par un vétérinaire</b>		
oui	0	0
non	15	100
<b>Ferme inscrite dans un programme de prophylaxie/vaccination</b>		
oui	0	0
non	15	100
<b>Utilisation de médicaments vétérinaires</b>		
non	1	6,6
oui	14	93,3
<i>Médicaments prescrits par un vétérinaire</i>		
oui	1	7,1
non (automédication)	13	92,9
<i>Motifs de l'utilisation de médicaments vétérinaires</i>		
Facteur de croissance et traitement de pathologies	2	14,3
Traitement des pathologies	12	85,7
<i>Médicaments vétérinaires utilisés</i>		
Oxytétracycline	8	57,1
Levozan	1	7,1
ne sait pas	5	35,7
<i>Respect du délai d'attente de 16 jours</i>		
oui	0	0
non	14	100
<i>Pathologies traitées au cours des 15 derniers jours</i>		
Pathologies des mamelles	9	64,3
- Mammites	5	35,7
- Pathologies des trayons	4	28,6
Pathologies respiratoires	3	21,4
Autres pathologies	2	14,3

**Tableau 16** : Fréquence de nettoyage des abreuvoirs

<b>Nettoyage des abreuvoirs</b>	<b>Nombre de fermes (N = 15)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Aucun nettoyage</b>	7	46,7
<b>Tous les deux mois</b>	5	33,3
<b>Une fois par semaine</b>	3	20,0

**Tableau 17** : Pratiques et facteurs influençant la qualité microbiologique du lait à la ferme

<b>Paramètres/Facteurs</b>	<b>Bonnes/Mauvaises pratiques</b>	<b>Nombre de fermes (n = 15)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
Lavage des mains du trayeur avant et pendant la traite	+	0	0
Lavage et désinfection des mamelles	+	0	0
Utilisation de savon ou de désinfectant	+	0	0
Trempage des doigts dans le lait pendant la traite	-	15	100
Présence de fumier/d'excréments d'animaux dans la zone de traite	-	15	100
Absence de système d'évacuation des déjections	-	15	100
Présence d'un système de filtration du lait	+/-	5	33,3
Chauffage du lait après la traite	+	0	0
Refroidissement du lait après la traite	+	0	0
Lavage des ustensiles avant et après la traite	+	1	6,7
Utilisation d'eau provenant du réseau de distribution d'eau domestique pour la traite	+/-	7	46,7
Utilisation d'eau provenant d'un étang pour la traite	-	8	53,3
Ferme située à proximité d'une déchèterie ou d'une décharge	-	5	33,3
Émission de bouse par la vache laitière pendant la traite	-	7	46,7
Environnement immédiat de la ferme salubre	+	1	6,7
Rejet du premier jet de lait	+	0	0
Présence d'étable de vente de lait à la ferme	+	0	0
Respect délai d'attente de 16 jours	+	0	0

(+) Paramètres/Facteurs supposés préserver la qualité microbiologique du lait : bonne pratique

(-) Paramètres/Facteurs supposés favoriser la contamination du lait : mauvaise pratique

(+/-) Paramètres/Facteurs supposés préserver la qualité microbiologique ou favoriser la contamination du lait : bonne ou mauvaise pratique.

### 1.1.2.3. Conditions de production, distribution et commercialisation du lait

La chaîne de production, de distribution et de vente du lait de la ferme aux consommateurs dans le secteur informel dans la zone péri-urbaine à Abidjan est décrite à la **figure 9**. La traite du lait se déroulait entre 6 h 30 et 8 h le matin et entre 15 h et 17 h le soir de façon manuelle. La température moyenne dans les fermes vers 7 h était de  $26,4 \pm 2,11$  °C (**figure 9**).

Aucune mesure d'hygiène n'était prise avant, pendant et après la traite par les trayeurs dans toutes les fermes. Ni les mains, ni les ustensiles de traite n'étaient lavés à cet effet, les mamelles n'étaient ni nettoyées, ni désinfectées pendant toutes les étapes de la traite. Le savon et le désinfectant n'étaient pas utilisés dans toutes les fermes. Aucun trayeur ne jetait les premiers jets de lait (**tableau 17 susmentionné**). Pendant la traite, le trayeur plongeait de temps en temps ses doigts dans le lait avant de saisir à nouveau les mamelles. Selon les trayeurs ce geste leur permettait d'humidifier les tétines et les rendre plus glissantes entre les doigts. Seulement, un éleveur (6,7 %) lavait les ustensiles avant et après la traite (**tableau 17 susmentionné**).

Dans chaque élevage, le même matériel (calebasse, seau en plastique) était utilisé pour traire toutes les vaches de la ferme. Tout le lait recueilli de toutes les vaches de la même ferme était transvasé dans un bidon (20-25 L) ou dans des bouteilles.

Après la traite, seulement 33,3 % fermes avaient filtré le lait avant la vente pour y éliminer les débris de sable et de boue (**tableau 17 susmentionné**). Le lait collecté dans les bidons était vendu dans la ferme à même le sol aux collecteurs-vendeurs dans des bouteilles de 1,5 L ou dans des bidons de 20 L.

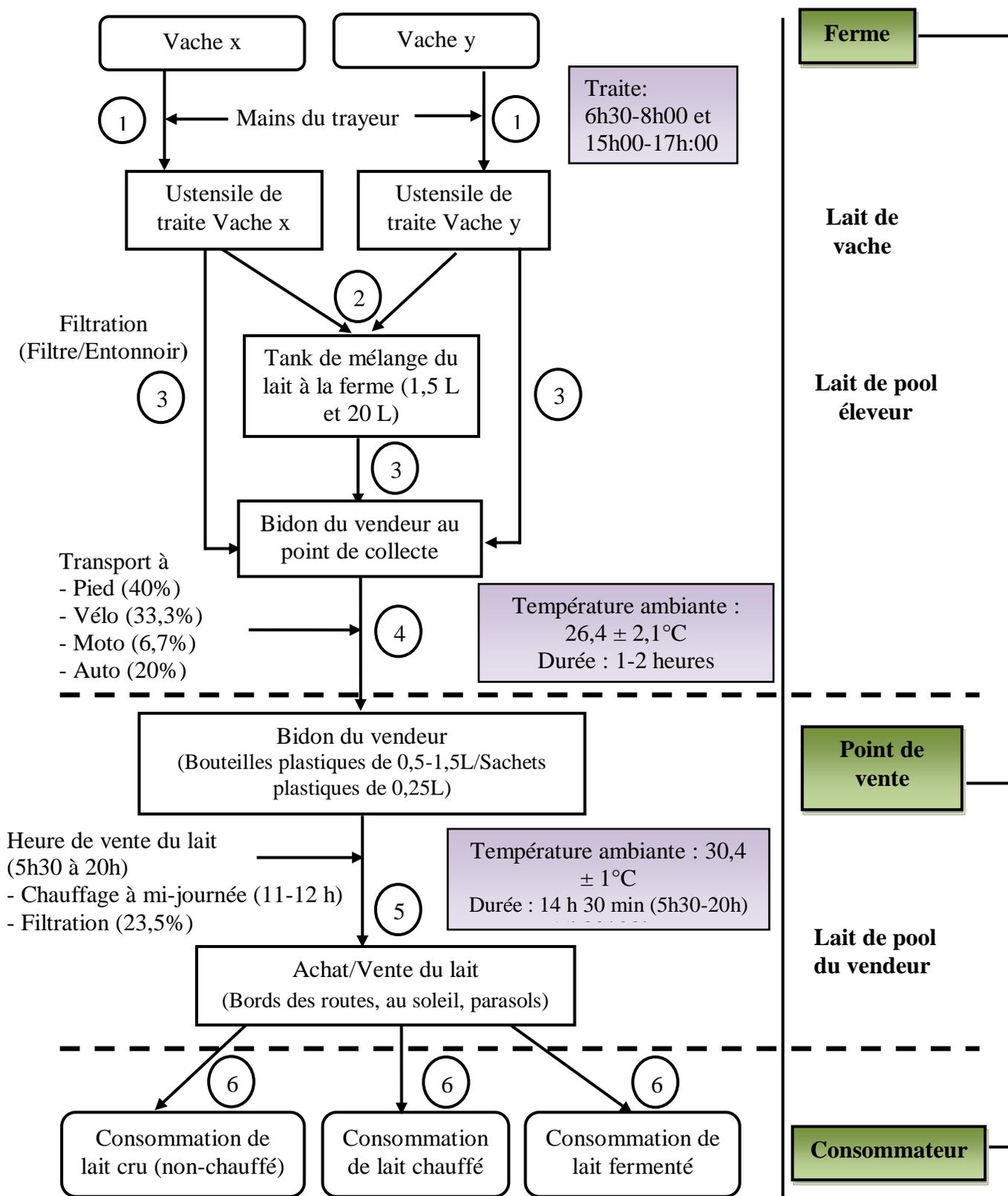
Les collecteurs-vendeurs acheminaient le lait collecté vers les marchés informels pour la vente soit à pieds (40 %), par vélo (33,3 %), par moto (6,7 %) ou par transport en commun (20 %) sans chaîne de froid et à la température ambiante ( $26,4 \pm 2,1$ °C). La durée du transport variait d'une à deux heures. Lait était vendu sur les marchés informels sans chaîne de froid, à la température ambiante ( $30,4 \pm 1$ °C). Seulement, 4 (23,5 %) vendeurs avaient filtré le lait avant la vente (**figure 9**).

Le lait destiné à la vente était exposé au soleil, au bord des routes, sous des hangars couvert par du plastique ou sous des parasols noircis par la poussière et les échappements des voitures. La poussière et la fumée dégagées par les véhicules pourraient souiller le matériel de mesure et le lait. Le lait était vendu dans les bouteilles en plastiques de 0,5 à 1,5 L ou dans des

sachets en plastiques de 0,25 L. Le lait était vendu dans les marchés informels de 5 h 30 min du matin à 20 h (**figure 9**). Les vendeurs ont rapporté qu'ils chauffent le lait au charbon de bois, dans de grandes marmites, à la mi-journée entre 11 h et 12 h, pour prévenir d'éventuelle fermentation spontanée du lait. Généralement, le chauffage durait environ une minute après ébullition du lait. Le lait chauffé était exposé à nouveau à la température ambiante pendant de longues heures (jusqu'à 20 h) pour la vente au détail. Cette pratique était commune chez tous les vendeurs concernés par l'étude.

La quantité moyenne de lait vendu par vendeur par jour était  $14,6 \pm 8,4$  litres. Au total, 12,5 % du lait n'étaient pas vendus le même jour et les vendeurs ont rapporté que le lait non vendu était réfrigéré (la température du réfrigérateur n'a pas été mesurée) puis revendu le lendemain matin avant l'arrivée du lait du jour. Les quantités de lait reçues et vendues sont présentées dans le **tableau 18**.

Les équipements de collecte et de transport du lait étaient composés de bidons, de seaux et de bouteilles dont 53,7 % étaient en plastique qui étaient utilisés par tous les éleveurs, collecteurs et les vendeurs (**tableau 19**). Certains de ces plastiques étaient cassables et leur ouverture était petite.



**Figure 9 :** Chaîne de production informelle du lait cru de la ferme au consommateur à Abidjan

(1) Traite de la vache laitière, (2) Mélange du lait à la ferme, (3) Collecte, (4) Transport, (5) Vente, (6) Modes de consommation

**Tableau 18** : Répartition de la quantité de lait collecté et vendu par jour

Sites	N° du vendeur	Quantité de lait prélevée (L)	Quantité de lait vendue (L)	Quantité de lait non vendue (L)	Pourcentage de lait non vendu (%)
Abattoir Port-Bouët	*V1	20	15	5	25
	V2	20	17	3	15
	V3	10	9	1	10
	V4	10	8,5	1,5	15
	V5	10	9	1	10
	V6	40	38	2	5
Marché Bagnon à Lièvre rouge	V7	5	4,5	0,5	10
	V8	10	7	3	30
	V9	15	15	0	0
	V10	12	12	0	0
Abobo Derrière Rail	V11	8,5	5,5	3	35,3
	V12	20	19,5	0,5	2,5
	V13	5,5	4	1,5	27,3
	V14	12	7	5	41,7
	V15	10	8	2	20
	V16	20	19	1	5
	V17	20	19	1	5
<b>Total</b>		<b>248</b>	<b>217</b>	<b>31</b>	<b>12,5</b>
<b>Quantité moyenne de lait vendu par vendeur/jour : 14,6 ± 8,4 L</b>					
<b>Nombre de vendeurs réfrigérant le lait non vendu : 13 (76,5 %)</b>					

\*V : Vendeur

**Tableau 19:** Matériel utilisé pour la traite et le conditionnement du lait

<b>Équipements</b>	<b>Nombre d'équipements recensés</b> (N = 67)	<b>Pourcentage</b> (%)
<b>Plastique</b>	<b>36</b>	<b>53,7</b>
<i>Éleveur (n = 15)</i>	<i>16</i>	<i>44,4</i>
- Seau	15	100,0
- Bouteille	1	6,7
<i>Vendeur (n = 17)</i>	<i>20</i>	<i>55,6</i>
- Seau	3	15,0
- Bouteille	17	85,0
<b>Bidon</b>	<b>31</b>	<b>46,3</b>
<i>Éleveur (n = 15)</i>	<i>14</i>	<i>93,3</i>
<i>Vendeur (n = 17)</i>	<i>17</i>	<i>100,0</i>

n représente le nombre d'éleveurs ou de vendeurs

N représente le nombre total d'équipements recensés

## 1.2. Discussion

L'analyse du système de production, de distribution et de vente du lait cru dans la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan a montré un élevage laitier traditionnel à structure individuelle de petite taille avec  $8 \pm 4.5$  vaches par ferme et une faible production de lait ( $9,4 \pm 7,5$  litres/ferme/jour). Le nombre de vaches laitières en lactation par ferme dans notre étude est pratiquement le même à Bamako au Mali où une taille moyenne de neuf vaches laitières en lactation a été rapportée par ferme (**Bonfoh *et al.*, 2003**). Le nombre de vache par ferme relativement faible dépend des moyens financiers dont disposent les investisseurs. Les investissements dans cette activité sont effectués soit par des commerçants ou des hommes d'affaires sur le bénéfice généré par leurs activités principales, soit par des particuliers sur leurs épargnes personnelles (**Kouamé-Sina, 2013**).

La faible production de lait par vache et les morts de vaches et de veaux ainsi que les avortements ou vèlages avant terme enregistrés dans les fermes au cours des deux derniers mois qui ont précédés l'étude, ont également été constatés par **Sraïri *et al.* (2005)**. Cela, dans leur étude sur les relations entre pratiques d'élevage et qualité globale du lait de vache en étables suburbaines au Maroc. Les résultats témoignent de la mauvaise conduite des troupeaux, notamment en matière de rationnement et du manque de disponibilité en fourrage de qualité tout au long de l'année. **N'goran *et al.* (2013)** ont rapporté que dans les fermes encadrées par les structures sanitaires étatiques d'appui au développement de l'élevage, la production moyenne par vache par jour varie de 2 à 10 L et la production moyenne de lait par ferme par jour varie de 20 à 40 L. En effet, dans les élevages qui ont fait l'objet d'étude, les vaches laitières sont nourries à l'aide de pâturages, d'épluchures de manioc et de la coque de noix de coco. Cette alimentation ne permet pas de couvrir les besoins nutritionnels de la vache laitière en lactation et de produire de grande quantité de lait. La faiblesse de la production laitière est également liée au mauvais état sanitaire des vaches.

Le contexte pathologique qui a motivé l'utilisation des antibiotiques était lié aux problèmes de mamelles (64,3 %) et de pathologies respiratoires (21,4 %). Les taux de pathologies respiratoires rapportés sont plus élevés que ceux de **Cazeau *et al.* (2010)** dans leur étude sur l'utilisation des antibiotiques par les éleveurs en filière bovine en France. L'ampleur de ces infections serait due à la gestion traditionnelle des fermes. Aussi, n'étant pas propriétaires des bovins, les employés sont probablement moins préoccupés par leur état sanitaire (**Sraïri *et al.*, 2005**).

---

L'enquête menée auprès des éleveurs a révélé qu'aucun élevage n'était suivi par un vétérinaire, ni inscrite dans un programme de prophylaxie et 14 (93,3 %) éleveurs utilisaient des médicaments vétérinaires parmi lesquels 13 (92,9 %) pratiquaient l'automédication avec des médicaments de rue. **Oulaï (2004)** dans son étude sur la distribution et utilisation des médicaments vétérinaires en Côte d'Ivoire a rapporté que l'automédication est pratiquée par 61,8 % des éleveurs. Ainsi, le taux élevé de la pratique de l'automédication est due à l'importance du secteur informel non contrôlé. Cette pratique, de nos jours interdite dans les pays développés, est à l'origine de l'apparition des germes pathogènes multirésistants aux antibiotiques (**AFSSA, 2006**). Le non-respect des délais d'attente après l'administration des antibiotiques et la non-consultation des vétérinaires avant l'utilisation d'antibiotiques sont des facteurs qui favorisent la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans le lait (**Donkor et al., 2011**).

Par ailleurs, les antibiotiques ont été utilisés pour traiter les mammites (35,7 %) dans les élevages. L'utilisation d'antibiotique dans les fermes pour le traitement des mammites est commune à d'autres études où les taux varient entre 2 à 55 % (**Kelton et al., 1998**) et expose les consommateurs à des résidus d'antibiotiques dans le lait et les produits laitiers (**Doyle et al., 2013**). Le médicament vétérinaire couramment utilisé était l'oxytétracycline (57,1 %). Selon les éleveurs qui ont participé aux discussions en groupe, l'utilisation accrue d'oxytétracycline s'explique par le fait qu'il est l'antibiotique le plus rencontré sur le marché. Un éleveur à l'abattoir de Port-Bouët a affirmé en montrant une boîte vide d'oxytétracycline déjà utilisée « *C'est celui-là qu'on utilise parce que c'est ce qu'on trouve sur le marché* ». Un autre à N'dotrè a affirmé « *C'est mon voisin qui m'a conseillé ça pour soigner bœuf qui fait diarrhée là* ». L'oxytétracycline appartient à la famille des tétracyclines, considérée comme la plus utilisée en élevage (**Tahiri et Diouri, 2004**) à cause de son effet bactériostatique à large spectre contre les bactéries Gram (+) et Gram (-) et de son utilisation comme composant de plusieurs produits médicamenteux vendus dans les villes (**Ngoune et al., 2009**). Par ailleurs, en Côte d'Ivoire, 94,5 % des produits vétérinaires commercialisés proviennent de l'Union Européenne (**Oulaï, 2004**) où les tétracyclines ont été les antibiotiques les plus vendus pour usage vétérinaire (**Schwarz et Chaslus-Dancla, 2001 ; Chevance et Moulin, 2013**).

Dans toutes les fermes, il y avait une forte humidité et une présence de boue et d'excréments d'animaux dans l'espace où se déroulait la traite. La présence de boue est un indicateur de risque de contamination du lait (**Benlahcen et al., 2013**). La traite était manuelle et les mauvaises pratiques hygiéniques telles que faire la traite sans lavage préalable des mains des

trayeurs, mélanger le lait de toutes les vaches traitées de la même ferme et des fermes voisines, les ustensiles de traite mal lavés, les mamelles sales non nettoyées, les plongées de doigts dans le lait, la mauvaise qualité de l'eau de traite, l'environnement insalubre et l'absence de système de filtration du lait, ont aussi été décrites à Bamako, Mali par **Bonfoh et al. (2003)** et à Niamey, Niger par **Siousarran, (2003)**. Les éleveurs-trayeurs liaient le lavage des mains aux rapports sexuels. Ainsi, un trayeur révèle que « *tu te laves le matin propre avant d'aller traire les vaches si tu dors avec ta femme* ». Ces mauvaises pratiques constituent un facteur de risque de la contamination du lait cru par le groupe *B. cereus*, pathogène opportuniste et témoin de contamination environnementale.

Le modèle de plastique utilisé pour la collecte, le conditionnement et la vente du lait par les acteurs a été décrit par **Bonfoh et al. (2003)**. Ce modèle n'est pas approprié pour garantir la qualité du lait à cause de sa conductibilité de chaleur, des difficultés de lavage (**Bonfoh et al., 2003**) et de la facilité de *B. cereus* à s'adapter à la paroi par la formation de biofilm rendant ainsi son élimination difficile.

Il y a un manque de chaîne de froid tout au long du circuit et au cours de la vente du lait. Sur les lieux de vente, les vendeurs passent plusieurs heures (5 h 30 mn à 20 h) sous une température ambiante moyenne de  $30,4 \pm 1^\circ\text{C}$  (min =  $29^\circ\text{C}$  ; max =  $32,5^\circ\text{C}$ ). Dans ces conditions de température et de temps, le nombre de germes peut être doublé toutes les 20 minutes (**Bonfoh et al., 2003**) et atteindre au cours de la vente du lait des concentrations susceptibles de présenter un risque de toxi-infections pour le consommateur de lait cru surtout pour les jeunes enfants, les personnes âgées, les femmes enceintes et les personnes immunodéprimées ou souffrant d'une autre maladie (**AFSCA, 2011**). Ces facteurs concourent à la détérioration du lait au cours de la vente s'il est déjà contaminé à la ferme par le groupe *B. cereus*. Le chauffage du lait à la mi-journée favorise la germination et la croissance des spores de *B. cereus* après élimination de la flore compétitive (**Rajkovic et al., 2008**). La vente à la température ambiante, du lait chauffé, tout au long de la journée, est un facteur qui favorise la germination des spores de *B. cereus* due au choc thermique. Le manque de chaîne de froid, l'exposition du lait au soleil ainsi que l'insalubrité accrue des marchés informels (93,3 %) de vente de lait sont des facteurs qui montrent les mauvaises conditions de conservation du lait au cours de la vente.

**Conclusion partielle**

Le système de production, de distribution et de vente du lait cru dans la zone urbaine et périurbaine d'Abidjan est informel avec un élevage laitier traditionnel à structure individuelle. La traite du lait est manuelle et se fait selon le savoir-faire empirique en usage chez les Peuls originaires du Burkina et du Mali avec le non-respect des conditions d'hygiène. L'état sanitaire des fermes est précaire, aucune ferme n'est suivie par un vétérinaire, ni inscrite dans un programme de prophylaxie et 93,3 % des éleveurs utilisent des médicaments vétérinaires parmi lesquels 92,9 % pratiquent l'automédication avec des médicaments de rue. L'oxytétracycline est le médicament vétérinaire majoritairement utilisés. Les problèmes de mammite et de pathologie respiratoire ont été les contextes pathologiques qui ont motivé l'utilisation des antibiotiques. Le mauvais état des fermes, les mauvaises pratiques de traite des éleveurs et des vendeurs et l'utilisation abusive et inappropriée des antibiotiques ne garantissent pas la qualité du lait produit.

## 2. QUALITE PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DU LAIT

### 2.1. Résultats

#### 2.1.1. Qualité physico-chimique du lait cru local

La qualité physico-chimique du lait cru local a été évaluée en fonction de la température de stockage, du pH, la densité et de la présence d'inhibiteurs de croissance.

##### 2.1.1.1. *Qualité physico-chimique du lait en fonction de la température, du pH et de la densité*

##### ✓ Qualité du lait en fonction de la température et du pH

La température du lait immédiatement après la traite est comprise entre 36,1 et 37,5 °C avec une moyenne de  $36,6 \pm 0,4$  °C. La température moyenne du lait de vente est  $31,6 \pm 2,2$  °C (min = 26,6 °C ; max = 34,7 °C). Les températures du lait de quartiers, du lait de tank et du lait de vente sont proches de la température ambiante des fermes (m =  $26,4 \pm 2,1$  °C ; min = 24,1 °C ; max = 30,5 °C) et des points de vente (m =  $30,4 \pm 1$  °C ; min = 29 °C ; max = 32,5 °C), relevée respectivement à 7 et 8 heures du matin (résultats non présentés en tableau).

A la ferme, 95 % du lait ont des pH qui varient de 6,8 à 7,0 avec un pH moyen de  $6,9 \pm 0,1$ , alors qu'ils varient de 6,7 à 6,9 avec une moyenne de  $6,9 \pm 0,2$  aux points de vente. Les valeurs des pH du lait à la ferme et aux points de vente ont permis déduire la qualité du lait le long de la chaîne de production (**tableau 20**). Seulement, 29 % des échantillons de lait analysés respectent les valeurs de pH d'un lait normal ( $6,4 < \text{pH} \leq 6,8$ ) En outre, 70 % des échantillons de lait sont alcalins ( $\text{pH} > 6,8$ ), contre 1 % de lait acide ( $\text{pH} < 6,4$ ). La majorité (69,7 %) des laits alcalins provient du pis de la vache (lait de quartiers). Aucun échantillon de lait prélevé à la ferme (lait de quartiers et lait de tank) n'était acide. Les laits acides ont été retrouvés uniquement sur les points de vente (**tableau 20**).

**Tableau 20** : Qualité du lait à la ferme et au point de vente en fonction du pH

Origine	pH moyen [IC 95°]	Qualité du lait en pourcentage (%)		
		Lait acide (pH < 6,4)	Lait normal (6,4 < pH ≤ 6,8)	Lait alcalin (pH > 6,8)
Lait de quartiers	$6,9 \pm 0,1$ [6,8 - 6,9]	0	30,3	69,7
Lait de tank	$6,9 \pm 0,1$ [6,8 - 7,0]	0	21,4	78,6
Lait de vente	$6,9 \pm 0,2$ [6,7 - 6,9]	5,9	29,4	64,7
<b>Total</b>		<b>1</b>	<b>29</b>	<b>70</b>

## ✓ Qualité du lait de vente en fonction de la densité

Les valeurs de la densité du lait de vente ont permis de déduire sa qualité (**tableau 21**). Au total, 11,8 % des échantillons de lait de vente analysés étaient du lait normal parce qu'ayant une densité ( $1,028 \leq d \leq 1,032$ ). En outre, 52,9 % des échantillons de lait de vente étaient mouillés ( $d < 1,028$ ), contre 35,3 % de lait écrémé ou chauffé ( $d > 1,032$ ).

**Tableau 21** : Qualité du lait de vente en fonction de la densité

Marchés de vente de lait	Qualité du lait de vente en pourcentage (%)		
	Lait mouillé ( $d < 1,028$ )	Lait normal ( $1,028 \leq d \leq 1,032$ )	Lait écrémé/chauffé ( $d > 1,032$ )
Abattoir Port-Bouët (n = 6)	33,3	33,3	33,3
Bagnon Lièvre-rouge (n = 4)	100	0	0
Abobo-Derrière-Rail (n = 7)	42,9	0	57,1
<b>Total</b>	<b>52,9</b>	<b>11,8</b>	<b>35,3</b>

n = nombre d'échantillons de lait de vente

d = densité du lait

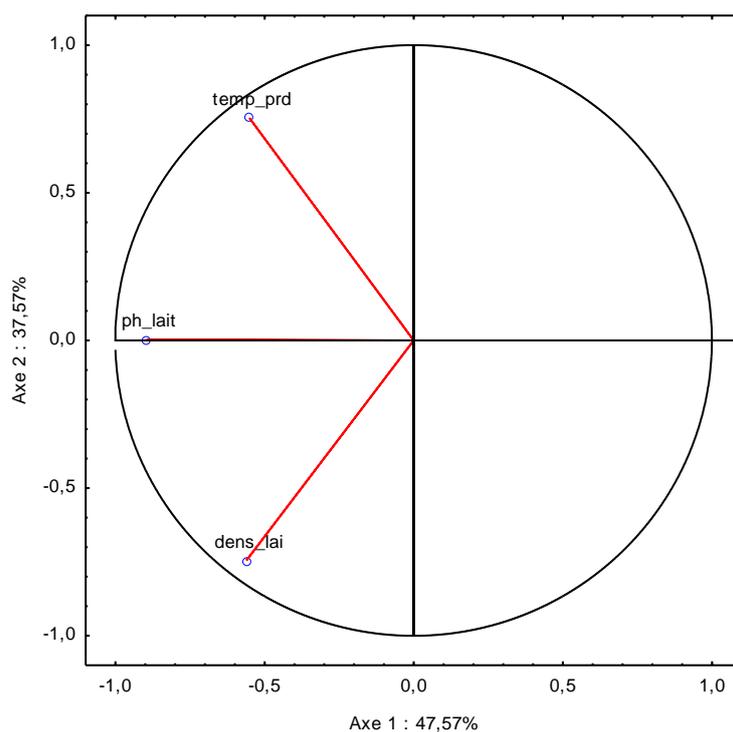
---

✓ Qualité du lait de vente et pratiques des vendeurs

La relation entre la température, le pH et la densité du lait de vente a été établie par l'Analyse en Composante Principale (ACP) suivie d'une classification ascendante hiérarchique selon le critère de Ward afin d'apprécier la qualité ou le type de lait de vente et les pratiques des vendeurs.

Les deux premiers axes factoriels de l'ACP sur les données de la qualité du lait rapportent 85,1 %. L'axe 1 explique 47,8 % de la variation totale et rapporte les conditions de conservation pendant la vente du lait liées au pH. L'axe 2 représente 37,6 % de la variation totale et traduit la matière utile dans le lait (Densité), les pratiques des vendeurs (pH) et les conditions de conservation du lait (température) au lieu de vente (**figure 10**). Il n'existe pas de corrélation entre le pH, la densité et la température du lait de vente ( $p > 0,05$ ).

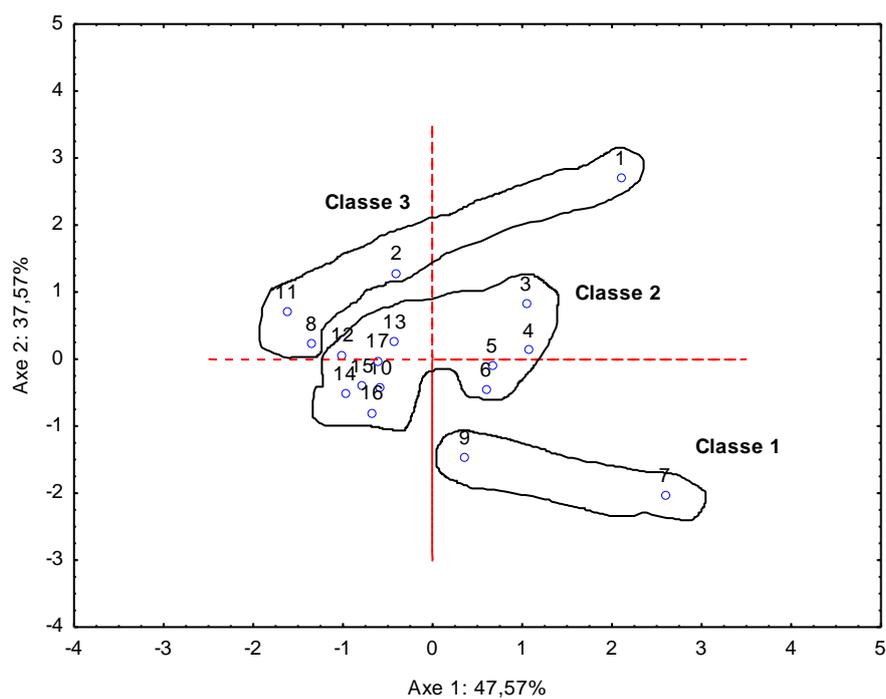
La projection des individus (lait de vente) dans le plan factoriel (Axe 1 et Axe 2) a permis de déterminer trois classes distinctes de lait de vente (**figure 11, tableau 22**). La classe 1 contient 11,8 % des échantillons de lait de vente et se caractérise par un pH et une densité normale associés à une température faible (échantillon 7 et 9). Ces laits illustrent le respect des bonnes pratiques pendant la vente. Il s'agit des vendeurs 3 et 5 du marché de l'abattoir de Port-Bouët. La classe 2 contient 64,7 % des échantillons de lait de vente et se caractérise par des laits alcalins, une densité légèrement inférieure à la normale (lait mouillé) et une température peu élevée. Ces laits illustrent les vendeurs qui respectent plus ou moins les bonnes pratiques. La classe 3 contient 23,5 % des échantillons de lait de vente et représente les laits issus des vendeurs qui n'adoptent pas les bonnes pratiques au cours de la vente du lait (échantillon 1, 2, 8 et 11, **figure 11**). Elle se caractérise par des laits alcalins, une densité très faible environ égale à 1 (lait mouillé) et une température élevée proche de la température du lait à la traite. Il s'agit des laits provenant du vendeur 1 et du vendeur 2 du marché Bagnon à Yopougon lièvre rouge, du vendeur 1 du marché de vente de lait d'Abobo-Derrière-Rail et du vendeur 4 de l'abattoir de Port-bouet.



**Figure 10** : Projection des variables de qualité du lait de vente sur le plan principal de l'ACP.

Dens\_lai : Densité du lait à 25°C, ph\_lait : pH du lait de vente, temp\_prd : Température du lait de vente.

L'axe 1 explique 47,8 % de la variation totale et rapporte les conditions de conservation pendant la vente du lait liées au pH. L'axe 2 représente 37,6 % de la variation totale et traduit la matière utile dans le lait (Densité), les pratiques des vendeurs (pH) et les conditions de conservation du lait (température) au lieu de vente. Ces deux axes représentent 85,1 % des données de la qualité du lait.



**Figure 11** : Projection des classes de lait de vente sur le plan principal de l'ACP

**Tableau 22** : Caractéristiques des trois classes de lait de vente identifiées

Paramètres	Classe 1	Classe 2	Classe 3
Nombre d'échantillon de lait	2	11	4
Température (°C)	26,8 ± 0,3	31,7 ± 1,0	34,0 ± 0,6
pH	6,7 ± 0,4	6,9 ± 0,1	6,9 ± 0,2
Densité à 25 °C	1,029 ± 0,011	1,026 ± 0,017	1,004 ± 0,041

$p > 0,05$

### 2.1.1.2. Présence d'inhibiteurs de croissance dans le lait selon le site de prélèvement

La détection des inhibiteurs de croissance de la flore microbienne du lait par le test de yaourt révèle que 26,1 % des échantillons de lait de quartiers (provenant du pis), 21,4 % des échantillons de lait de tank et 17,6 % des échantillons de lait de vente contiennent des inhibiteurs de croissance qui peuvent être des résidus d'antibiotique (**tableau 23**). Au total, 24,7 % des échantillons de lait analysés contiennent des inhibiteurs de croissance. La présence des inhibiteurs de croissance dans le lait varie significativement selon les sites ( $p < 0,05$ ). À Songon, tous les échantillons de lait contiennent des inhibiteurs alors qu'aucun des échantillons analysés à Abobo-Derrière-Rail n'en contient (**tableau 23**). Les inhibiteurs de croissance ont été majoritairement retrouvés dans le lait de quartiers.

**Tableau 23** : Présence d'inhibiteur de croissance dans le lait selon le site de prélèvement

Sites*	Nature du produit	Présence de résidus d'antibiotique	Absence de résidus d'antibiotique
<b>Port-Bouët</b>	Lait de quartiers	28,6	71,4
	Lait de tank	0	100
	Lait de vente	16,7	83,3
<b>Total</b>		<b>25</b>	<b>75</b>
<b>Songon-té</b>	Lait de quartiers	100	0
	Lait de tank	100	0
<b>Total</b>		<b>100</b>	<b>0</b>
<b>Lièvre-rouge Yopougon</b>	Lait de quartiers	45,5	54,5
	Lait de tank	33,3	66,7
	Lait de vente	50	50
<b>Total</b>		<b>45</b>	<b>55</b>
Abobo-Derrière-Rail	Lait de vente	0	100
	<b>Total</b>	<b>0</b>	<b>100</b>
Abobo-N'dotré	Lait de quartiers	1,8	98,2
	Lait de tank	11,1	88,9
<b>Total</b>		<b>3,1</b>	<b>96,9</b>
<b>Total</b>	Lait de quartiers	26,1	73,9
	Lait de tank	21,4	78,6
	Lait de vente	17,6	82,4
<b>Totaux</b>		<b>24,7</b>	<b>75,3</b>

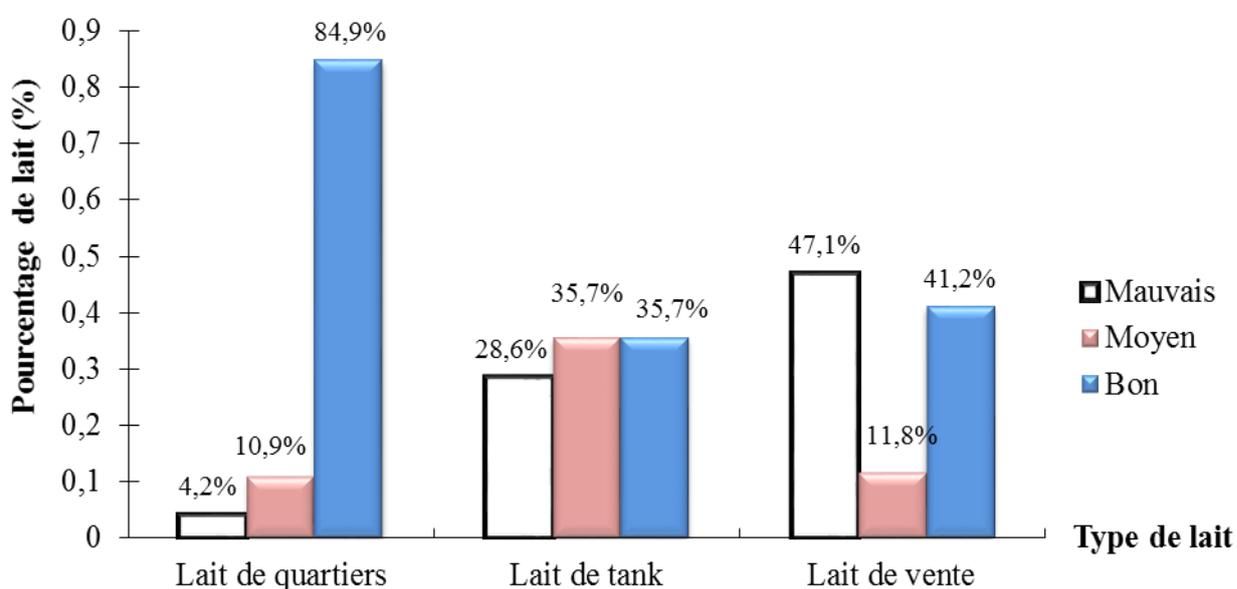
\*  $p < 0,05$

## 2.1.2. Caractéristiques microbiologiques du lait

### 2.1.2.1. Qualité microbiologique globale du lait de la traite à la vente

La qualité globale du lait subissait une détérioration majeure de la traite à la vente. À la ferme, au moment de la traite, 84,9 % des échantillons de lait (lait de quartiers) étaient de bonne qualité microbiologique, contre seulement 4,2 % d'échantillons de lait de mauvaise qualité microbiologique (**figure 12**). Dans le tank de l'éleveur, le nombre d'échantillons de lait (lait de tank) de mauvaise qualité microbiologique augmentait alors que celui de bonne qualité diminuait.

Au point de vente, le nombre d'échantillons de lait (lait de vente) de bonne qualité régressait (41,2 %) tandis que le nombre de lait de mauvaise qualité augmentait (47,1 %).



**Figure 12 :** Qualité microbiologique globale du lait cru local de la traite à la vente

La couleur obtenue est fonction de la charge bactérienne du lait.

Couleur bleue : lait faiblement contaminé (moins de 100 000 germes/mL), c'est le lait de bonne qualité;

Couleur rose : lait contaminé (plus de 1 million de germes/mL), c'est le lait de qualité moyenne;

Couleur blanche : lait très contaminé (plus de 10 millions de germes/mL), c'est le lait de mauvaise qualité.

---

### 2.1.2.2. Points critiques et sources de contamination du lait cru par le groupe *Bacillus cereus*

Le lait a été contaminé par le groupe *B. cereus* tout le long de la chaîne de production, de la ferme à la vente. Le taux moyen de contamination des échantillons de lait a été de 28,7 %. De 26,9 % dans le lait de quartiers prélevé au pis de la vache, le taux de contamination des échantillons de lait a augmenté pour atteindre 41,2 % dans le lait de vente pris au point de vente (**tableau 24**). Au point de vente (lait de vente), le taux de contamination des échantillons de lait a été supérieur à ceux observés dans le lait prélevé à la ferme (lait de quartier et le lait de tank). Ces résultats ont permis de déduire que la contamination du lait avait lieu respectivement au pis des mamelles des vaches laitières, dans le tank de l'éleveur et dans le bidon du vendeur qui constituent par conséquent les points critiques de la contamination du lait.

Les charges moyennes en groupe *B. cereus* et les taux de contaminations des échantillons analysés permettent de déduire que les principales sources de contamination du lait par le groupe *B. cereus* sont respectivement la peau des mamelles des vaches laitières (64,6 %), l'eau de robinet conservée dans la barrique de l'éleveur (60 %) et l'environnement (53,3 %). Les sources secondaires de contamination du lait par le groupe *B. cereus* sont principalement les mains des trayeurs.

### 2.1.2.3. Contamination du lait par le groupe *Bacillus cereus* et qualité du lait

Les charges moyennes en groupe *B. cereus* des échantillons de lait augmentaient progressivement du lait de quartiers, prélevés au pis des vaches laitières ( $2,6 \pm 0,6$  log UFC/mL), au lait de vente issu des points de vente ( $2,9 \pm 1,0$  log UFC/mL ; **tableau 24**). Les charges en groupe *B. cereus* ont permis de déduire la qualité microbiologique des laits analysés aux points critiques (**tableau 25**). Tous les échantillons de lait de vente contaminés par le groupe *B. cereus* ont des charges qui dépassaient les limites acceptables. Parmi eux, 23,5 % avaient une charge variant de 1,7 log (UFC/mL) à 2,7 log (UFC/mL) et 17,6 % avaient une charge supérieure à 2,7 log (UFC/mL) sans atteindre 5 log (UFC/mL). Selon les normes internationales, 58,8 % des échantillons de lait de vente étaient classés de qualité microbiologique satisfaisante, 23,5 % étaient de qualité microbiologique insatisfaisante et 17,6 % étaient de qualité microbiologique insatisfaisante avec risque de toxi-infections pour le consommateur.

**Tableau 24** : Charges moyennes en groupe *Bacillus cereus* dans les échantillons et sources de contamination du lait

Paramètres	Charge en log (UFC/mL)			Pourcentage d'échantillons contaminés (%)
	Minimum	Moyenne	Maximum	
<b>Points critiques de contamination</b>				
Lait de quartiers	2,6	2,6 ± 0,6	4,1	26,9
Lait de tank	2,3	2,8 ± 0,6	3,7	28,6
Lait de vente	2,0	2,9 ± 1,0	4,5	41,2
<b>Proportion totale de lait contaminé</b>				<b>28,7</b>
<b>Sources principales de contamination</b>				
Peau mamelles vache	1,0	2,2 ± 0,6	5,5	64,6
Eau de traite	2,1	2,6 ± 0,7	3,5	60,0
Environnement (Air)	1,0	1,8 ± 0,5	2,5	53,3
<b>Sources secondaires de contamination</b>				
Mains des trayeurs	1,5	2,3 ± 0,4	2,9	40,9
Ustensiles de traite	1,6	1,8 ± 0,5	2,1	26,7

**Tableau 25** : Qualité microbiologique des différents types de lait

Qualité du lait	Critères microbiologiques (log UFC/mL)	Pourcentage des différents types de lait (%)			
		Lait de quartiers	Lait de tank	Lait de vente	Total
Satisfaisante	$N \leq 1,7$	73,1	71,4	58,8	71,3
Insatisfaisante	$1,7 < N \leq 2,7$	16,0	14,3	23,5	16,7
Insatisfaisante avec risque pour la santé humaine	$2,7 < N < 5$	10,2	14,3	17,6	12,0

---

## 2.2. Discussion

La mesure de la densité a permis de déduire les pratiques frauduleuses des vendeurs. Dans cette étude, la majorité (52,9 %) des laits prélevés au point de vente sont mouillés (ajout d'eau ou autre substance) alors qu'à Bamako, au Mali, seulement 22 % du lait frais local ont été mouillés à l'eau. Cette pratique, utilisée par les vendeurs pour rentabiliser la vente (**Bonfoh *et al.*, 2003**) est, par conséquent, fréquente chez les vendeurs à Abidjan. Le mouillage du lait n'est pas seulement une pratique frauduleuse, mais dangereuse car si l'eau utilisée est sale, le vendeur expose le consommateur de lait cru au risque de toxi-infections. En effet, le contact du lait avec l'eau polluée constitue l'une des sources majeures de la contamination du lait détériorant ainsi sa qualité hygiénique (**Tourette *et al.*, 2002**).

Le pH du lait variait de 6,4 à 7,1 avec un pH moyen de  $6,9 \pm 0,1$ . La majorité (70,7 %) des échantillons de lait recueillis ne respectait pas les standards de lait de vache (entre 6,4 et 6,8). En somme, 79 % des laits à pH anormal provenaient du lait prélevé au niveau du pis de la vache. Ces valeurs de pH sont plus élevées que celles rapportées par **N'goran *et al.* (2013)** dans leur étude sur la qualité hygiénique et la prévalence de contamination du lait des fermes péri-urbaines dans le district des lagunes au sud de la Côte d'Ivoire. Ils ont rapportés des pH se situant entre 6,6 et 6,9. Le pH élevé du lait serait dû à la présence de mammite ou à la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait qui pourrait en modifier considérablement la composition mais, aussi à des traites de lait chez des vaches en fin de lactation.

Le taux de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques était de 24,7 %. Ce résultat corrobore avec ceux de **Sraïri *et al.* (2005)** où le taux moyen de contamination du lait par les antibiotiques en étables suburbaines au Maroc était de 25 %. Par ailleurs, des taux plus faibles (6 %) de contamination du lait par les résidus d'antibiotiques ont été rapportés à Bamako, au Mali (**Bonfoh *et al.*, 2003**). Le taux élevé de résidus d'antibiotiques dans le lait à Abidjan confirme le non-respect des délais d'attente par les éleveurs après administration des antibiotiques. C'est aussi la conséquence de l'utilisation incontrôlée des médicaments vétérinaires (posologie inadaptée, fréquence d'administration), la non-consultation des vétérinaires avant l'utilisation d'antibiotiques et l'absence de formation préalable en production animale (**Donkor *et al.*, 2011**). Un autre facteur favorisant la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait est la faible production de lait qui fait que les producteurs n'éliminent pas le lait des vaches traitées avec des antibiotiques et enfin, le mélange à la ferme, dans le même tank ou bidon, les laits contenant ou non des résidus antibiotiques. Ces pratiques, plus fréquentes sur les sites de Songon-té et de Lièvre rouge ont été aussi observées par d'autres auteurs (**Bonfoh *et al.*, 2003 ; Abidi, 2004 ; Donkor *et al.*, 2011**).

La consommation de lait contenant des résidus d'antibiotiques constitue un risque potentiel pour la santé du consommateur (**Doyle et al., 2013**). Aussi, les résidus d'antibiotiques inhibent de manière partielle ou totale la croissance des bactéries lactiques qui jouent un rôle important comme ferment en acidifiant le lait. Ce qui se traduit par de nombreux défauts et parfois par l'inhibition totale des ferments, créant ainsi des problèmes technologiques pour les transformations ultérieures du lait entraînant de nombreuses pertes pour les industriels (**Fabre et al., 2006 ; Arnesen et al., 2007 ; Valero et al., 2007 ; Thorsen et al., 2009**). Les problèmes technologiques, ajoutés aux risques pour la santé publique liés à la consommation de lait contenant les résidus d'antibiotiques, doivent conduire à un renforcement progressif de la législation sur les médicaments vétérinaires dans la filière laitière à Abidjan, à la prise de mesures de prévention et de contrôle des risques liés à la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait.

Les analyses multidimensionnelles ont permis de mettre en relation la qualité du lait vendu sur les marchés informels et les pratiques des vendeurs selon les trois principaux groupes de variables reflétant la qualité du lait : la matière utile (pH et densité), les conditions de vente et de conservation du lait pendant la vente (température). La classe 1, regroupant 11,8 % des échantillons de lait de vente, se caractérise par un pH et une densité normale associés à une température faible. Elle illustre le respect des bonnes pratiques pendant la vente et représente les laits de meilleures qualités hygiéniques par rapport aux laits des autres vendeurs. La classe 2 et la classe 3 sont constituées des échantillons de lait de plus mauvaise qualité. Elles représentent les laits issus des vendeurs qui n'adoptent pas les bonnes pratiques au cours de la vente du lait. Les mauvaises pratiques telles que l'adultération du lait et la non conservation du lait au froid au cours de la vente pendant de longues heures sont des pratiques qui ont contribué à la détérioration du lait contaminé à son arrivée sur les lieux de vente et constituent un risque pour le consommateur de lait cru. Toutefois, les résultats de toutes les analyses n'ont pas montré une forte variabilité au niveau des pratiques de gestion de la qualité sanitaire du lait au point de vente sur l'ensemble des sites.

Les résultats de l'analyse de la qualité globale du lait par le test à la résazurine ont révélé que dans l'ensemble 75,3 % de lait étaient de bonne qualité. Ce résultat a été influencé par l'important taux de lait de bonne qualité prélevé directement aux pis de la vache laitière. En effet, 84,9 % du lait individuel de vache étaient de bonne qualité, témoignant du bon état sanitaire des vaches laitières car un animal sain dont la traite est effectuée dans de bonnes conditions d'hygiène produit normalement un lait peu contaminé (**Faye et Loiseau, 2002**). Le

---

lait a été contaminé au cours de la traite à cause des mauvaises conditions de traite et de conduite des troupeaux relevées par une variété de sources dont la peau des mamelles, l'environnement, l'eau, les mains des trayeurs, le sol et le matériel de traite (**Lejeune et Rajala-Schultz, 2009 ; Vacheyrou *et al.*, 2011**). La qualité sanitaire du lait s'est détériorée pendant le stockage à la ferme, puis au cours du transport de la ferme au lieu de vente. Ainsi, la proportion de lait de bonne qualité a chuté de moitié (84,9 % à 41,2 %) du pis de la vache au bidon du vendeur. **Grillet *et al.* (2005)** ont rapporté ces mêmes détériorations de la qualité du lait au cours du transport dans leur étude sur la qualité sanitaire du lait cru dans le district de Mbarara et dans la ville de Kampala en Ouganda. Cette altération majeure de la qualité globale du lait est liée en partie aux mauvaises conditions hygiéniques relevées tout au long de la chaîne de production à la vente du lait. La mauvaise gestion de l'hygiène à tous les niveaux et le manque de chaîne de froid ont contribué à la dégradation rapide du lait cru pendant son acheminement sur les marchés informels (**Grillet *et al.*, 2005**).

La qualité microbiologique du lait reflète bien les mauvaises conditions de production du lait à la ferme et de conservation sur les points de vente. Les charges moyennes en groupe *B. cereus* du lait de quartiers, du lait de tank et du lait de vente étaient respectivement de  $2,6 \pm 0,6$  log (UFC/mL), de  $2,8 \pm 0,6$  log (UFC/mL) et de  $2,9 \pm 1,0$  log (UFC/mL) de lait. La charge élevée du lait de vente laisse supposer qu'il y a eu une contamination croisée du lait à l'intérieur du bidon (ou tank) du berger qui serait consécutive à un nettoyage et à une désinfection inefficaces et au mélange des laits des vaches non contaminées et contaminées (**Faye et Loiseau, 2002**). Ensuite, les germes se sont développés sous l'effet de la chaleur ( $30,4 \pm 1$  °C) lors du transport du lait vers les marchés informels de vente de lait.

La température moyenne du lait de vente était  $31,6 \pm 2,2$  °C (min = 26,6 °C ; max = 34,7 °C). Ces températures indiquent la précarité de la conservation du lait par le vendeur (**Bonfoh *et al.*, 2003**). À ces températures, il est reconnu que la croissance des microorganismes se développant dans le lait est maximale.

En conséquence, 41,2 % du lait de vente sont contaminés par le groupe *B. cereus* à des niveaux dépassant les limites acceptables. La présence de *B. cereus* dans le lait à des valeurs supérieures ou égales à 500 UFC/mL montre une situation critique et inquiétante aussi bien pour les laits du circuit de vente directe (points de vente) que dans les circuits de production à la ferme où la commercialisation est faite en l'état. Il ressort de ce qui précède que le lait est contaminé au niveau du pis des mamelles des vaches laitières, du tank de l'éleveur et du bidon du vendeur qui constituent par conséquent, les points critiques de la contamination du lait.

Les vaches laitières ne subissent aucun soin particulier et leurs mamelles sont en contact direct avec la litière (sol) et la boue (environnement) qui constituent un réservoir naturel de *B. cereus* (Vilain *et al.*, 2006 ; Magnusson, 2007). Il y a eu une contamination de la peau des mamelles par la litière et la boue (Vacheyrou *et al.*, 2011). Au cours de la traite, le lait est contaminé ‘‘via’’ les mains des trayeurs étant donné qu’aucun lavage des mamelles n’était effectué pour éliminer les souillures. Les espèces du groupe *B. cereus* ont pu proliférer aisément puisque d’une part, les méthodes de lavage des équipements utilisées dans les systèmes de production n’étaient pas adéquates pour éliminer les spores et d’autre part, la température (min = 26,6 °C ; max = 34,7 °C) qui régnait tout au long du circuit de production était favorable à leur croissance. Ainsi, l’environnement, la peau des mamelles des vaches laitières et l’eau de robinet conservée dans la barrique de l’éleveur utilisée pour la traite sont les principales sources de contamination du lait, tandis que les mains des trayeurs et les ustensiles sont les sources secondaires de contamination du lait par le groupe *B. cereus*.

### **Conclusion partielle**

Le lait est contaminé par le groupe *B. cereus* tout le long de la chaîne de production à la commercialisation. Le quart du lait sur les marchés informels à Abidjan est de qualité microbiologique insatisfaisante avec un risque modéré pour le consommateur de lait cru. La mauvaise qualité sanitaire du lait qui arrivait sur les marchés informels de lait était due non seulement aux sources de contamination qui sont liées essentiellement au manque d’hygiène en amont de la filière, notamment au niveau de la ferme ; mais également aux conditions de conservation lors du transport et au cours de la vente. Ces mauvaises conditions susmentionnées facilitent le développement bactérien et accentuent ainsi la contamination globale du lait. L’environnement, la peau des mamelles des vaches laitières et l’eau de robinet conservée dans la barrique de l’éleveur, utilisée pour la traite sont les principales sources de contamination du lait, tandis que les mains des trayeurs et les ustensiles sont les sources secondaires de contamination du lait par le groupe *B. cereus*.

---

### 3. CARACTÉRISTIQUES DU SYSTÈME DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION ET FACTEURS DE RISQUE DE CONTAMINATION DE L'ATTIÉKÉ

#### 3.1. Résultats

##### 3.1.1. Circuits de production, de distribution et de vente de l'attiéké à Abidjan

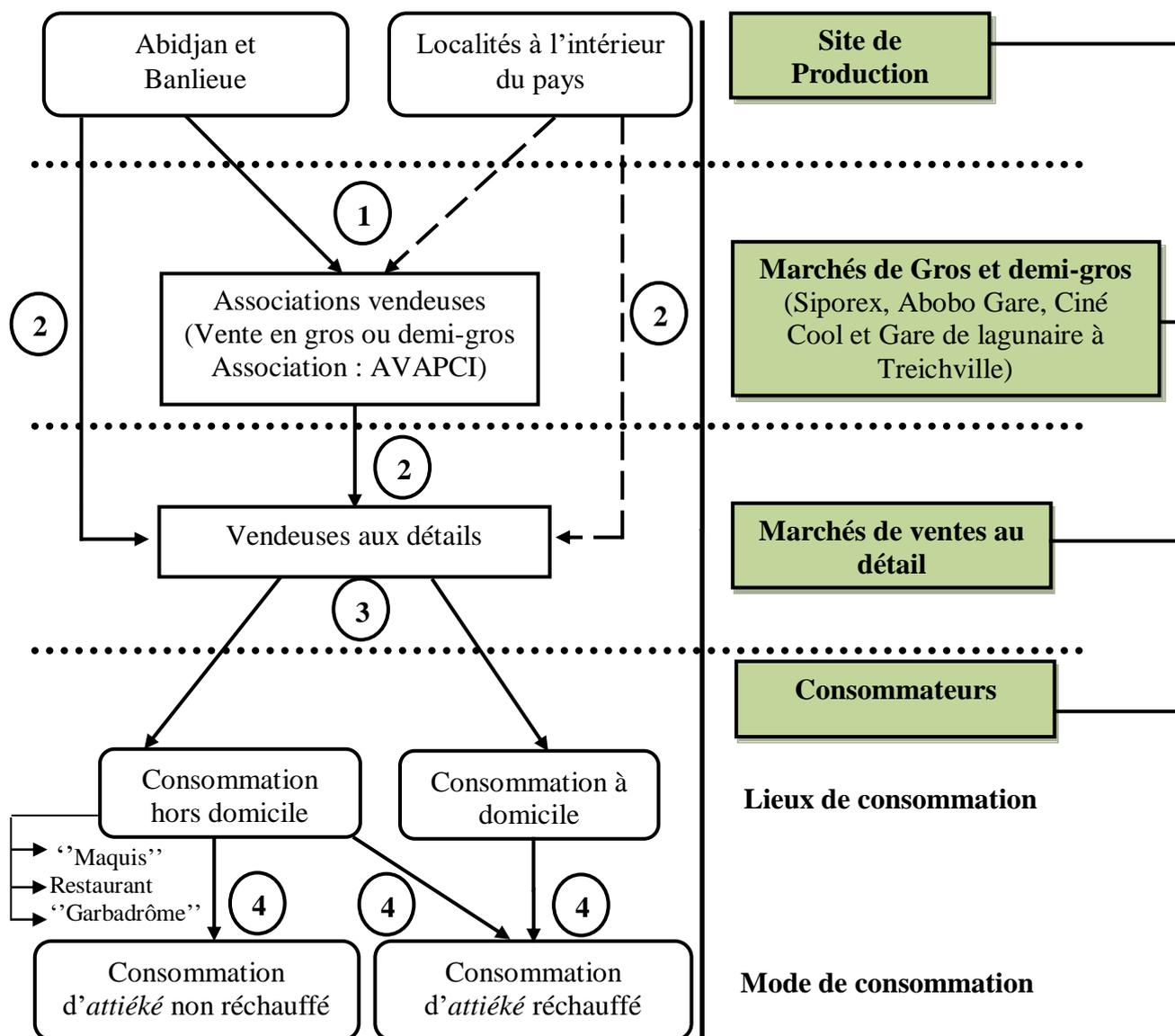
Les observations et prospections sur le terrain ont permis de reproduire la chaîne de production à la vente de l'attiéké sur les marchés dans les différentes communes à Abidjan. L'attiéké vendu sur les marchés informels de vente d'attiéké à Abidjan était commercialisé selon deux voies (**figure 13**).

D'une part et en dehors de rares productrices qui écoulaient leur produit sur les marchés de gros et demi-gros, l'attiéké produit à Abidjan et Banlieues est essentiellement vendu sur les marchés des quartiers directement aux détaillants (Voie 1). L'attiéké était conditionné dans des sachets plastiques non alimentaires de 174 à 913 g. Cette voie de distribution et de vente informelle d'attiéké véhicule environ 20 à 25 % de l'attiéké consommé par les Abidjanais.

D'autre part, l'attiéké produit dans les localités de l'intérieur du pays est convoyé dans les marchés de gros ou demi-gros de Siporex (Yopougon), d'Abobo gare et de Ciné cool (Abobo) ; et de la gare lagunaire à Treichville (Voie 2). L'attiéké était conditionné dans des paniers de fortune en raphia, tapissés soit de film plastique recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées "feuilles d'attiéké". L'autre mode de conditionnement était caractérisé par de l'attiéké emballé dans des sacs ou sachets plastiques non alimentaires de 25 à 50 kg (bal d'attiéké). Le transport de l'attiéké se faisait par des cars ou minicars de transport en commun.

L'activité de production, de distribution et de vente de l'attiéké à Abidjan était exercée par les femmes. Dans les grands marchés, les femmes étaient le plus souvent regroupées en association. La vente d'attiéké se faisait en gros, en demi-gros ou au détail. Cette voie (voie 2) de distribution et de vente informelle d'attiéké véhicule environ 60 à 70 % de l'attiéké consommé par les Abidjanais

Les deux voies de distribution et de vente informelle d'attiéké fournissaient 85 à 95 % de l'attiéké consommé à Abidjan. L'attiéké issu des deux voies était ensuite vendu au détail sous forme de boules, emballé dans des sachets plastiques ou en vrac dans les paniers originels de livraison. Les sites de vente sont constitués des marchés des communes d'Abidjan, les abords des routes, les restaurants et les "maquis". Il existait également un mode de vente qui se faisait de « porte à porte », c'est-à-dire d'un domicile (maison) à l'autre.



**Figure 13 :** Diagramme de la chaîne de production à la consommation de l'attiéké à Abidjan

(1) Transport sur les marchés de gros et demi gros, (2) Transport sur les marchés de ventes au détail, (3) Lieux de consommation, (4) Mode de consommation

—→ Voie 1  
 - - -→ Voie 2

Les deux voies de distribution et de vente informelle de l'attiéké fournissent 85 voire 95% de l'attiéké consommé à Abidjan.

### 3.1.2. Pratiques et facteurs de risques de contamination de l'*attiéké* par *Bacillus cereus*

#### 3.1.2.1. État sanitaire des sites de production de l'*attiéké*

L'*attiéké* était produit du lundi au samedi sur l'ensemble des quatre sites.

Les sites d'Azito et d'Avocatier disposaient d'un espace pour la production de l'*attiéké*. Seul le site d'Azito, disposait d'une aire aménagée, salubre où les femmes étaient regroupées en coopérative pour la production d'*attiéké*. Les trois autres sites de production d'*attiéké* manquaient de dispositifs sanitaires, de gestion des déchets solides et liquides. Les aires d'éviscération et de parages collectives étaient mal entretenues (**tableau 26**).

#### 3.1.2.2. Conditions de production et de vente d'*attiéké*

Les ustensiles utilisés dans les différentes opérations de production d'*attiéké* étaient constitués de bassines en plastique (87,5 %) et des cuvettes en aluminium (12,5 %) parfois égratignés par leur usage abusif et le manque de soins adéquats (**tableau 26**).

Les semoules de racine de manioc étaient séchées au soleil à même le sol sur des sachets plastiques ou dans des vans disposés sur des pneus usagés, sauf à Avocatier où le séchage était effectué sur des claies en hauteur. Les vans utilisés pour le séchage et le vannage des semoules d'*attiéké* étaient en raphia et badigeonnés d'une pâte obtenue par le mélange de la bouse de bovin et de la pâte de manioc. La cuisson d'*attiéké* se faisait à l'aide du bois de chauffage dans un couscoussier constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. La cuisson était constatée de façon visuelle, au goût et/ou au parfum.

Au cours de la vente, l'*attiéké* était fréquemment manipulé. Dans les restaurants et les "maquis", le service de l'*attiéké* se faisait à la main. Dans les marchés de gros et de demi-gros, les vendeuses ont rapporté que l'*attiéké* non vendu, après une semaine, était séché au soleil et stocké dans des sacs. L'*attiéké* était réchauffé à la vapeur d'eau et vendu à nouveau, surtout lorsqu'il n'y avait pas de nouvel approvisionnement. Chez les détaillants, l'*attiéké* non vendu 2 à 4 jours après production, était réchauffé à la vapeur d'eau, puis revendu.

**Tableau 26** : État sanitaire des sites de production de l'*attiéké* et des ustensiles utilisés

Paramètres	Effectif	Pourcentage (%)
<b>Site de production de l'<i>attiéké</i> (n = 4)</b>		
Présence d'un espace pour la production de l' <i>attiéké</i>		
Non	2	50
Oui	2	50
Présence d'un espace aménagé et salubre pour la production de l' <i>attiéké</i>		
Non	1	25
Oui	1	25
Site de production salubre	1	25
Présence de dispositifs sanitaires et de gestion des déchets sur le site	1	25
Présence d'aire d'éviscération et de parages collectives	1	25
Entretien des aires d'éviscération et de parages collectives	1	25
<b>Productrices d'<i>attiéké</i> (n = 16)</b>		
Matériau des ustensiles utilisés pour la production de l' <i>attiéké</i>		
Caoutchouc dur	14	87,5
Aluminium	2	12,5
État des ustensiles utilisés pour la production de l' <i>attiéké</i>		
Mauvais avec des égratignures	14	87,5
Bon état	2	12,5

### 3.2. Discussion

La production et la commercialisation de l'*attiéké* à Abidjan et en banlieues se font dans un système traditionnel à deux voies qui s'imbriquent au niveau de la commercialisation. Le mauvais conditionnement de l'*attiéké* vendu sur les marchés à Abidjan est susceptible de favoriser sa contamination au cours de la vente. Cette étude révèle que 75 % des sites de production de l'*attiéké* sont dans un état d'insalubrité important, sans assainissement adéquat ni de dispositifs sanitaires et de gestion des déchets solides et liquides. La précarité des sites de production de l'*attiéké* est due d'une part, au fait que la plupart des productrices sont des femmes à faibles moyens financiers et exercent cette activité pour subvenir aux besoins de leur famille. Par conséquent, elles consacrent moins de ressources financières à l'entretien des sites. D'autre part, parce que les productrices vivent dans des cours communes et la promiscuité ne leur permet pas d'entretenir véritablement l'espace réservé à la production de l'*attiéké* (Djéni *et al.*, 2014). Cette précarité des sites de production d'*attiéké* a été précédemment rapportée par Djéni *et al.* (2014) dans une étude sur l'évaluation des connaissances, des attitudes et des pratiques des manipulateurs dans les unités de production de l'*attiéké* en relation avec l'hygiène et la sécurité sanitaire des aliments en Côte d'Ivoire. Par ailleurs, il a été également rapporté que l'*attiéké* produit dans les conditions d'hygiène précaire ou dans les conditions insalubres est susceptible d'être contaminé par les bactéries pathogènes (Kunwar *et al.*, 2004).

L'étude a permis de constater l'utilisation récurrente d'ustensiles en plastique (87,5%) et en aluminium (12,5%) avec parfois des surfaces égratignées. Cette situation représente un risque de ré-contamination de l'*attiéké* car les égratignures pourraient constituer un nid de microorganismes en générale et du groupe *Bacillus cereus* en particulier, capable de former des biofilms sur des surfaces inertes (Ankolekar et Labbé, 2010). Le mauvais état des ustensiles utilisées par les productrices d'*attiéké*, associé à la précarité sanitaire des sites de production et du manque de dispositifs de gestion des déchets solides et liquides, augmente le risque de contamination de l'*attiéké* par les germes pathogènes et par le groupe *B. cereus* sur les sites de production de l'*attiéké*.

Le réchauffage est un moyen de préservation de la qualité microbiologique des aliments. Mais, il constitue un facteur de risque de contamination de l'*attiéké* en vente sur le marché par le groupe *B. cereus*. En effet, l'*attiéké* mal réchauffé est propice au développement des spores du groupe *B. cereus* sous l'effet de la chaleur et après élimination de la flore compétitive. Les spores vont germer au cours de la vente à la température ambiante à des concentrations

dépassant les limites acceptables et constituer un risque de développement des toxi-infections alimentaires chez le consommateur.

### **Conclusion partielle**

Cette étude révèle que 75 % des sites de production de l'*attiéké* sont dans un état d'insalubrité important, sans assainissement adéquat ni de dispositifs sanitaires et de gestion des déchets solides et liquides. L'état sanitaire précaire des sites de production de l'*attiéké* expose davantage l'*attiéké* fraîchement préparé à une éventuelle contamination par les pathogènes de l'environnement et l'air, spécifiquement par le groupe *B. cereus*. La vente de l'*attiéké* réchauffé pendant plusieurs jours à la température ambiante est un facteur de risque de développement des spores du groupe *B. cereus* à des concentrations pouvant constituer un risque de toxi-infections pour le consommateur.

---

## 4. QUALITÉ PHYSICO-CHIMIQUE ET MICROBIOLOGIQUE DE L'ATTIÉKÉ

### 4.1. Résultats

#### 4.1.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'*attiéké*

##### ✓ Température de l'*attiéké*

Les températures moyennes de cuisson des semoules de manioc en cuisson et celles de l'*attiéké* fraîchement préparé n'étaient pas significativement différentes ( $p > 0,05$ ). Pour les mêmes quantités d'*attiéké* produites, les températures de cuisson de l'*attiéké* prises à la surface et au cœur du couscoussier n'étaient pas significativement ( $p > 0,05$ ) liées aux sites de production. Elles varient de 96 à 100 °C (**tableau 27**). De même la température moyenne de l'*attiéké* une heure après la cuisson ( $32,6 \pm 3,4$ ) n'étaient pas significativement ( $p < 0,05$ ) différente de celle de l'*attiéké* en vente sur les marchés ( $29,2 \pm 2,2$ ). La température de l'*attiéké* en vente ( $29,2 \pm 2,2$  °C) était proche de la température ambiante ( $31,2 \pm 0,6$  °C) prise au cours de l'étude (mars-juin 2010).

##### ✓ Durée de cuisson de l'*attiéké*

La durée de cuisson de l'*attiéké* variait de 21 à 52 min avec une moyenne de  $35,4 \pm 8,5$  min pour les mêmes quantités d'*attiéké* produites. Elle était la plus élevée à Avocatier avec une durée moyenne de cuisson de  $40,5 \pm 5,1$  min. La durée de cuisson la plus faible a été retrouvée à Anoumambo avec un temps moyen de  $30,5 \pm 7,2$  min (**tableau 28**). Selon l'analyse de variance à un facteur, la durée de cuisson d'*attiéké* n'était pas liée au site de production ( $F = 1,099$  ;  $ddl = 15$ ,  $p = 0,387 > 0,05$ ).

**Tableau 27** : Température de l'*attiéké*

Paramètres	Températures en °C		
	Minimum	Maximum	Moyenne
Cuisson de l' <i>attiéké</i>	98,0	100,0	99,6 ± 0,6
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	96,0	100,0	98,3 ± 1,5
<i>Attiéké</i> une heure après la cuisson	28,0	36,6	32,6 ± 3,4
<i>Attiéké</i> en vente	21,1	35,2	29,2 ± 2,2

**Tableau 28** : Durée de cuisson au cours de la préparation de l'*attiéké* selon le site de production

Sites	Température de cuisson (°C)	Durée de cuisson au cours de la préparation de l' <i>attiéké</i> en min			Intervalle de confiance à 95 %
		Minimum	Maximum	Moyenne	
Avocatier	99,1 ± 0,9	34	45	40,5 ± 5,1	[32,4 – 48,6]
Azito	99,8 ± 0,5	26	52	37,5 ± 12,2	[18,1 – 56,9]
Abobodoumé	100,0	26	43	33,3 ± 7,8	[20,8 – 45,7]
Anoumambo	99,4 ± 0,3	21	37	30,5 ± 7,2	[19,1 ± 41,9]

$F = 1,099$ ,  $ddl = 15$ ,  $p = 0,387 > 0,05$

- 
- ✓ Teneur en eau de la pâte de manioc fermentée pressée séchée et de l'*attiéké*

La teneur en eau de la pâte de manioc fermentée pressée séchée variait de 36,1 à 57,3 % avec une moyenne de  $48,9 \pm 6,8$  %. La teneur en eau de l'*attiéké* fraîchement préparé et celle de l'*attiéké* en vente sur les marchés variaient de 49,5 % à 56,2 % et de 42,6 % à 60,5 % avec pour moyenne respectivement de  $51,5 \pm 1,9$  % et de  $49,9 \pm 2,2$  % (**tableau 29**).

La teneur en eau diminuait au cours de la vente. Elle était de  $50,3 \pm 2,2$  % pour l'*attiéké* en vente depuis deux jours et de  $48,2 \pm 2,3$  pour l'*attiéké* en vente de plus de trois jours. Le test de Student montre que la teneur en eau de l'*attiéké* en vente sur le marché est fonction de la durée de conservation ou durée de vente ( $t = 2,597$  ;  $ddl = 1$  ;  $p < 0,05 = 0,01$ ).

- ✓ pH de la pâte de manioc fermentée pressée séchée et de l'*attiéké*

Le pH moyen de la pâte de manioc fermentée pressée séchée ( $5,3 \pm 0,2$ ) n'était pas significativement différent ( $p > 0,05$ ) de celui de l'*attiéké* fraîchement préparé ( $5,2 \pm 0,2$ ). Le pH de l'*attiéké* en vente sur les marchés était inférieur à celui de l'*attiéké* fraîchement préparé. Le pH de l'*attiéké* diminue au cours de la vente. Il passe de  $5,0 \pm 0,3$  au cours des deux premiers jours de vente à  $4,8 \pm 0,2$  du 3<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> jour de vente (**tableau 30**). Les légères variations observées ne sont pas statistiquement significatives au seuil de 5 % ( $p > 0,05$ ).

**Tableau 29** : Teneur en eau de la pâte de manioc fermentée séchée et de l'*attiéké*

Produits	Teneur en eau (%)	
	Min - Max	Teneur moyenne en eau
PMFPS	36,1 - 57,3	48,9 ± 6,8
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	49,5 - 56,2	51,5 ± 1,8
<i>Attiéké en vente</i>	28,3 - 57,2	49,2 ± 2,5
1 - 2 jours	45,9 - 57,3	50,3 ± 2,2
3 - 5 jours	28,3 - 52,8	48,2 ± 2,3

Min = Minimum ; Max = Maximum ; (t = 2,597 ; ddl = 1 ; p < 0,05 = 0,01)

PMFPS : Pâte de manioc fermentée pressée séchée

**Tableau 30** : pH de la pâte de manioc fermentée pressée séchée, de l'*attiéké* fraîchement préparé et de l'*attiéké* en vente sur les marchés informels

Nature du produit	Min - Max	pH moyen ± E	Intervalle de confiance à 95%
PMFPS	5,0 - 5,7	5,3 ± 0,2	[5,1 - 5,4]
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	4,9 - 5,5	5,2 ± 0,2	[5,1 - 5,3]
<i>Attiéké en vente</i>	4,4 - 7,2	5,0 ± 0,3	[4,9 - 5,0]
1 - 2 jours	4,5 - 7,2	5,0 ± 0,3	[4,9 - 5,0]
3 - 5 jours	4,4 - 5,2	4,8 ± 0,2	[4,8 - 4,9]

Min = Minimum ; Max = Maximum ; E = Écart type

PMFPS : Pâte de manioc fermentée pressée séchée

p > 0,05

#### 4.1.2. Caractéristiques microbiologiques de l'*attiéké*

##### 4.1.2.1. Présence du groupe *Bacillus cereus* dans les intrants et dans les produits intermédiaires de l'*attiéké*, l'environnement et l'eau d'utilisation

Les formes végétatives du groupe *B. cereus* ont été isolées dans les intrants, dans l'environnement de production de l'*attiéké*, dans l'eau d'utilisation sur les sites ainsi que dans les produits intermédiaires du processus de production (**tableau 31**).

Les échantillons d'huile de palme décoloré contenaient les formes végétatives et les spores du groupe *B. cereus* dans les mêmes proportions, soit 37,5 %. En dehors de l'huile de palme décolorée, tous les (100 %) échantillons d'intrants et de produits intermédiaires du processus de production de l'*attiéké* contenaient des formes végétatives du groupe *B. cereus*.

Les spores du groupe *B. cereus* ont été également isolées, mais les taux les plus élevés ont été rencontrés dans la pâte de manioc pressée (81,2 %) et la pâte de manioc fermentée pressée séchée (81,2 %).

L'environnement et l'eau utilisée ont été chacun contaminés dans les mêmes proportions par les formes végétatives (75 %) et par les spores (62,5 %).

Par conséquent, l'huile de palme décolorée, l'environnement et l'eau utilisée étaient les sources de contamination de l'*attiéké*.

**Tableau 31** : Présence du groupe *Bacillus cereus* dans les intrants, les produits intermédiaires, l'environnement et l'eau d'utilisation

Nature du produit		Pourcentage d'échantillons contaminés (%)	
		Formes végétatives	Spores
Intrants	Huile de palme décolorée	37,5	37,5
	Pulpe de Manioc	100	25
	Ferment	100	31,2
Produits intermédiaires	Pâte de manioc Broyée	100	50
	Pâte Fermentée	100	68,8
	Pâte de manioc pressée	100	81,2
	PMFPS	100	81,2
Autres	Environnement	75	62,5
	Eau d'utilisation	75	62,5

PMFPS : Pâte de manioc fermentée pressée séchée

#### 4.1.2.2. Présence du groupe *Bacillus cereus* dans l'*attiéké*

L'*attiéké* fraîchement préparé contenait essentiellement des spores (71,4 %) de *B. cereus*. Seulement, 28,6 % d'échantillons d'*attiéké* analysés ne contenaient des cellules végétatives (**tableau 32**).

Au cours de la vente, le pourcentage d'échantillons d'*attiéké* qui contenaient des cellules végétatives avait augmenté de 72,7 à 86,4 % respectivement pour l'*attiéké* de 1-2 jours et de 3-5 jours de vente. Cependant le pourcentage d'échantillons d'*attiéké* qui contenaient uniquement des spores avait diminué de 27,3 à 13,6 % respectivement dans l'*attiéké* de 1-2 jours et de 3-5 jours de vente. Au total, 25,2 % d'échantillons d'*attiéké* en vente étaient contaminés par *B. cereus*.

Le nombre d'échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé contenant le groupe *B. cereus* était fortement corrélé à l'état sanitaire du site de production ( $p = 0,031 < 0,05$  ;  $V = 0,745$ ;  $ddl = 3$ ) d'une part et significativement lié à la durée de cuisson de l'*attiéké* selon le site de production au seuil de 5 % ( $p < 0,05$ ) d'autre part. À Avocatier où la durée de cuisson était la plus élevée, l'*attiéké* fraîchement préparé ne contenait pas *B. cereus*. Par contre, à Azito, Abobodoumé et Anoumambo où la durée de cuisson de l'*attiéké* était respectivement la moins élevée (respectivement 37,5 min, 33,3 min et 30,5 min), le nombre d'échantillons contenant *B. cereus* augmentait. La proportion d'échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé contenant le groupe *B. cereus* à Azito, Abobodoumé et Anoumambo est respectivement 25 %, 50 % et 100 % (**tableau 33**).

**Tableau 32** : Proportion d'*attiéké* contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

Produits	Pourcentage (%) d'échantillons d' <i>attiéké</i> contaminés		
	Formes végétatives	Spores uniquement	Total
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	28,6	71,4	43,8
<i>Attiéké</i> en vente	<b>80,5</b>	<b>19,5</b>	<b>25,2</b>
1 - 2 jours	72,7	27,3	20
3 - 5 jours	86,4	13,6	28,2

**Tableau 33** : Répartition de *Bacillus cereus* obtenu de l'*attiéké* fraîchement préparé en fonction du site de production et de la durée de cuisson

Sites de production de l' <i>attiéké</i>	Durée de cuisson* (min)	Pourcentage (%) d'échantillons d' <i>attiéké</i> contaminés** (n = 4)
Avocatier	40,5	0
Azito	37,5	25
Abobodoumé	33,3	50
Anoumambo	30,5	100
<b>Total (N = 16)</b>		<b>43,8</b>

n = nombre d'échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé analysés par site de production sélectionné

N = nombre total d'échantillons d'*attiéké* analysés

\*  $p = 0,031 < 0,05$  ;  $V = 0,745$ ;  $ddl = 3$

\*\* *Rho de Spearman* = - 1 ;  $p = 0,0001$  ;  $\alpha = 0,01$

#### 4.1.2.3. Charge moyenne en *Bacillus cereus* dans les intrants pour la production de l'*attiéké*, dans l'eau d'usage et de l'environnement

Le groupe *B. cereus* était apporté par les intrants que sont l'huile de palme décolorée, la pulpe de manioc et surtout par le ferment. Ils contiennent aussi bien des formes végétatives que des spores. Au niveau des intrants, les charges moyennes les plus élevées de cellules végétatives et de spores ont été retrouvées dans le ferment tandis que les charges les moins élevées ont été retrouvées dans l'huile de palme décolorée (**tableau 34**).

Les formes végétatives et des spores ont été aussi isolées dans l'environnement de production de l'*attiéké* et dans l'eau utilisée pour le lavage des cossettes de manioc (**tableau 34**).

#### 4.1.2.4. Charge moyenne en groupe *Bacillus cereus* dans les produits intermédiaires du processus de production de l'*attiéké*

Après le broyage, les charges moyennes en forme végétative et en spores du groupe *B. cereus* dans le broyat (huile de palme décolorée + manioc + ferment) étaient respectivement de  $4,0 \pm 0,6$  log (UFC/g) et de  $3,1 \pm 0,5$  log (UFC/g). Au cours de la fermentation, la charge en forme végétative augmentait pour atteindre des valeurs moyennes de  $4,6 \pm 0,7$  log (UFC/g) dans la pâte fermentée puis diminuait jusqu'à  $3,4 \pm 0,7$  log (UFC/g) dans la pâte de manioc fermentée pressée séchée (**tableau 34**). Par contre, le nombre de spores diminuait au cours de la fermentation pour atteindre des valeurs de  $2,7 \pm 0,7$  log (UFC/g) dans la pâte fermentée et augmentait au cours du pressage et du séchage pour atteindre une charge moyenne en spores de  $3,1 \pm 0,6$  log (UFC/g) à l'étape précédant la cuisson (PMFPS).

Les charges les plus élevées en cellules végétatives ont été mises en évidence dans la pâte fermentée tandis que les charges les plus élevées en spores ont été mises en évidence dans la pâte de manioc fermentée pressée séchée (PMFPS).

#### 4.1.2.5. Charge moyenne en groupe *Bacillus cereus* isolés de l'*attiéké*

Les charges moyennes en formes végétatives et en spores du groupe *B. cereus* dans l'*attiéké* fraîchement préparé étaient respectivement de  $2,5 \pm 0,4$  log (UFC/g) et de  $2,4 \pm 0,4$  log (UFC/g).

Dans l'*attiéké* en vente, la charge moyenne de forme végétative était de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) alors qu'elle était de  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g) en spores de *B. cereus*.

---

Au cours de la vente de l'*attiéké*, les charges en formes végétatives de *B. cereus* augmentaient de  $2,1 \pm 0,8$  log (UFC/g) à  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g), tandis que celles en spores diminuaient de  $2,2 \pm 0,9$  log (UFC/g) pour atteindre des valeurs de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) au cinquième jour de vente (**tableau 35**).

#### 4.1.2.6. Qualité microbiologique de l'*attiéké*

La qualité microbiologique de l'*attiéké* a été déterminée à partir de la charge moyenne en *B. cereus* de l'*attiéké* fraîchement préparé puis de l'*attiéké* en vente conformément aux normes ivoiriennes (**NI 484, 2013**) et européennes (**Communauté Européenne, 2007b ; Anonyme 2, 2011**). Ainsi, la majorité (56,3 %) des échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé était de qualité microbiologique satisfaisante tandis que 18,8 % étaient de qualité microbiologique acceptable et ne représente pas un risque pour le consommateur. Cependant, 25,0 % de ces échantillons étaient de qualité microbiologique insatisfaisante, avec un risque de toxi-infection relativement faible pour le consommateur car leurs charges en groupe *B. cereus* étaient supérieures à 2,7 log (UFC/g), mais en deçà de la dose infectieuse [5 log (UFC/g)] (**tableau 36**).

La qualité microbiologique de l'*attiéké* en vente se dégradait au cours de la vente. La proportion d'échantillons de qualité microbiologique satisfaisante était de 74,8 % dont 51,1 % pour l'*attiéké* en vente depuis 1 à 2 jours après production et 48,9 % pour l'*attiéké* en vente depuis 3 à 5 jours (**tableau 37**). Le nombre d'échantillons d'*attiéké* en vente de qualité microbiologique insatisfaisante, donc présentant un risque pour le consommateur, augmentait après 3 à 5 jours de vente. Les échantillons de qualité microbiologique insatisfaisante et présentant un risque élevé pour la santé humaine [charge > 5 log (UFC/g)] ont été retrouvés uniquement dans l'*attiéké* en vente depuis 3 à 5 jours après la production.

**Tableau 34 :** Charge moyenne en groupe *Bacillus cereus* dans les intrants, les produits intermédiaires, l'environnement et l'eau d'utilisation

Nature du Produit		Charge moyenne en <i>Bacillus cereus</i> en log (UFC/g)	
		Formes végétatives	Spores
Intrants	Huile de palme décolorée	3,0 ± 1,5	2,2 ± 1,2
	Pulpe de Manioc	4,4 ± 0,7	2,3 ± 0,4
	Ferment	5,1 ± 0,5	3,2 ± 0,6
Produits intermédiaires	Pâte de Manioc Broyée	4,0 ± 0,6	3,1 ± 0,5
	Pâte Fermentée	4,6 ± 0,7	2,7 ± 0,7
	Pâte Pressée	4,0 ± 0,6	2,8 ± 0,6
	PMFPS	3,4 ± 0,7	3,1 ± 0,6
Autres	Environnement	3,0 ± 0,3	2,5 ± 0,2
	Eau d'utilisation	2,7 ± 0,6	1,5 ± 0,4

PMFPS : Pâte de manioc fermentée pressée séchée

**Tableau 35 :** Charge moyenne en groupe *Bacillus cereus* dans l'attiéké

Produits	Charge moyenne en log (UFC/g)	
	Formes végétatives	Spores
<i>Attiéké</i> fraîchement préparé	2,5 ± 0,4	2,4 ± 0,4
<i>Attiéké en vente</i> sur le marché	2,4 ± 1,1	2,3 ± 1,1
1 - 2 jours de vente	2,1 ± 0,8	2,2 ± 0,9
3 - 5 jours de vente	2,3 ± 1,2	2,0 ± 1,3

**Tableau 36** : Qualité microbiologique de l'*attiéké* fraîchement préparé

Qualité microbiologique	Nombre d'échantillons	Pourcentage
	(n = 16)	(%)
Satisfaisante	9	56,3
Acceptable	3	18,8
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection	4	25,0
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection élevé	0	0,0

- Qualité microbiologique satisfaisante :  $N \leq 1,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique acceptable :  $1,7 \log$  (UFC/g)  $< N \leq 2,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque pour la santé humaine :  $2,7 \log$  (UFC/g)  $< N < 5 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque élevé pour la santé humaine :  $N \geq 5 \log$  (UFC/g).

**Tableau 37** : Qualité microbiologique de l'*attiéké* au cours de la vente

Qualité microbiologique	Nombre (%) d'échantillon d' <i>attiéké</i>		
	1-2 jours	3-5 jours	Total
Satisfaisante	117 (51,1)*	112 (48,9)	229 (74,8)
Acceptable	25 (43,9)	32 (56,1)	57 (18,6)
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection	8 (50)	8 (50)	16 (5,2)
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection élevé	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (1,3)

\* Les valeurs et les nombres entre parenthèses représentent respectivement le nombre et les pourcentages d'échantillons.

- Qualité microbiologique satisfaisante :  $N \leq 1,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique acceptable :  $1,7 \log$  (UFC/g)  $< N \leq 2,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque pour la santé humaine :  $2,7 \log$  (UFC/g)  $< N < 5 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque élevé pour la santé humaine :  $N \geq 5 \log$  (UFC/g).

## 4.2. Discussion

À la cuisson, il n'existe pas de différence significative entre les températures de cuisson de l'*attiéké*, prises à la surface, au cœur du couscoussier et celle de l'*attiéké* fraîchement préparé. Au cours de la production de l'*attiéké*, il se crée un gradient de température à l'intérieur du couscoussier. Ce gradient de température est dû à l'augmentation progressive de la température de la vapeur d'eau issue du chauffage de l'eau contenue dans la marmite. Il s'établit ensuite un équilibre qui entraîne la disparition du gradient de température (**Zarguili et al., 2006 ; Bahrani, 2012**). La température de la semoule d'*attiéké* préparé variait de 98 à 100°C avec une moyenne de  $99,6 \pm 0,6^\circ\text{C}$  et une durée de cuisson variant de 21 à 52 min avec une moyenne de  $35,4 \pm 8,5$  min. La durée de cuisson de l'*attiéké* n'est pas liée au site de production. Elle serait plutôt due aux variables telles que l'humidité et la quantité de la pâte de manioc fermentée pressée séchée (semoule pré-séchée) à cuire et du modèle d'âtre utilisé. La durée de cuisson de l'*attiéké* dans cette étude est plus élevée que celle recommandée par la norme ivoirienne NI 484 (**NI 484, 2013**) sur les spécifications de l'*attiéké*. Cette norme recommande une durée de cuisson de 10 à 30 min suivant l'humidité et la quantité de la pâte de manioc fermentée pressée séchée à faire cuire. Cette norme est admise lorsque la cuisson se fait dans un couscoussier en inox ou à défaut en aluminium, à l'aide d'une batterie de cuiseurs, munie d'un gaz butane comme combustible. Cette différence de la durée de cuisson est due au mode de cuisson de l'*attiéké* adopté par les productrices, au matériau de cuisson utilisé et à l'humidité de la pâte de manioc fermentée pressée séchée à faire cuire. En effet, le bois de chauffage utilisé ne permet pas de maintenir la température de cuisson stable. D'où une fluctuation de la durée de cuisson de l'*attiéké* d'une productrice à une autre pour relativement les mêmes quantités (5000 F.CFA) d'*attiéké* préparé.

La teneur en eau de l'*attiéké* fraîchement préparé relativement élevée est statiquement identique dans tous les sites d'études. La valeur moyenne de la teneur en eau de l'*attiéké* obtenue est de  $51,5 \pm 1,8$  %. Elle est plus élevée que celle rapportée par **Sotomey et al. (2001)**. Cette différence au niveau de la teneur en eau de l'*attiéké* est due certainement à l'humidité de la pâte de manioc fermentée pressée séchée à faire cuire et de la durée de cuisson. De plus, les sachets plastiques utilisés pour l'emballage d'*attiéké* en vente ne permettent pas de prévenir l'effet de la chaleur. Ainsi, l'*attiéké* se dessèche au cours de la vente.

Le pH moyen de l'*attiéké* fraîchement préparé est de  $5,2 \pm 0,2$  (IC 95 % [5,1 - 5,3]). Ces valeurs de pH de l'*attiéké* sont sensiblement égales au pH de l'*attiéké* au Bénin rapporté par **Sotomey et al. (2001)**. Cependant, **Coulin et al. (2006)** ont rapporté un pH moyen de  $4,4 \pm 0,1$  tandis que **Djéni et al. (2011)** et **Kouamé et al. (2012)** ont trouvé des pH variant respectivement

---

de 4,3 à 4,43 et de 3,9 à 4,3. Toutes ces valeurs de pH de l'*attiéké* rapportées par ces auteurs sont inférieures au pH trouvé dans cette étude. Les différences observées au niveau du pH de l'*attiéké* dans toutes ces études laissent présager l'application de pratiques particulières à chaque groupe ethnique et témoignent de la variation des pratiques et des modes de production d'un lieu à un autre, entraînant l'obtention de produits de qualité physico-chimiques et organoleptiques variées (Djéni *et al.*, 2011). Cette variation est donc la conséquence de la technologie de production de l'*attiéké*, hérité de la tradition locale, qui repose encore sur le savoir-faire empirique des productrices (Mosso *et al.*, 1996 ; Djéni, 2009).

Le groupe *B. cereus* a été isolé dans le manioc frais, dans le ferment et à toutes les étapes de la chaîne de production de l'*attiéké*. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Amoa-Awua et Jakobsen (1996) sur le rôle des espèces de *Bacillus* spp. dans la fermentation du manioc. Les espèces de *Bacillus* spp. dont *B. cereus* jouent un rôle important dans la fermentation du manioc par la dégradation des composés cyanogènes permettant le ramollissement de la pâte de manioc (Amoa-Awua et Jakobsen, 1996 ; Djoulde, 2004). Elles produisent une amylase qui leur permet de se développer dans les produits amylicés (Sivakumar *et al.*, 2012). Elles sont apportées en majorité par le ferment et leur présence à toutes les étapes de la production de l'*attiéké* est par conséquent inévitable. La charge en groupe *B. cereus* est considérable dans la pâte fermentée. Cette population diminue considérablement dans la pâte de manioc fermentée pressée séchée suite au pressage et au séchage.

Les résultats de l'analyse microbiologique de l'*attiéké* fraîchement préparé ont montré la présence dans 43,8 % des échantillons, de cellules végétatives (28,6 %) et de spores (71,4 %) du groupe *B. cereus*. Un tel constat traduit que le couple temps/température de cuisson d'une part, et le mode de cuisson adopté par les productrices, par l'utilisation de bois de chauffage d'autre part, sont insuffisants pour détruire toutes les formes végétatives et les spores du groupe *B. cereus* déjà présentes dans la pâte fermentée pressée séchée à de forte concentration. Plusieurs études ont aussi rapportées la présence des cellules végétatives et des spores du groupe *B. cereus* dans une large variété de produits alimentaires (Valero *et al.*, 2002 ; Rosenquist *et al.*, 2005 ; Fangio *et al.*, 2010). La présence du groupe *B. cereus* s'explique aussi par la contamination de l'*attiéké* après la cuisson par l'environnement de production, les instruments, la manipulation du produit et le contact du produit avec l'air ambiant. En effet, l'eau stockée dans les récipients des productrices et utilisée durant la production de l'*attiéké* et l'environnement de production sont fortement contaminés par le groupe *B. cereus* sur 75 % des sites. La capacité d'adhésion aux surfaces solides et de résistance des spores du groupe *B. cereus* leur permet de persister dans l'environnement agroalimentaire, de contaminer la matière première (Dromigny, 2008) et de

---

survivent aux opérations de cuisson. Au cours de la vente, le pourcentage d'échantillons d'*attiéké* qui contiennent des cellules végétatives augmente tandis que le pourcentage d'échantillons d'*attiéké* qui contiennent des spores diminue après 1 à 2 jours et 3 à 5 jours de vente. Ce résultat révèle qu'au cours de la vente de l'*attiéké* à la température ambiante, il y a germination des spores sous l'effet de la chaleur car la température de stockage et des lieux de vente qui se situe entre 25 et 30 °C correspond à la température optimale de développement du groupe *B. cereus* (Guinebretiere *et al.*, 2008).

Le niveau de contamination de l'*attiéké* fraîchement préparé est significativement lié à l'état sanitaire du site de production ( $p > 0,05$ ). Ainsi, l'*attiéké* provenant des sites d'Anoumambo et d'Abobodoumé qui ne disposaient pas d'un espace aménagé pour la production de l'*attiéké* et qui présentaient un état d'insalubrité importante, ont été plus contaminés que l'*attiéké* provenant des sites d'Azito et d'Avocatier. En revanche, aucun échantillon d'*attiéké* fraîchement préparé et provenant du site d'Avocatier, n'a été contaminé. De plus, sur ce site d'Avocatier, la semoule de racine de manioc était séchée sur des claies en hauteur ; ce qui évite sa contamination par la poussière, réservoir de spores de *B. cereus*. Ces résultats confirment ceux rapportés par Djéni *et al.* (2014) et démontrent que les mauvaises pratiques dans les unités de production et l'hygiène précaire sont la cause de la contamination de l'*attiéké* sur les sites de production.

L'*attiéké* était vendu sur les marchés généralement conditionné dans des sachets plastiques non alimentaires, dont la qualité n'est pas garantie. C'est une pratique qui peut avoir pour conséquence de favoriser la contamination de l'*attiéké* au cours de la vente. Il a été rapporté que les emballages, l'air et l'eau sont considérés comme d'éventuelles sources de contamination et de ré-contamination par le groupe *B. cereus* après pasteurisation (Eneroth *et al.*, 1998; Pirttijarvi *et al.*, 2000).

La qualité microbiologique de l'*attiéké* se détériore au cours du temps passé à la vente. En effet, selon les résultats obtenus, après 3 jours de vente, 28,2 % de l'*attiéké* a été contaminé par le groupe *B. cereus* avec une charge moyenne de  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g) de formes végétatives et de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) de spores. La contamination de l'*attiéké* par cette espèce était prévisible, car le groupe *B. cereus* est ubiquitaire du sol, de l'environnement et par conséquent, présent le plus souvent dans la majorité des produits alimentaires. De plus, la multiplication des souches dans l'*attiéké* peut être favorisée par sa teneur en eau (45 - 60 %), sa teneur en amidon (42,3 - 71,6 %) (Sotomey *et al.*, 2001 ; Djéni *et al.*, 2011) et la température (25 – 30 °C) de stockage et des lieux de vente. Cette température correspond à la température optimale de développement du groupe *B. cereus* (Guinebretiere *et al.*, 2008). Par ailleurs,

---

l'augmentation de charge en *B. cereus* au cours de la vente peut également s'expliquer par le fait qu'après au moins une journée d'activité, l'*attiéké* proposé sur le marché est généralement régénéré par un réchauffage dont les paramètres ne sont pas toujours maîtrisés par les vendeurs. Dans ce cas, le réchauffage constitue un facteur activant la germination des spores résiduelles dans le produit. Il en résulte une multiplication des espèces bactériennes et par conséquent, une augmentation de charges en *B. cereus* de l'*attiéké* au cours de la commercialisation. Cette situation est amplifiée par les mauvaises conditions de transport de l'*attiéké* telles que l'utilisation des paniers de fortune en raphia et des sachets plastiques non alimentaires.

Cependant, les résultats obtenus dans cette étude, en termes de niveau (ou degré) de contamination, contrastent avec ceux de **Kouamé et al. (2012)**. En effet, ces auteurs étudiant la microflore post-cuisson de l'*attiéké* commercial produit au sud de la Côte d'Ivoire, ont relevé un nombre plus élevé de spores de *B. cereus*, atteignant  $4,5 \pm 2 \log$  (UFC/g) d'*attiéké*. Cette discordance de résultats au niveau des charges en *B. cereus* avait été précédemment observée par **Ziane et al. (2014)**, qui a indiqué que la concentration des souches dans la matrice alimentaire et leur diversité, varient le plus souvent d'un produit à un autre.

Dans le cadre de cette étude et conformément aux normes (**Communauté Européenne, 2007b; Anonyme 2, 2011 ; NI 484, 2013**), la majorité (74,8 %) des échantillons d'*attiéké* en vente sur les marchés sont de qualité microbiologique satisfaisante. Dans leur étude sur la prévalence et la concentration de *B. cereus* dans les produits alimentaires prêts à consommer et vendus au détail en Australie, **Eglezos et al. (2010)** ont montré que 98 % des échantillons testés étaient de qualité microbiologique satisfaisante. Ces résultats suggèrent que le groupe *B. cereus* est rarement responsable de l'insécurité sanitaire des produits alimentaires prêts à l'emploi.

Les résultats obtenus montrent cependant que le quart des échantillons d'*attiéké* analysé, présentait des charges en *B. cereus* dépassant les limites acceptables, avec un risque élevé pour la santé humaine des consommateurs pour seulement 1,3 % de ces échantillons. En effet, selon **Communauté Européenne (2007b) et Anonyme 2 (2011)**, le risque sanitaire est modéré pour le consommateur pour des charges en *B. cereus* n'excédant pas le seuil de 5 log (UFC/g) d'aliment et devient élevé au-delà de cette valeur. Cependant, des épidémies associées à des aliments contenant des charges en *B. cereus* de 3 log (UFC/g) ont été signalées (**EFSA, 2005 ; Arnesen et al., 2008**). Par conséquent, les faibles concentrations en groupe *B. cereus* de l'*attiéké* ne traduisent pas nécessairement un risque réduit pour le consommateur. Le caractère épidémiogène du groupe *B. cereus* à faible dose peut être lié au mécanisme de virulence s'exprimant entre autre, par l'excrétion d'une toxine thermolabile et préformée dans l'aliment (**EFSA, 2005 ; Arnesen et al., 2008**). En effet, après plusieurs jours de vente, l'*attiéké* est

généralement réchauffé pour être à nouveau vendu. La toxine peut être sécrétée dans l'aliment avant sa consommation. Ainsi, en raison de la grande stabilité de la toxine émétique, les bactéries du groupe *B. cereus* pourraient être tuées par le réchauffage de l'*attiéké* avant consommation, alors que la toxine émétique est toujours intacte. Il est donc probable que les échantillons d'*attiéké* examinés posent un problème de santé publique même si des cas avérés n'ont pas été constatés dans cette étude.

La qualité microbiologique de l'*attiéké* se détériore profondément au cours de la vente. Ainsi, après 3 jours de vente, 28,2 % de l'*attiéké* sont contaminés par le groupe *B. cereus* avec une charge moyenne de  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g) de formes végétatives et de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) de spores. Ces résultats contrastent avec le nombre élevé des spores de *B. cereus* trouvées dans les échantillons d'*attiéké* analysés par **Kouamé et al. (2012)** dans son étude sur la microflore post-cuisson de l'*attiéké* commercial produit au sud de la Côte d'Ivoire. Des charges très élevées d'environ  $4,5 \pm 2$  log (UFC/g) d'*attiéké* ont été rapportées.

### **Conclusion partielle**

L'*attiéké* fraîchement préparé est contaminé par les cellules végétatives et les spores du groupe *B. cereus* à des niveaux dépassant les limites acceptables. La qualité microbiologique de l'*attiéké* se détériore profondément au cours de la vente. L'*attiéké* peut représenter un risque de toxi-infection pour le consommateur.

Cependant, comme l'*attiéké* joue un rôle important dans la nutrition de nombreuses populations en Côte d'Ivoire, en Afrique et en Europe et procure des économies pour les acteurs de la filière manioc, des mesures doivent être prises pour améliorer sa qualité afin de préserver les consommateurs et ces bénéfiques.

## 5. DIVERSITÉ GÉNÉTIQUE, PROFILS TOXIGÉNIQUES ET ANTIBIOTYPIQUES DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* ISOLÉ DU LAIT ET DE L'ATTIÉKÉ

### 5.1. Résultats

#### 5.1.1. Espèces du groupe *Bacillus cereus* identifiées par PCR

La répartition des isolats identifiés selon la filière est présentée dans le **tableau 38**. Parmi les 184 isolats présomptifs du groupe *B. cereus*, 172 (93,5 %) ont été confirmés positifs par amplification par PCR d'un fragment de 575 pb du gène flagellaire *motB* (**figure 14**). Des 172 isolats positifs, 41,9 % de *B. thuringiensis* ont été identifiés par amplification d'un fragment de 299 pb et 36,0 % de *B. cereus* par amplification d'un fragment de 475 pb (**figure 15**). Un total de 22,1 % des isolats n'a pas été formellement identifié. Ces isolats provenaient du lait.

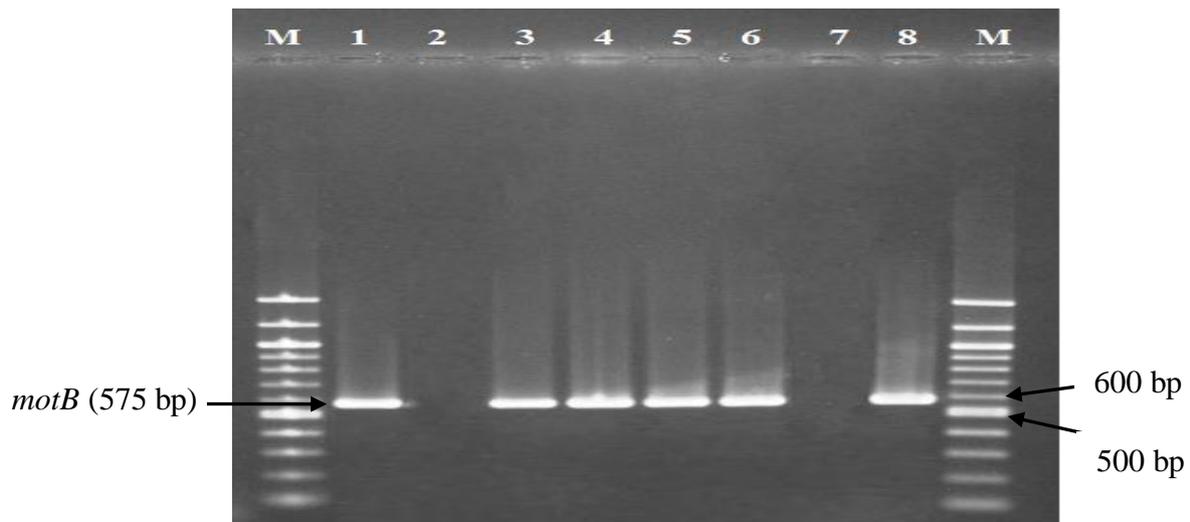
De plus, 93,6 % (88) des 94 isolats présomptifs provenant du lait ont été confirmés du groupe *B. cereus*. En outre, 56,8 % des isolats ont été formellement identifiés dont 28,4 % de *B. cereus sensu stricto* et également 28,4 % de *B. thuringiensis*.

Concernant les isolats provenant de l'*attiéké*, 93,3 % (84) des 90 isolats présomptifs ont été confirmés du groupe *B. cereus*. Tous les isolats de l'*attiéké* ont été identifiés dont 56 % de *B. thuringiensis* et 44 % de *B. cereus sensu stricto* (**tableau 38**).

**Tableau 38** : Répartition des isolats identifiés selon la filière

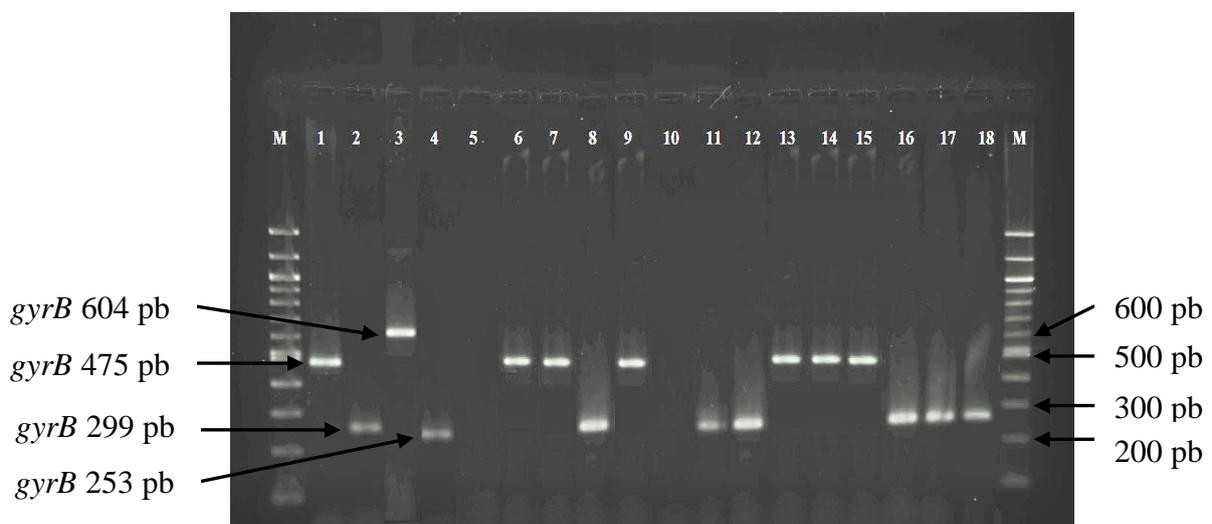
Origine des isolats	Nombre d'isolats présomptifs	Nombre d'isolats confirmés du groupe <i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus cereus sensu stricto</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus spp</i>
Filière laitière	94	88 (93,6)*	25 (28,4)	25 (28,4)	38 (43,2)
Filière <i>attiéké</i>	90	84 (93,3)	37 (44,0)	47 (56,0)	0 (0,0)
<b>Total</b>	<b>184</b>	<b>172 (93,5)</b>	<b>62 (36,0)</b>	<b>72 (41,9)</b>	<b>38 (22,1)</b>

\* Les valeurs et les nombres entre parenthèses représentent respectivement le nombre et les pourcentages d'isolats



**Figure 14 :** Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification du gène *motB* du groupe *Bacillus cereus* isolés du lait et de l'*attiéké*

M : Marqueur de masse moléculaire (100 pb DNA Ladder, Biolabs) ; Piste 1 : *Bacillus thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup> ; piste 3 : *Bacillus cereus* DSM 4312 ; piste 2 : témoin négatif ; piste 4 à 5 : isolats analysés provenant du lait ; piste 6 à 8 : isolats analysés provenant de l'*attiéké*.



**Figure 15 :** Profil électrophorétique sur gel d'agarose 2,5 %, des produits d'amplification du gène *gyrB* des espèces du groupe *Bacillus cereus* isolés du lait et de l'*attiéké*

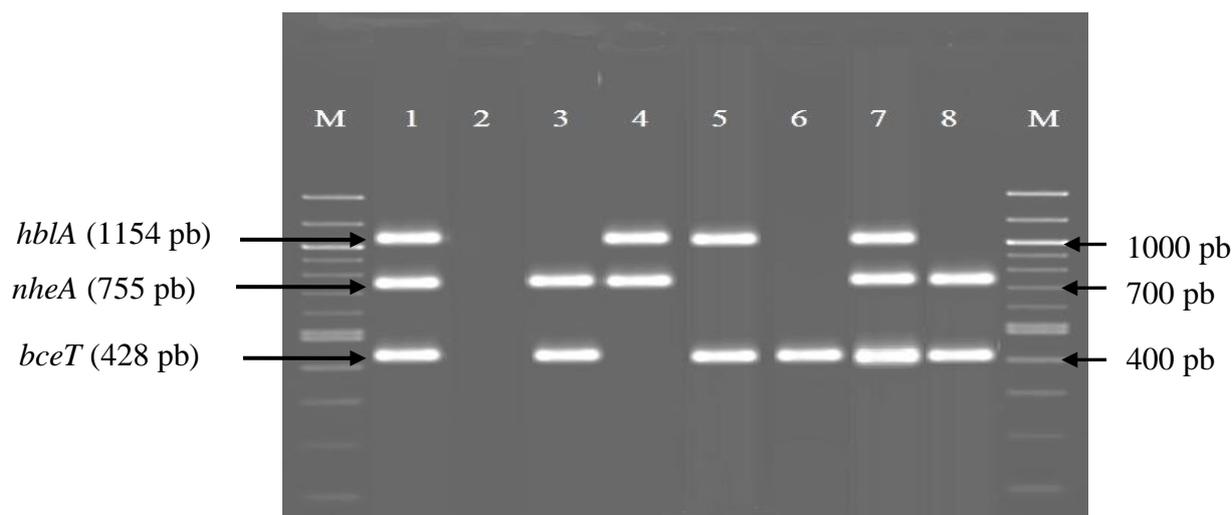
M : Marqueur de masse moléculaire (100 pb DNA Ladder, Biolabs) ; Piste 1 : *Bacillus cereus* DSM 4312 ; Piste 2 : *Bacillus thuringiensis* DSM 2046<sup>T</sup> ; Piste 3 : *Bacillus mycoides* ATCC 6462 ; Piste 4 : *Bacillus anthracis* ATCC 14578 ; Piste 5 : témoin négatif ; Piste 6 à 12 : isolats analysés provenant du lait ; Piste 13 à 18 : isolats analysés provenant de l'*attiéké*.

### 5.1.2. Virulence du groupe *Bacillus cereus* isolé du lait et de l'*attiéké*

Les **figures 16** et **17** montrent des exemples de profils électrophorétiques des gènes de virulence recherchés. Tous les isolats provenant du lait et de l'*attiéké* étaient susceptibles de produire respectivement au moins un ou deux des entérotoxines responsables de l'étiologie du syndrome diarrhéique. Les isolats provenant du lait n'étaient pas susceptibles de produire la toxine émétique (ces), par contre, un seul isolat provenant de l'*attiéké* et identifié *B. thuringiensis* était susceptible de la produire (**tableau 39**). La PCR discriminatoire entre les deux variantes du gène *cytK*, responsable de la production de la cytotoxine K, que sont *cytK-1* et *cytK-2* a révélé qu'aucun isolat provenant du lait et de l'*attiéké* n'était susceptible de produire la cytotoxine K-1 (gène *cytK-1*). Cependant, 89,8 % et 76,2 % des isolats provenant respectivement du lait et de l'*attiéké* étaient susceptibles de produire la cytotoxine K-2 (gène *cytK-2*). De plus, 45,9 % des isolats dont 38,6 % et 53,6 % provenaient respectivement du lait et de l'*attiéké* étaient susceptibles de produire l'entérotoxine T (gène *bceT*).

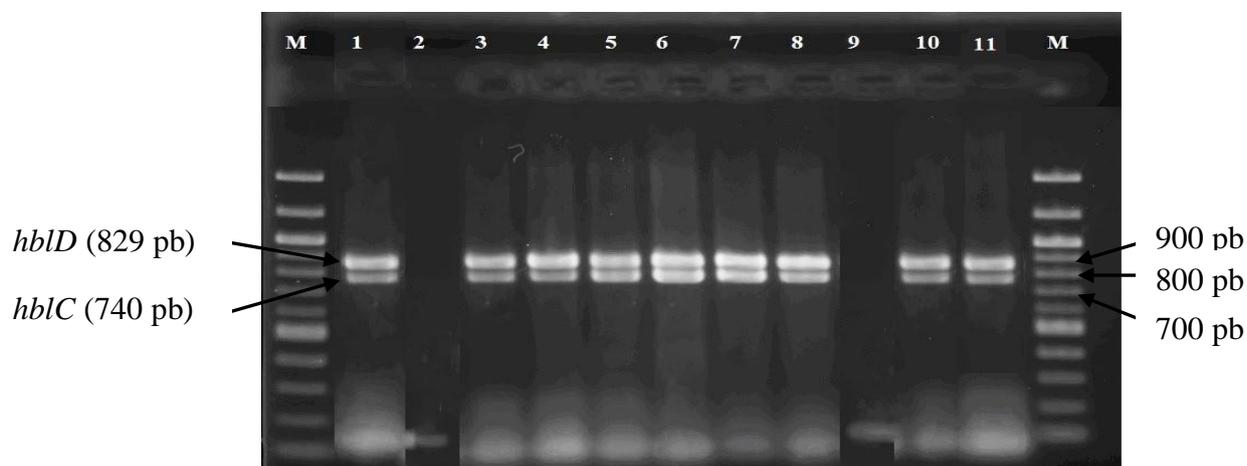
Au moins un des trois gènes de chacun des complexes NHE et HBL a été mis en évidence respectivement chez 95,9 % et 75,0 % des 172 isolats. Les gènes mis en évidence chez les isolats du lait étaient par ordre décroissant *hblD* (89,8 %), *hblC* (68,2 %) et *hblA* (13,6 %) contre *nheC* (73,9 %), *nheA* (36,4 %) et *nheB* (25,0 %) respectivement pour les complexes HBL et NHE (**tableau 39**).

Concernant les isolats provenant de l'*attiéké*, l'ordre décroissant des gènes du complexes HBL était *hblC* (54,8 %), *hblD* (53,6 %) et *hblA* (19,0 %) contre *nheA* (86,9 %), *nheC* (67,9 %) et *nheB* (53,6 %) pour le complexe NHE.



**Figure 16 :** Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification par PCR multiplex des gènes de virulence *hblA*, *nheA*, *bceT* du groupe *Bacillus cereus* isolés du lait et de l'*attiéké*

M : Marqueur de masse moléculaire (100 pb DNA Ladder, Biolabs) ; Piste 1 : *Bacillus cereus* DSM 31<sup>T</sup> ; piste 2 : témoin négatif ; piste 3 à 5 : isolats analysés provenant du lait ; piste 6 à 8 : isolats analysés provenant de l'*attiéké*.



**Figure 17 :** Profil électrophorétique sur gel d'agarose 1,5 %, des produits d'amplification par PCR multiplex des gènes de virulence *hblC* et *hblD* du groupe *Bacillus cereus* isolés du lait et de l'*attiéké*

M : Marqueur de masse moléculaire (100 pb DNA Ladder, Biolabs) ; Piste 1 : *Bacillus cereus* DSM 31<sup>T</sup> ; piste 2 : témoin négatif ; piste 3 à 5 : isolats analysés provenant du lait ; piste 6 à 8 : isolats analysés provenant de l'*attiéké*.

**Tableau 39** : Distribution des gènes d'entérotoxines du groupe *Bacillus cereus* isolés

Gènes de virulence		Nombre et pourcentage (%) d'isolats entérotoxigéniques et émétiques		
		Lait (n = 88)	Attiéké (n = 84)	Total (n = 172)
Complexe HBL	<i>hblA</i>	12 (13,6)*	16 (19,0)	28 (16,3)
	<i>hblC</i>	60 (68,2)	46 (54,8)	106 (61,6)
	<i>hblD</i>	79 (89,8)	45 (53,6)	124 (72,1)
Complexe NHE	<i>nheA</i>	32 (36,4)	73 (86,9)	105 (61,0)
	<i>nheB</i>	22 (25,0)	45 (53,6)	67 (39,0)
	<i>nheC</i>	65 (73,9)	57 (67,9)	122 (70,9)
Entérotoxine T	<i>bceT</i>	34 (38,6)	45 (53,6)	79 (45,9)
Entérotoxine K	<i>cytK-2</i>	79 (89,8)	60 (76,2)	139 (80,8)
	<i>cytK-1</i>	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Toxine émétique	<i>ces</i>	0 (0,0)	1 (1,2)	1 (0,6)

\* Les valeurs et les nombres entre parenthèses représentent respectivement le nombre et les pourcentages d'isolats.

### 5.1.3. Profils toxigéniques du groupe *Bacillus cereus* isolées du lait et de l'*attiéké*

La distribution des gènes de virulence a permis de regrouper les 172 isolats du groupe *B. cereus* provenant du lait et de l'*attiéké* en 62 profils toxigéniques (**tableau 40, 41 et 42**). Parmi ces profils 48,4 % et 35,5 % sont spécifiques aux isolats obtenus respectivement du lait et de l'*attiéké*. Par ailleurs, 16,1 % ont été communs aux isolats obtenus des deux matrices (**tableau 42**).

Les profils se sont répartis en un profil cytotoxique (t1), un profil entéro-cytotoxique (t2) un profil entéro-émétique (t3), deux profils entéro-hémolytiques (t4 et t5), 17 profils entéro non-hémolytiques (t6 à t22) et 40 profils entéro-hémolytiques et entéro non-hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* (t23 à t62).

#### 5.1.3.1. Profil cytotoxique

Le profil cytotoxique était constitué d'un seul isolat de *B. cereus* spp. possédant uniquement le gène *cytK-2*, responsable de la production de la deuxième variante de la cytotoxine K. Cet isolat provenant du lait était représenté par le profil t1 (**tableau 40**).

#### 5.1.3.2. Profil entéro-cytotoxique

Le profil entéro-cytotoxique était constitué d'un seul isolat de *B. thuringiensis* obtenu du lait et possédant le gène *cytK-2* et le gène *bceT*. Il correspond au profil t2 (**tableau 40**).

#### 5.1.3.3. Profil entéro-émétique

Le profil entéro-émétique (profil t3) était constitué d'un seul isolat de *B. thuringiensis* obtenu de l'*attiéké* hébergeant le gène *ces*, responsable de la production de la toxine émétique et deux gènes de complexe NHE (*nheA* et *nheC*) intervenant dans la production de l'entérotoxine non-hémolytique (**tableau 41**).

#### 5.1.3.4. Profils entéro-hémolytiques

À l'analyse des composantes de l'opéron HBL, aucun isolat n'a possédé uniquement un, deux ou les trois gènes du complexe HBL. Par contre, quatre (2,3 %) isolats dont un *B. cereus* et 3 *Bacillus thuringiensis* ont possédé deux gènes du complexe HBL (*hblC* et *hblD*) associés au gène de l'entérotoxine K (*cytK-2*). Ces isolats ont formé un seul profil toxigénique (t5). En outre, un seul (0,6 %) isolat de *B. cereus* spp. a possédé un seul gène du complexe HBL (*hblD*) associé au gène de l'entérotoxine K (*cytK-2*) formant le profil toxigénique t4. Les deux isolats appartenant aux deux profils entéro-toxigéniques (t4, t5) ont été obtenus du lait (**tableau 40**).

### 5.1.3.5. Profils entéro-non hémolytiques

- Gènes de l'entérotoxine non hémolytique (NHE) non associés aux gènes *bceT*, *cytK-2* et au complexe HBL

À l'analyse des composants du complexe NHE, 10 (5,8 %) isolats dont un a été obtenu du lait et neuf de l'*attiéké*, ont formé quatre profils toxigéniques (t6, t7, t8 et t11). Ces profils ont été dépourvus des gènes du complexe HBL (*hblA*, *hblC* et *hblD*) et des gènes *bceT* et *cytK-2*. Aucun isolat provenant du lait n'a possédé les gènes du complexe NHE sans qu'ils ne soient associés aux gènes du complexe entérotoxique HBL. Par contre, deux (1,2 %) isolats de *B. thuringiensis* (**tableau 41**) obtenus de l'*attiéké* a hébergé simultanément les trois composantes du complexe NHE sans les autres gènes recherchés. Ils se sont répartis en un seul profil toxigénique (t11). Par ailleurs, sept (4,1 %) isolats de *B. thuringiensis* obtenus de l'*attiéké* (t7 et t8) ont possédé deux gènes (*nheAB* ou *nheAC*) du complexe NHE, par contre un seul isolat (t6) obtenu du lait a hébergé seulement un seul gène (*nheA*) du complexe NHE.

- Gènes de l'entérotoxine non hémolytique (NHE) associés aux gènes *bceT*, *cytK-2* sans le complexe HBL

À l'analyse des profils toxigéniques, 30 (17,4 %) isolats ont possédé les gènes du complexe NHE associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2* sans le complexe HBL. Ils ont été regroupés en 13 profils toxigéniques (t9, t10 et t12 à t22). Deux profils (t18, t19), composés de 10 isolats de *B. thuringiensis* isolés de l'*attiéké*, ont possédé les trois gènes du complexes NHE. Huit profils (t12, t20, t13, t14, t21, t15, t16 et t22) ont possédé deux gènes du complexe NHE et se sont composés de 15 isolats de *B. thuringiensis* et un de *B. cereus* isolés de l'*attiéké*, deux de *B. thuringiensis* et deux de *B. cereus* spp. obtenus du lait. Aussi, trois profils (t9, t10 et t17), composés de quatre isolats de *B. thuringiensis* dont trois ont été obtenus de l'*attiéké*, ont possédé un seul (*nheB* ou *nheC*) des trois gènes du complexe NHE.

### 5.1.3.6. Profils entéro-hémolytiques et entéro-non hémolytiques associés ou non aux gènes *bceT* et *cytK-2*

À l'analyse des profils électrophorétiques, les 124 (72,1 %) isolats possédant simultanément au moins un des gènes du complexe HBL, du complexe NHE, des gènes *bceT* et *cytK-2* ont formé 40 profils toxigéniques. Parmi ces profils, 23 profils sont constitués par les isolats obtenus du lait (t23 à t28 ; t30 à t34 ; t36 ; t38 à t41 ; t44 à t45 ; t48 à t50 ; t55 à t56), huit de l'*attiéké* (t35, t42, t43, t51, t52, t57, t60, t61) et neuf profils sont spécifiques aux isolats obtenus des deux matrices alimentaires (t29, t37, t46, t47, t53, t54, t58, t59, t62).

- Trois gènes de l'entérotoxine non hémolytique associés aux trois gènes du complexe HBL, à l'entérotoxine T (*bceT*) et à la cytotoxine K (*cytK-2*)

La distribution des gènes de virulence a montré que six (3,5 %) isolats ont possédé simultanément les trois gènes du complexe HBL et ceux du complexe NHE. Ils se sont répartis en 3 profils toxigéniques (t51, t60 et t62) auxquels il a manqué soit le gène de l'entérotoxine T et la cytotoxine T (t51), soit uniquement le gène de l'entérotoxine T (t60), soit qui ont possédé les deux gènes (t62). La majorité (5/6) des isolats a été obtenue de l'*attiéké* et a regroupé un isolat de *B. cereus* et 4 de *B. thuringiensis*. Ces isolats sont susceptibles de produire simultanément une hémolysine et une non-hémolysine fonctionnelle. En somme, deux (1,2 %) isolats de *B. cereus* ont hébergé huit des neuf gènes recherchés (t62) alors que deux (1,2 %) *B. thuringiensis* en ont hébergé sept (t60).

- Trois gènes de l'entérotoxine non hémolytique associées à deux gènes du complexe HBL et à la cytotoxine K (*cytK-2*)

Un seul (0,6 %) isolat de *B. thuringiensis* obtenu du lait a possédé les 3 gènes responsables de la production de l'entérotoxine NHE et deux gènes de l'entérotoxine non hémolytique NHE (profil t56, **tableau 36 suite**).

- Un à deux gènes de l'entérotoxine non hémolytique associés ou non aux gènes du complexe HBL et aux gènes *bceT* et *cytK-2*

Un nombre de 68 isolats (39,5 %) a possédé deux (*nheAB*, *nheAC* et *nheBC*) des trois composantes du complexe NHE associés ou non aux gènes du complexe HBL et aux gènes *bceT* et *cytK-2*. Ces isolats se sont répartis en 23 profils toxigéniques et ont concerné 31 isolats obtenus du lait contre 37 isolats de l'*attiéké*. Il s'est agi de 41 isolats de *B. cereus*, de 16 de *B. thuringiensis* et de 11 de *B. cereus* spp. Ce sont les profils t25, t32, t33, t35, t36, t38, t40, t41, t39, t42, t43, t45, t48, t49, t50, t52, t53, t54, t55, t57, t58, t59 et t61.

Cependant, 13 profils toxigéniques sont constitués d'un seul gène du complexe NHE associé ou non aux gènes du complexe HBL et aux gènes *bceT* et *cytK-2*. Il s'est agi des profils t23, t24, t26, t27, t28, t29, t30, t31, t34, t37, t44, t46 et t47. Ces profils sont constitués de 49 (28,5 %) isolats dont 43 étaient issus du lait contre 6 de l'*attiéké*. Ces profils ont concerné 19 isolats de *B. cereus*, 8 de *B. thuringiensis* et 22 de *B. cereus* spp.

#### 5.1.4. Diversités toxigéniques du groupe *Bacillus cereus*

À l'analyse des 30 profils toxigéniques spécifiques aux 60 isolats isolés du lait, 38 souches différentes du groupe *B. cereus* se sont réparties en 8 souches de *B. cereus*, 12 souches de *B. thuringiensis* et 18 souches de *B. cereus* spp.

Les 22 profils toxigéniques spécifiques aux 56 isolats obtenus de l'*attiéké* ont révélé la présence de 23 souches différentes dont 5 et 18 souches respectivement de *B. cereus* et de *B. thuringiensis*.

Les 56 isolats obtenus du lait et de l'*attiéké* répartis en 10 profils communs des 2 matrices alimentaires ont montré la présence de 19 souches différentes dont 6 souches de *B. cereus*, 7 souches de *B. thuringiensis* et 6 souches de *B. cereus* spp.

Au total, les 172 isolats étudiés et regroupés en 62 profils toxigéniques ont indiqué la présence de 80 souches toxigéniques différentes dont 19 souches de *B. cereus*, 37 souches de *B. thuringiensis* et 24 souches de *B. cereus* spp.

**Tableau 40** : Profils toxigéniques spécifiques aux isolats obtenus du lait

Profils toxigéniques	Entérotoxine HBL			Entérotoxine NHE			Entérotoxine T	Cytotoxine K		Toxine émétique	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> spp	Nombre d'isolats du lait
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>				
t1	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	1	0	0	1
t2	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	1	0	1	0
t4	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	1	0	0	1
t5	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	4	0	3	1
t6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	1	0	1	0
t16	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	2	0	1	1
t22	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	1	0	0	1
t23	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	1	0	0	1
t24	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	1	0	1	0
t25	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	2	0	2	0
t26	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	1	0	0	1
t27	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	4	3	0	1
t28	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	1	0	0	1
t30	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	2	1	0	1
t31	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	17	8	3	6
t32	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	1	0	0	1
t33	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	1	0	0	1

(-) : négative ; (+) : positif

t = profil toxigénique

Tableau 40 suite

Profils toxigéniques	Entérotoxine HBL			Entérotoxine NHE			Entérotoxine T	Cytotoxine K		Toxine émétique	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> spp	Nombre d'isolats du lait
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>				
	t34	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	3	1	
t36	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	1	1	0	0
t38	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	1	0	1	0
t39	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	2	0	2	0
t40	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	1	1	0	0
t41	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	1	0	0	1
t44	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	1	0	0	1
t45	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	3	1	2	0
t48	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	1	0	1	0
t49	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	1	0	0	1
t50	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	1	0	0	1
t55	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	1	1	0	0
t56	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	1	0	1	0
<b>Total</b>											<b>17</b>	<b>19</b>	<b>24</b>	<b>60</b>
(%)											<b>(9,9)</b>	<b>(11,0)</b>	<b>(14,0)</b>	<b>(34,9)</b>

(-) : négative ; (+) : positif

t = profil toxigénique

**Tableau 41** : Profils toxigéniques spécifiques aux isolats obtenus de l'*attiéké*

Profils toxigéniques	Entérotoxine HBL			Entérotoxine NHE			Entérotoxine T	Cytotoxine K		Toxine émétique	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Nombre d'isolats <i>attiéké</i>
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>			
t3	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	0	1	1
t7	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	0	5	5
t8	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	0	2	2
t9	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	0	1	1
t11	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	0	2	2
t12	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	0	2	2
t13	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	0	1	1
t14	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	1	6	7
t15	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	0	1	1
t17	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	0	1	1
t18	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	0	3	3
t19	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	0	7	7
t20	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	0	1	1
t21	-	-	-	+	-	+	+	-	+	-	0	1	1
t35	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	0	1	1
t42	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	1	0	1
t43	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	0	1	1
t51	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	0	2	2
t52	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	1	0	1
t57	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	8	0	8
t60	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	0	2	2
t61	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	5	0	5
<b>Total</b>											<b>16</b>	<b>40</b>	<b>56</b>
(%)											<b>(9,3)</b>	<b>(23,3)</b>	<b>(32,6)</b>

**Tableau 42** : Profils toxigéniques des isolats communs au lait et à l'attiéké

Profils toxigéniques	Entérotoxine HBL			Entérotoxine NHE			Entérotoxine T	Cytotoxine K		Toxine émétique	Groupe <i>Bacillus cereus</i>			Nombre d'isolats		
	<i>hblA</i>	<i>hblC</i>	<i>hblD</i>	<i>nheA</i>	<i>nheB</i>	<i>nheC</i>	<i>bceT</i>	<i>cytK-1</i>	<i>cytK-2</i>	<i>ces</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> spp	Lait	Attiéké	Total
t7	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	0	2	0	1	1	2
t24	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	1	1	3	4	1	5
t37	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	0	2	0	1	1	2
t46	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	2	1	2	2	3	5
t47	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	3	0	3	5	1	6
t53	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	0	3	0	1	2	3
t54	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	0	3	1	3	1	4
t58	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	20	0	4	9	15	24
t59	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	1	1	1	1	2	3
t62	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	2	0	0	1	1	2
<b>Total</b>											<b>29</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>28</b>	<b>28</b>	<b>56</b>
(%)											<b>(16,9)</b>	<b>(7,6)</b>	<b>(8,4)</b>	<b>(50,0)</b>	<b>(50,0)</b>	<b>(32,6)</b>

(-) : négative ; (+) : positif

t = profil toxigénique

### 5.1.5. Résistances aux antibiotiques du groupe *Bacillus cereus* isolées du lait et de l'*attiéké*

La résistance aux antibiotiques du groupe *Bacillus cereus* isolés du lait et de l'*attiéké* est présentée dans le **tableau 43**. Les isolats ont été résistants aux  $\beta$ -lactamines à savoir, l'ampicilline (100 %), la pénicilline (100 %), le céfépime (100 %) et l'imipenème (53,5 %). Le groupe *B. cereus* ont été également résistantes à la triméthoprim-sulfaméthoxazole (100 %), à la tétracycline (94,8 %), à la ciprofloxacine (94,8 %), au chloramphénicol (94,2 %), à l'érythromycine (66,3 %) et à la vancomycine (56,4 %).

Aucun isolat obtenu du lait n'a été résistant à la clindamycine alors que 33,3 % pour ceux obtenus de l'*attiéké*. La résistance des isolats à la clindamycine ( $p = 0,019 < 0,05$  ;  $V = 0,179$ ) et à la vancomycine ( $p = 0,001 < 0,05$  ;  $V = 0,451$ ) est significativement liée à la matrice alimentaire.

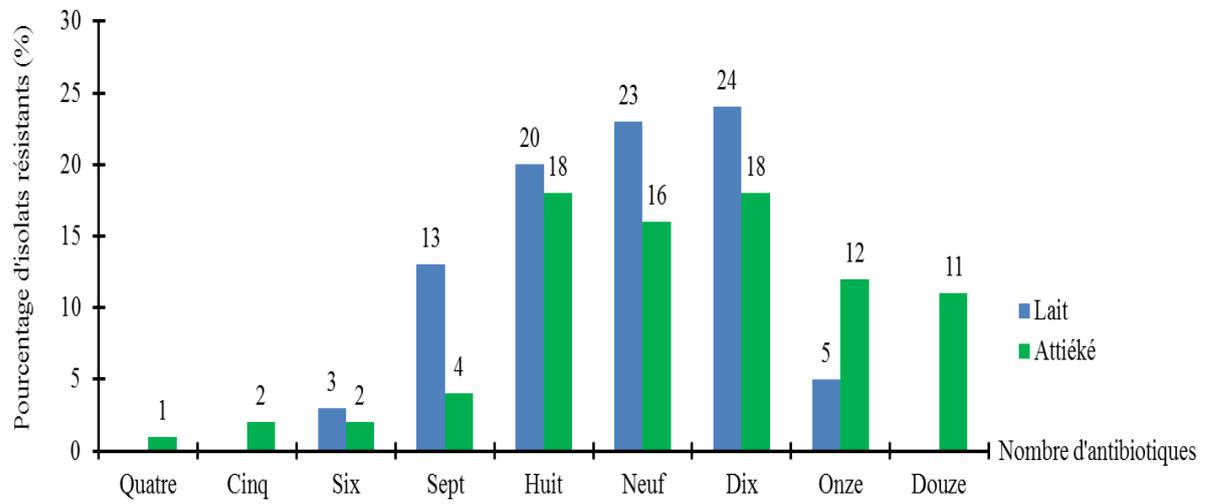
Les isolats étudiés ont été multirésistants. Ainsi, les isolats obtenus du lait ont résisté à entre six et onze antibiotiques tandis que ceux obtenus de l'*attiéké* ont résisté à entre quatre et douze antibiotiques. Les taux de résistance élevés ont été obtenus avec les isolats résistants à entre huit et dix antibiotiques. Les taux de résistance des isolats issus du lait ont été sensiblement supérieurs à ceux des isolats obtenus de l'*attiéké* (**figure 18**).

**Tableau 43** : Résistance aux antibiotiques du groupe *B. cereus* isolées dans le lait et dans l'*attiéké* vendu sur les marchés informels à Abidjan

Antibiotiques	Nombre et pourcentage (%) d'isolats résistants		
	Lait (n = 88)	<i>Attiéké</i> (n = 84)	Total (n = 172)
Triméthoprine-Sulfaméthoxazole (1.255 µg/23.75 µg)	88 (100,0) <sup>a</sup>	84 (100) <sup>a</sup>	172 (100,0)
Ampicilline (10 µg)*	88 (100,0) <sup>a</sup>	84 (100,0) <sup>a</sup>	172 (100,0)
Pénicilline (10 U)*	88 (100,0) <sup>a</sup>	84 (100,0) <sup>a</sup>	172 (100,0)
Céfépime (30 µg)*	88 (100,0) <sup>a</sup>	84 (100,0) <sup>a</sup>	172 (100,0)
Imipenème (10 µg)*	46 (52,3) <sup>b</sup>	46 (54,8) <sup>b</sup>	92 (53,5)
Ciprofloxacine (5 µg)	85 (96,6) <sup>a</sup>	78 (92,9) <sup>a</sup>	163 (94,8)
Tétracycline (30 µg)	84 (95,5) <sup>a</sup>	79 (94,0) <sup>a</sup>	163 (94,8)
Chloramphénicol (30 µg)	83 (94,3) <sup>c</sup>	79 (94,0) <sup>c</sup>	162 (94,2)
Érythromycine (15 µg)	56 (63,6) <sup>i</sup>	58 (69,0) <sup>i</sup>	114 (66,3)
Vancomycine (30 µg)	42 (47,7) <sup>f</sup>	55 (65,5) <sup>g</sup>	97 (56,4)
Gentamycine (10 µg)	23 (26,1) <sup>h</sup>	27 (32,1) <sup>h</sup>	50 (29,1)
Clindamycine (2 µg)	0 (0,0) <sup>d</sup>	28 (33,3) <sup>e</sup>	28 (16,3)

\* β-lactamines

Sur une ligne, les valeurs suivies de lettres alphabétiques différentes sont statistiquement différentes ( $p < 0,05$ ).



**Figure 18 :** Répartition des pourcentages de résistance des isolats obtenus du lait et de l'*attiéké* en fonction du nombre d'antibiotiques

### 5.1.6. Profils antibiotypiques du groupe *Bacillus cereus* isolées du lait et de l'attiéké

Les isolats du groupe *B. cereus* obtenus du lait et de l'attiéké ont été divisés en 42 profils antibiotypiques sur la base de leur sensibilité ou de leur résistance vis-à-vis des 12 antibiotiques testés. Les isolats obtenus du lait ont été regroupés en 28 profils antibiotypiques contre 27 profils pour les isolats obtenus de l'attiéké. Le recoupage des profils antibiotypiques avec les matrices alimentaires a révélé 15 profils spécifiques aux isolats obtenus du lait (**tableau 44**), 14 profils spécifiques aux isolats obtenus de l'attiéké (**tableau 45**) et 13 profils communs aux isolats obtenus des deux matrices (**tableau 46**).

#### 5.1.6.1. Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus du lait

À l'analyse de la fréquence des profils antibiotypiques, 30 isolats du groupe *B. cereus* obtenus du lait ont été regroupés en 15 profils spécifiques (**tableau 44**). Ils ont résisté entre six et neuf antibiotiques. Au total, 11 isolats de *B. cereus* ont été répartis en sept profils antibiotypiques tandis que neuf isolats de *Bacillus cereus* spp. et dix isolats de *Bacillus thuringiensis* ont formé huit profils. En tenant compte des profils antibiotypiques et des espèces, ces 30 isolats obtenus spécifiquement du lait ont été répartis en 23 souches différentes dont sept *B. cereus*, huit *B. cereus* spp. et huit *B. thuringiensis*. Le profil ayant le plus grand effectif a été le profil a30 avec quatre isolats résistants à neuf antibiotiques. Les isolats (3 isolats) les plus résistants ont été classés dans le profil a38 avec une résistance à 10 des 12 antibiotiques testés (**tableau 44**).

#### 5.1.6.2. Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus de l'attiéké

À l'analyse de l'antibiogramme des isolats étudiés, 14 profils ont été spécifiques aux isolats obtenus de l'attiéké (**tableau 45**). Ces profils sont constitués de 35 isolats dont 13 de *B. cereus* et 22 de *B. thuringiensis*. Les 13 isolats de *B. cereus* ont été répartis en 6 profils antibiotypiques contre 12 profils pour les 22 de *B. thuringiensis*. Au total, ces 35 isolats ont été répartis en 6 et 12 souches différentes respectivement de *B. cereus* et de *B. thuringiensis* obtenus spécifiquement de l'attiéké. Ces souches ont résisté à 4 voire 12 antibiotiques. Le profil majoritaire a été a42 avec 11 isolats et a représenté les souches les plus multirésistantes avec une résistance à tous les 12 antibiotiques testés. Les souches appartenant aux profils a34 et a35 d'une part et a39 et a40 d'autre part ont été résistantes respectivement à 10 et 11 antibiotiques (**tableau 45**).

### 5.1.6.3. Profils antibiotypiques communs aux isolats obtenus du lait et de l'attiéké

L'antibiogramme des isolats obtenus du lait et de l'attiéké a permis de déduire 13 profils antibiotypiques communs aux deux matrices (**tableau 46**). Ce groupe comprenait 107 isolats dont 58 ont été obtenus du lait et 49 de l'attiéké avec 38, 40 et 29 isolats respectivement de *B. cereus*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* spp. Les isolats provenant du lait ont résisté à 7 jusqu'à 11 antibiotiques et ont tous été sensibles à la clindamycine. Au total, 38 isolats de *B. cereus* ont formé 10 souches différentes contre 12 pour chacun des 40 de *B. thuringiensis* et 29 de *B. cereus* spp. Les souches appartenant aux profils antibiotypiques a36, a37 d'une part et a41 d'autre part ont été les plus résistantes avec une multirésistance à respectivement 10 et 11 antibiotiques (**tableau 46**).

À l'analyse des 42 profils antibiotypiques des 172 isolats du groupe *B. cereus* (**tableau 44, tableau 45, tableau 46**), 75 souches antibiotypiques différentes avec 23 de *B. cereus*, 32 de *B. thuringiensis* et 20 de *B. cereus* spp ont été révélées.

### 5.1.6.4. Diversités génétiques du groupe *Bacillus cereus* isolées du lait et de l'attiéké

La combinaison des profils toxigéniques et antibiotypiques a révélé 144 profils génétiques parmi lesquels 77 sont spécifiques aux isolats obtenus du lait (**tableau 47**), 66 sont spécifiques aux isolats obtenus de l'attiéké (**tableau 48**) et un seul profil est commun aux isolats obtenus des deux matrices (**tableau 49**). L'analyse de tous les profils indique la présence de 148 souches différentes dont 80 souches obtenues du lait (**tableau 47**), 66 souches de l'attiéké (**tableau 48**) et une seule souche constituée de deux isolats a été commune au lait et à l'attiéké (**tableau 49**). L'identification des souches a révélé 47, 66 et 35 souches respectivement *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* spp.

Les souches obtenues du lait (80 souches) ont été constituées de 20, 25 et 35 souches respectivement de *B. cereus sensu stricto*, *B. thuringiensis* et *B. cereus* spp. tandis que celles obtenues de l'attiéké ont été composées de 25 de *B. cereus sensu stricto* et de 41 de *B. thuringiensis*. La souche commune aux deux matrices a été une souche de *B. cereus sensu stricto*.

Au total, 140 profils sont constitués chacun d'une seule souche. Seulement, les quatre profils t29a32, t31a22, t31a30 et t58a15 sont constitués chacun de deux souches différentes relevant ainsi la diversité des souches du groupe *B. cereus* isolées du lait et de l'attiéké à Abidjan.

Le profil génétique t29a32 a été constitué d'une souche de *B. thuringiensis* isolée à Lièvre rouge à Yopougon alors que la souche de *B. cereus* spp a été isolée à Abobo N'dotré. Toutes les deux souches provenaient du lait. Elles sont susceptibles de produire deux composantes de l'entérotoxine hémolysine BL (HblCD), une composante de l'entérotoxine non-hémolytique (NheB) et la variante 2 de la cytotoxine K (cytK-2). De plus, elles sont sensibles au chloramphénicol, à la vancomycine et à l'imipénème.

Le profil t31a22 est composé d'une souche de *B. cereus* et d'une souche de *B. thuringiensis*, toutes deux isolées de mamelles de vache à Abobo N'dotré mais dans deux fermes différentes. Elles sont susceptibles de produire deux composantes de l'entérotoxine hémolysine BL (HblCD), une composante de l'entérotoxine non-hémolytique (NheC) et la variante 2 de la cytotoxine K (cytK-2). De plus, elles ont été sensibles à la clindamycine, à la vancomycine et à l'érythromycine.

Le profil t31a30 est constitué d'une souche de *B. thuringiensis* isolée à Abobo N'dotré et d'une souche de *B. cereus* spp. isolée à Lièvre rouge à Yopougon, toutes deux isolées de mamelles de vache. Elles étaient susceptibles de produire deux composantes de l'entérotoxine hémolysine BL (HblCD), une composante de l'entérotoxine non-hémolytique (NheC) et la variante 2 de la cytotoxine K (cytK-2). De plus, elles étaient sensibles à la clindamycine, à la vancomycine et à l'imipénème.

La souche de *B. thuringiensis* du profil t31a22 et celle du profil t31a30 étaient isolées de mamelles de 2 vaches différentes issues d'une même ferme à Abobo N' dotré. Elles avaient, à un antibiotique près (Érythromycine et Imipénème), le même profil génétique. C'est probablement la même souche qui circule dans la même ferme avec une mutation ou la perte ou l'acquisition du gène de résistance à l'imipénème d'une part et à l'érythromycine d'autre part.

Le profil t58a15 était constitué de 2 souches de *B. cereus* dont l'une était isolée de mamelles de vache provenant de Songon-Té et l'autre d'un échantillon d'*attiéké* vendu au marché d'Abobo gare. Elles étaient susceptibles de produire deux composantes de chacun des deux complexes de l'entérotoxine hémolysine BL (HblCD), de l'entérotoxine non-hémolytique (NheAC), la variante 2 de la cytotoxine K (cytK-2) et l'entérotoxine T (BceT). De plus, elles étaient sensibles à la clindamycine, à la vancomycine, à la gentamycine et à l'imipénème.

**Tableau 44** : Profils antibiotypiques spécifiques aux isolats obtenus du lait

Profils antibiotypiques	Antibiotiques												Groupe <i>Bacillus cereus</i>			Total isolats du lait
	AMP	P	FEP	C	CIP	CC	VA	G	IMP	TE	SXT	E	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> spp	
a6	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	0	0	1	1
a9	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	0	0	1	1
a10	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	S	1	0	0	1
a11	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	S	0	0	1	1
a16	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	3	0	0	3
a20	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	R	R	0	1	0	1
a22	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	1	1	1	3
a23	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	0	1	0	1
a24	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	0	2	0	2
a25	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	R	R	2	0	0	2
a29	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	S	0	0	1	1
a30	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	R	1	1	2	4
a32	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	0	2	1	3
a33	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	2	1	0	3
a38	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	1	1	1	3
<b>Total</b>													<b>11</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>30</b>

R : Résistant, S : Sensible, Amp : Ampicilline, P : Pénicilline, FEP : Céfépime, C : Chloramphénicol, CIP : Ciprofloxacine, CC : Clindamycine, VA : Vancomycine, G : Gentamycine, IMP : Imipénème, TE : Tétracycline, SXT : Triméthoprim-Sulfaméthoxazole, E : Érythromycine  
a = profil antibiotypique

**Tableau 45** : Profils antibiologiques spécifiques aux isolats obtenus de l'*attiéké*

Profils antibiologiques	Antibiotiques												Groupe <i>Bacillus cereus</i>		Total isolats de l' <i>attiéké</i>
	AMP	P	FEP	C	CIP	CC	VA	G	IMP	TE	SXT	E	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	
a1	R	R	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	1	0	1
a2	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	S	0	2	2
a3	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	S	0	1	1
a7	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	1	0	1
a14	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	R	0	1	1
a18	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	S	0	1	1
a19	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	0	1	1
a26	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	R	0	1	1
a27	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	0	1	1
a34	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	2	5	7
a35	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	0	1	1
a39	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	1	3	4
a40	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	1	1	2
a42	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	7	4	11
<b>Total</b>													<b>13</b>	<b>22</b>	<b>35</b>

R : Résistant, S : Sensible, Amp : Ampicilline, P : Pénicilline, FEP : Céfépime, C : Chloramphénicol, CIP : Ciprofloxacine, CC : Clindamycine, VA : Vancomycine, G : Gentamycine, IMP : Imipenème, TE : Tétracycline, SXT : Triméthoprime-Sulfaméthoxazole, E : Érythromycine

a = profil antibiologique

**Tableau 46** : Profils antibiotypiques communs aux isolats obtenus du lait et de l'*attiéké*

Profils antibiotypiques	Antibiotiques												Groupe <i>Bacillus cereus</i>			Nombre d'isolats		
	Amp	P	FEP	C	CIP	CC	VA	G	IMP	TE	SXT	E	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Bacillus cereus</i> spp	Lait	<i>Attiéké</i>	Total
a4	R	R	R	R	R	S	S	R	S	S	R	S	0	2	0	1	1	2
a5	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	S	1	1	3	4	1	5
a8	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	2	2	6	8	2	10
a12	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	4	1	2	3	4	7
a13	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	R	R	0	1	1	1	1	2
a15	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	S	6	4	3	7	6	13
a17	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	1	5	2	2	6	8
a21	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	S	3	2	1	2	4	6
a28	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	3	3	2	5	3	8
a31	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	11	0	1	6	6	12
a36	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	0	3	1	2	2	4
a37	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	3	10	6	12	7	19
a41	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	4	6	1	5	6	11
<b>Total</b>													<b>38</b>	<b>40</b>	<b>29</b>	<b>58</b>	<b>49</b>	<b>107</b>

**Tableau 47 : Diversités génétiques spécifiques aux isolats obtenus du lait**

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats			Nombre total d'isolats provenant du lait	Nombre de souches			Nombre de souches provenant du lait
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp	
t6	a41	0	1	0	1	0	1	0	1
t1	a5	0	0	1	1	0	0	1	1
t4	a37	0	0	1	1	0	0	1	1
t10	a28	0	1	0	1	0	1	0	1
t2	a37	0	1	0	1	0	1	0	1
t23	a22	0	0	1	1	0	0	1	1
t5	a15	0	0	1	1	0	0	1	1
t5	a21	0	1	0	1	0	1	0	1
t5	a33	0	1	0	1	0	1	0	1
t5	a41	0	1	0	1	0	1	0	1
t24	a37	0	1	0	1	0	1	0	1
t25	a4	0	1	0	1	0	1	0	1
t25	a38	0	1	0	1	0	1	0	1
t26	a15	0	0	1	1	0	0	1	1
t27	a12	1	0	0	1	1	0	0	1
t27	a30	1	0	0	1	1	0	0	1
t27	a31	1	0	0	1	1	0	0	1
t27	a37	0	0	1	1	0	0	1	1
t16	a8	0	1	0	1	0	1	0	1
t16	a37	0	0	1	1	0	0	1	1
t28	a21	0	0	1	1	0	0	1	1

Tableau 47 (suite 1)

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats			Nombre total d'isolats provenant du lait	Nombre de souches			Nombre de souches provenant du lait
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp	
t29	a28	0	0	1	1	0	0	1	1
t29	a30	0	0	1	1	0	0	1	1
t29	a32	0	1	1	2	0	1	1	2
t30	a12	0	0	1	1	0	0	1	1
t30	a28	1	0	0	1	1	0	0	1
t31	a8	0	0	2	2	0	0	1	1
t31	a10	1	0	0	1	1	0	0	1
t31	a16	1	0	0	1	1	0	0	1
t31	a17	0	0	1	1	0	0	1	1
t31	a22	1	1	0	2	1	1	0	2
t31	a28	0	0	1	1	0	0	1	1
t31	a30	0	1	1	2	0	1	1	2
t31	a31	3	0	0	3	1	0	0	1
t31	a33	1	0	0	1	1	0	0	1
t31	a36	0	1	0	1	0	1	0	1
t31	a37	0	0	1	1	0	0	1	1
t31	a38	1	0	0	1	1	0	0	1
t32	a6	0	0	1	1	0	0	1	1
t33	a12	0	0	1	1	0	0	1	1
t34	a11	0	0	1	1	0	0	1	1
t34	a17	0	0	1	1	0	0	1	1
t34	a31	1	0	0	1	1	0	0	1

Tableau 47 (suite 2)

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats			Nombre total d'isolats provenant du lait	Nombre de souches			Nombre de souches provenant du lait
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp	
t22	a9	0	0	1	1	0	0	1	1
t36	a41	1	0	0	1	1	0	0	1
t37	a15	0	1	0	1	0	1	0	1
t38	a37	0	1	0	1	0	1	0	1
t39	a20	0	1	0	1	0	1	0	1
t39	a24	0	1	0	1	0	1	0	1
t40	a37	1	0	0	1	1	0	0	1
t41	a36	0	0	1	1	0	0	1	1
t44	a31	0	0	1	1	0	0	1	1
t45	a24	0	1	0	1	0	1	0	1
t45	a28	1	0	0	1	1	0	0	1
t45	a41	0	1	0	1	0	1	0	1
t46	a5	0	0	2	2	0	0	1	1
t47	a8	0	0	1	1	0	0	1	1
t47	a13	0	0	1	1	0	0	1	1
t47	a15	2	0	0	2	1	0	0	1
t47	a29	0	0	1	1	0	0	1	1
t48	a23	0	1	0	1	0	1	0	1
t49	a8	0	0	1	1	0	0	1	1
t50	a15	0	0	1	1	0	0	1	1
t53	a8	0	1	0	1	0	1	0	1

Tableau 47 (suite 3)

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats			Nombre total d'isolats provenant du lait	Nombre de souches			Nombre de souches provenant du lait
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. cereus</i> spp	
t54	a32	0	1	0	1	0	1	0	1
t54	a37	0	1	0	1	0	1	0	1
t54	a41	0	0	1	1	0	0	1	1
t55	a25	1	0	0	1	1	0	0	1
t56	a37	0	1	0	1	0	1	0	1
t58	a5	1	0	0	1	1	0	0	1
t58	a8	0	0	1	1	0	0	1	1
t58	a16	2	0	0	2	1	0	0	1
t58	a25	1	0	0	1	1	0	0	1
t58	a37	0	0	2	2	0	0	1	1
t58	a38	0	0	1	1	0	0	1	1
t59	a8	0	0	1	1	0	0	1	1
t62	a33	1	0	0	1	1	0	0	1
<b>Total</b>		<b>24</b>	<b>25</b>	<b>38</b>	<b>87</b>	<b>20</b>	<b>25</b>	<b>35</b>	<b>80</b>

**Tableau 48** : Diversités génétiques spécifiques aux isolats obtenus de l'*attiéké*

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats		Nombre total d'isolats provenant de l' <i>attiéké</i>	Nombre de souches		Nombre de souches provenant de l' <i>attiéké</i>
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	
t7	a15	0	1	1	0	1	1
t7	a34	0	2	2	0	1	1
t7	a42	0	2	2	0	1	1
t8	a15	0	1	1	0	1	1
t8	a41	0	1	1	0	1	1
t9	a28	0	1	1	0	1	1
t10	a4	0	1	1	0	1	1
t11	a5	0	1	1	0	1	1
t11	a13	0	1	1	0	1	1
t12	a35	0	1	1	0	1	1
t12	a41	0	1	1	0	1	1
t3	a18	0	1	1	0	1	1
t13	a14	0	1	1	0	1	1
t14	a15	1	0	1	1	0	1
t14	a28	0	1	1	0	1	1
t14	a34	0	1	1	0	1	1
t14	a37	0	2	2	0	1	1
t14	a41	0	1	1	0	1	1
t14	a42	0	1	1	0	1	1
t15	a2	0	1	1	0	1	1

Tableau 48 (suite 1)

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats		Nombre total d'isolats provenant de l' <i>attiéké</i>	Nombre de souches		Nombre de souches provenant de l' <i>attiéké</i>
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	
t17	a42	0	1	1	0	1	1
t29	a31	1	0	1	1	0	1
t18	a17	0	1	1	0	1	1
t18	a36	0	1	1	0	1	1
t18	a39	0	1	1	0	1	1
t19	a17	0	3	3	0	1	1
t19	a34	0	1	1	0	1	1
t19	a36	0	1	1	0	1	1
t19	a39	0	2	2	0	1	1
t20	a26	0	1	1	0	1	1
t21	a27	0	1	1	0	1	1
t35	a2	0	1	1	0	1	1
t37	a37	0	1	1	0	1	1
t42	a42	1	0	1	1	0	1
t43	a17	0	1	1	0	1	1
t46	a8	1	0	1	1	0	1
t46	a12	0	1	1	0	1	1
t46	a34	1	0	1	1	0	1
t47	a17	1	0	1	1	0	1

Tableau 48 (suite 2)

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats		Nombre total d'isolats provenant de l' <i>attiéké</i>	Nombre de souches		Nombre de souches provenant de l' <i>attiéké</i>
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	
t51	a34	0	1	1	0	1	1
t51	a40	0	1	1	0	1	1
t52	a21	1	0	1	1	0	1
t53	a21	0	1	1	0	1	1
t53	a37	0	1	1	0	1	1
t54	a19	0	1	1	0	1	1
t57	a12	1	0	1	1	0	1
t57	a21	2	0	2	1	0	1
t57	a28	1	0	1	1	0	1
t57	a31	1	0	1	1	0	1
t57	a37	2	0	2	1	0	1
t57	a41	1	0	1	1	0	1
t58	a1	1	0	1	1	0	1
t58	a12	2	0	2	1	0	1
t58	a31	4	0	4	1	0	1
t58	a34	1	0	1	1	0	1
t58	a39	1	0	1	1	0	1
t58	a40	1	0	1	1	0	1
t58	a41	2	0	2	1	0	1
t58	a42	1	0	1	1	0	1

**Tableau 48 (suite 3)**

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats		Nombre total d'isolats provenant de l' <i>attiéké</i>	Nombre de souches		Nombre de souches provenant de l' <i>attiéké</i>
		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>		<i>B. cereus</i>	<i>B. thuringiensis</i>	
t59	a3	0	1	1	0	1	1
t59	a7	1	0	1	1	0	1
t60	a15	0	1	1	0	1	1
t60	a37	0	1	1	0	1	1
t61	a42	4	0	4	1	0	1
t61	a8	1	0	1	1	0	1
t62	a42	1	0	1	1	0	1
<b>Total</b>		<b>35</b>	<b>47</b>	<b>82</b>	<b>25</b>	<b>41</b>	<b>66</b>

**Tableau 49** : Diversités génétiques commune aux isolats obtenus du lait et de l'*attiéké*

Profils toxigéniques	Profils antibiotypiques	Nombre d'isolats <i>B. cereus</i>	Nombre d'isolats			Nombre de souches de <i>B. cereus</i>		
			Matrice		Total	Matrice		Total
			Lait	<i>Attiéké</i>		Lait	<i>Attiéké</i>	
t58	a15	3	1	2	3	1	1	2
<b>Total</b>		<b>3</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>

## 5.2. Discussion

L'identification des isolats provenant du lait et de l'*attiéké* révèle une diversité génétique, toxigénique et antibiotypique. En effet, 77,9 % des isolats ont été formellement identifiés dont 41,9 % *B. thuringiensis* et 36,0 % *B. cereus sensu stricto*. Au total, 22,1 % des isolats du groupe *B. cereus* n'ont pas pu être formellement identifiés par l'amplification du gène *gyrB*. La forte proportion des isolats du groupe *B. cereus* non identifiés formellement est due à l'existence de souches atypiques de *B. cereus* dont la présence dans les aliments a été signalée par **Pirttijarvi et al. (1998 ; 2000)**. Ces souches atypiques du groupe *B. cereus* ne peuvent être formellement identifiées que par des procédés sophistiqués et coûteux. Ainsi, pour tenir compte de ces souches atypiques, le terme présomptif a été introduit dans la norme **ISO 7932, (2004)** pour reconnaître le fait qu'il est difficile de distinguer *B. cereus sensu stricto* des autres espèces étroitement apparentées (**Floristean et al., 2007**). De plus, l'identification et la différenciation des espèces du groupe *B. cereus* sont complexes et difficiles en raison des similitudes génotypiques et phénotypiques qui existent entre elles (**Sergeev et al., 2005**). Par conséquent, certains auteurs considèrent le groupe *B. cereus* comme une seule espèce (**Helgason et al., 2000**).

La présence d'un fragment de chacun des gènes de l'entérotoxine HBL (*hblA*, *hblC*, *hblD*), NHE (*nheA*, *nheB*, *nheC*), de l'entérotoxine T (*bceT*), du cytotoxine K (*cytK*, *cytK-1* et *cytK-2*) et de la toxine émétique (*ces*) a été évaluée. Aucun des 172 isolats positifs du groupe *B. cereus* n'héberge le gène *cytK-1*. En effet, le gène *cytK-1*, une des variantes du gène *cytK*, est rare et les isolats du groupe *B. cereus* qui hébergent ce gène appartiennent à un groupe phylogénétique cytotoxique distinct comprenant des souches de *B. cytotoxicus* (**Guinebretiere et al., 2010**). Le gène *ces* est mis en évidence chez un seul (1,2 %) isolat identifié comme *B. thuringiensis* isolé d'un échantillon d'*attiéké*. Ces résultats sont en phase avec ceux d'autres études (**Svensson et al., 2006 ; Ankolekar et al., 2009**). **Svensson et al. (2006)** dans leur étude sur l'occurrence dans la chaîne de production laitière de *B. cereus* productrice de la toxine émétique, ont rapporté que seulement 1,1 % des 5668 souches de *B. cereus* évaluées sont productrices de la toxine émétique. **Ankolekar et al. (2009)** ont rapporté qu'aucune des souches qu'ils ont étudiée n'hébergeait le gène *ces*. Ces résultats indiquent que les isolats du groupe *B. cereus* provenant du lait et l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan ne sont pas producteurs de la toxine émétique. La production de la céréulide est un caractère rare des souches de *B. cereus* (**Aragon-Alegro et al., 2008**).

Au moins un des trois gènes de chacun des complexes NHE et HBL a été mis en évidence respectivement chez 95,9 % et 75,0 % des 172 isolats. Ces résultats sont similaires à ceux d'autres auteurs qui ont rapporté, dans leurs études menées dans différents pays en utilisant la méthode PCR, que *B. cereus* hébergeait au moins un des gènes des complexes NHE et HBL (Rivera *et al.*, 2000 ; Hansen et Hendriksen, 2001 ; Guinebretiere *et al.*, 2002 ; Aragon-Alegro *et al.*, 2008). La présence d'au moins un gène du complexe HBL ou NHE indique la présence de chacun des opérons *nhe* et *hbl* (Granum, 2007). L'incapacité de détecter tous les gènes par PCR dans la plupart des isolats s'explique par l'existence d'un polymorphisme dans la séquence des gènes des complexes HBL et NHE du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire et environnementale plutôt que par leur absence (Mantynen et Lindstrom, 1998 ; Hansen et Hendriksen, 2001 ; Guinebretiere *et al.*, 2002).

Une fréquence élevée des composants protéiques et/ou les gènes impliqués dans les maladies diarrhéiques a déjà été décrit dans les aliments pour *B. cereus* (Valero *et al.*, 2002 ; Choma *et al.*, 2000) et *B. thuringiensis* (Perani *et al.*, 1998 ; Rivera *et al.*, 2000). Tous les gènes mis en évidence, en dépit du gène *ces*, sont impliqués dans l'étiologie du syndrome diarrhéique (Guinebretiere *et al.*, 2006) et les entérotoxines NHE et HBL sont considérées comme les principaux facteurs de virulence du groupe *B. cereus* liées à une intoxication alimentaire (Arnesen *et al.*, 2008). En outre, diverses combinaisons des gènes de chaque complexe possèdent un certain degré d'activité biologique, mais l'activité maximale est obtenue lorsque tous les composants sont présents (Arnesen *et al.*, 2008 ; Banerjee *et al.*, 2011).

La distribution des gènes de virulence n'est pas significativement liée à l'espèce. Ceci montre que les facteurs de virulence potentiels responsables du syndrome diarrhéique sont distribués au sein de *B. cereus* et des espèces apparentées, en particulier *B. thuringiensis* impliqué dans les cas de diarrhée d'origine alimentaire (Jackson *et al.*, 1995 ; Rivera *et al.*, 2000). Ces souches sont susceptibles de produire l'hémolysine BL ou l'entérotoxine non hémolytique. En effet, les souches de *B. cereus* impliquées dans les diarrhées humaines, productrices de l'hémolysine BL ou l'entérotoxine non hémolytique, possèdent au moins deux gènes de chacun des complexes HBL et NHE (Banerjee *et al.*, 2011).

Dans l'ensemble, le gène *cytK* est mis en évidence dans 80,8 % des 172 isolats étudiés. L'abondance du gène cytotoxique *cytK* a été également rapportée par d'autres

études (**Guinebretiere et al., 2002 ; Samapundo et al., 2011**). Le gène *cytK* a été mis en évidence pour la première fois d'une souche de *B. cereus* qui a été incriminée dans une gastro-entérite sévère qui a tué trois personnes en France en 1998 (**Lund et al., 2000**). Un nouveau variant du gène *cytK* désigné *cytK-2* a été identifié (**Fagerlund et al., 2004 ; Guinebretiere et al., 2006**). Le gène *cytK-2* est moins cytotoxique que le gène *cytK-1*. Les isolats positifs au gène *cytK* hébergent uniquement le variant *cytK-2*, qui est le gène majoritairement mis en évidence. Plusieurs études ont rapporté la prépondérance du gène *cytK-2* dans les isolats du groupe *B. cereus* d'origine alimentaire (**Brillard et Lereclus 2004; Guinebretiere et al., 2002; Rosenquist et al., 2005**). Malgré que le gène *cytK-2* ne soit pas aussi cytotoxique que le gène *cytK-1*, sa capacité à provoquer une intoxication alimentaire ne doit pas être sous-estimée (**Fagerlund et al., 2004**) car ces isolats peuvent être hautement toxiques.

Les gènes fréquemment mis en évidence dans les isolats du lait sont par ordre décroissant *hblD* (89,8 %), *cytK-2* (89,8 %), *nheC* (73,9 %), *hblC* (68,2 %), *bceT* (38,6 %), *nheA* (36,4 %), *nheB* (25,0 %) et *hblA* (13,6 %). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans de nombreuses études effectuées pour évaluer la prévalence des gènes pathogènes du groupe *B. cereus* dans le lait et/ou de produits laitiers (**Aragon-Alegro et al., 2008 ; Chitov et al., 2008 ; Rather et al., 2011 ; Reis et al., 2013**). Dans toutes ces études, y compris la nôtre, le gène *hblD* (89,8 %) a été mis en évidence avec le taux le plus élevé, ce qui pourrait indiquer que le gène *hblD* de l'opéron HBL est le plus largement distribué dans les espèces du groupe *B. cereus* isolées du lait et des produits laitiers.

Le gène *nheA* (86,9 %) a été mis en évidence majoritairement dans les isolats d'*attiéké* dans cette étude. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres auteurs (**Hansen et Hendriksen, 2001 ; Banerjee et al., 2011 ; Chon et al., 2012 ; Rahimi et al., 2013**) dans d'autres produits riches en amidon tels que le riz, le blé dur, le couscous etc. La prévalence du gène *nheA* rapportée dans cette étude est supérieure à celle de **Banerjee et al. (2011)** et de **Chon et al. (2012)** et plus faible que celle de **Hansen et Hendriksen (2001)** et de **Rahimi et al. (2013)**. Par conséquent, le gène *nheA* est le plus produit du complexe NHE par le groupe *B. cereus* isolées de l'*attiéké*.

L'analyse de distribution des gènes de virulence a mis en évidence une diversité toxigénique du groupe *B. cereus* répartie en 62 profils dont 30 sont spécifiques aux souches provenant du lait contre 22 de l'*attiéké*. La différence entre les profils toxigéniques des isolats provenant du lait et ceux provenant de l'*attiéké* indique que le type d'aliment a une influence sur la distribution toxigénique des souches du groupe *B. cereus*. Cependant,

10 profils toxigéniques sont communs aux isolats provenant des deux matrices étudiées, indiquant que ces profils sont indépendants de l'aliment sources des isolats. Ces résultats sont discordants avec ceux de **Samapundo et al. (2011)** et de **Rahimi et al. (2013)**. En effet, **Samapundo et al. (2011)** ont rapporté 16 profils toxigéniques différents avec 80 isolats obtenus de nombreux produits alimentaires prêts à consommer en Belgique dont les pâtes cuites, la lasagne, la sauce de béchamel, la sauce bolognaise, le riz basmati. **Rahimi et al. (2013)** ont rapporté 14 profils toxigéniques différents obtenus 84 souches isolées des produits alimentaires pour nourrisson en Iran. Le nombre élevé de profils révélés dans ce travail montre la diversité toxigénique des isolats provenant du lait et de l'*attiéké* à Abidjan. La grande diversité toxigénique observée au sein des isolats étudiés a été aussi rapportée dans la littérature (**Hansen et Hendriksen, 2001 ; Al-Khatib et al., 2007**). La diversité toxigéniques des 172 isolats étudiés est confirmée par la mise en exergue de 80 souches toxigéniques différentes dont 19 souches de *B. cereus*, 37 souches de *B. thuringiensis* et 24 souches de *B. cereus* spp. L'hétérogénéité génétique observée parmi les souches de *B. cereus* est plus associée au polymorphisme de séquence avec de l'absence d'au moins un des gènes du complexe HBL et NHE (**Mantynen et Lindstrom, 1998**).

À partir des 62 profils toxigéniques, 1,2 % des souches possèdent 8 des 9 gènes recherchés tandis que 4,1 % en ont 7 gènes. Tous les trois gènes requis pour la production de l'hémolysine BL (HBL) et l'entérotoxine non hémolytique (NHE) sont révélées chez respectivement 13,8 % et 7,0 % des 172 isolats dont la majorité est obtenue de l'*attiéké* et l'espèce dominante est *B. thuringiensis*. Au total, 3,5 % des isolats possèdent simultanément les trois gènes du complexe HBL et ceux du complexe NHE. Certains auteurs (**Samapundo et al., 2011 ; Rahimi et al., 2013**) ont rapporté des prévalences élevées d'isolats ayant des caractéristiques similaires. Ainsi, tous les isolats qui hébergent tous les gènes requis pour la production de chacun des entérotoxines HBL et NHE sont susceptibles de produire une hémolysine et une non-hémolysine fonctionnelle.

Il existe une diversité génétique des isolats entéro-toxinogènes du groupe *B. cereus* parce que certains isolats contiennent tous les gènes du complexe NHE et HBL, d'autres contiennent soit un ou deux gènes des complexes NHE et HBL ou uniquement les gènes du complexe NHE ou HBL comme démontré dans la présente étude et d'autres études antérieures (**Samapundo et al., 2011 ; Tewari et al., 2013**). Une étude récente a montré que le syndrome diarrhéique est lié à l'entérotoxine non hémolytique (NHE), à l'entérotoxine hémolytique BL (HBL) et à la cytotoxine K, alors que le vomissement est

provoqué par l'action de la toxine depsipeptide, le céréulide (Ehling-Schulz *et al.*, 2006). En particulier, la prévalence du complexe NHE semble expliquer la plupart de l'activité cytotoxique du groupe *B. cereus* indiquant un potentiel diarrhéique (Moravek *et al.*, 2006). Par conséquent, les souches étudiées dans cette présente étude, surtout ceux provenant de l'*attiéké* semblent posséder une activité cytotoxique.

Tous les isolats sont résistants à la triméthoprine-sulfaméthoxazole (100 %) et aux  $\beta$ -lactamines incluant l'Ampicilline (100 %), la pénicilline (100 %), le céfépime (100 %) et dans une moindre mesure à l'imipénème (53,5 %). Les résultats concordent avec plusieurs études antérieures qui ont déclaré la résistance du groupe *B. cereus* à la triméthoprine-sulfaméthoxazole et aux  $\beta$ -lactamines tels que l'ampicilline, la pénicilline, le céfépime, l'oxacilline et les céphalosporines (Andrews et Wise, 2002; Luna *et al.*, 2007 ; Park *et al.*, 2009; Chon *et al.*, 2012). En effet, le groupe *B. cereus*, à l'exception de *B. anthracis* qui est sensible à la pénicilline, est pour la plupart résistant à la triméthoprine et à certains antibiotiques de la famille des  $\beta$ -lactamines, y compris l'ampicilline, le céfépime, le carbénicilline, la céphalothine, le cloxacilline et la pénicilline G (Jensen *et al.*, 2001; Roy *et al.*, 2007). De plus, *B. cereus* est généralement sensible aux aminoglycosides, au chloramphénicol, à la clindamycine, à l'érythromycine, à la tétracycline et à la vancomycine (Andrews et Wise, 2002; Logan et Turnbull, 2003; Chaves *et al.*, 2011 ; Chon *et al.*, 2012). Cependant, divers auteurs dont Roy *et al.* (2007) et Merzougui *et al.* (2014) ont montré que les espèces de *B. cereus* sont multirésistantes. Ces résultats ont été confirmés par cette étude. En effet, les espèces du groupe *B. cereus* étudiées ont montré une forte résistance à la ciprofloxacine (94,8 %), à la tétracycline (94,8 %), au chloramphénicol (94,2 %) et dans une moindre mesure à l'érythromycine (66,3 %) et à la vancomycine (56,4 %). Certains isolats sont sensibles à d'autres antibiotiques y compris la clindamycine (83,7 %) et la gentamycine (70,9 %). La sensibilité des isolats à la clindamycine et à la vancomycine est liée à la matrice alimentaire. Ainsi, tous les isolats (100 %) provenant du lait sont sensibles à la clindamycine contre 66,7 % pour ceux provenant de l'*attiéké* tandis que 52,3 % des isolats provenant du lait sont sensibles à la vancomycine contre 34,5 % pour ceux obtenus de l'*attiéké*. La variation entre les pourcentages de résistance peut être attribuée à la différence des antibiotiques utilisés, à la différence entre l'origine géographique, les matrices alimentaires des souches, au transfert des gènes de résistances et à la propagation des antibiotiques dans l'environnement (Agwa *et al.*, 2012). Toutes ces résistances observées sont des résistances acquises. Ainsi, les

résultats révèlent qu'il y a une émergence de souches du groupe *B. cereus* multirésistantes aux antibiotiques. La forte prévalence de souches multirésistantes aux antibiotiques du groupe *B. cereus* isolé du lait, de l'*attiéké* et de l'environnement suggère que l'antibiotique le plus couramment utilisé est inefficace pour traiter les infections causées par le groupe *B. cereus*.

L'apparition des profils de résistance observés chez les isolats obtenus du lait pourrait être attribuée à l'utilisation sans discernement des antibiotiques dans les fermes. En effet, **Kouamé-Sina et al. (2010)** ont signalé la présence de résidus de médicaments vétérinaires dans plusieurs échantillons de lait produit traditionnellement à Abidjan. L'exposition des bovins laitiers à certains antimicrobiens peut être associée à une proportion accrue de la résistance de certains microorganismes (**Pol et Ruegg, 2007**). Les bactéries résistantes aux antibiotiques peuvent survivre dans les sédiments des fermes, dans le sol et dans l'environnement agroalimentaire et peuvent transférer cette résistance à d'autres microorganismes pathogènes dans le même environnement et aussi aux consommateurs (**Floristean et al., 2007**).

Dans les fermes, les vaches sont nourries d'épluchure de manioc. Or, les isolats de l'*attiéké* et des échantillons prélevés aux étapes intermédiaires du processus de production de l'*attiéké* sont très résistants (94,0 %) à la tétracycline. La forte résistance à la tétracycline des isolats obtenus du lait serait due à un transfert de gènes. De plus, l'oxytétracycline est très utilisée dans les élevages. En effet, l'oxytétracycline et la tétracycline sont de la même famille d'antibiotique. Les antibiotiques de la même famille auraient les mêmes mécanismes de résistance. Ce qui pourrait justifier en partie la forte résistance des isolats du lait à la tétracycline.

Les profils de résistance aux antimicrobiens du groupe *B. cereus* dans les aliments sont utiles dans les études épidémiologiques. Il y a une plus grande proportion des profils de résistance multiple parmi les isolats du groupe *B. cereus* obtenus à partir d'aliments et de l'environnement. Les profils de résistance multiple observés révèlent que ces agents antimicrobiens sont utilisés avec abus ou à une dose sublétales dans l'environnement et aussi en raison des différences des sources où les isolats ont été obtenus.

Les isolats du groupe *B. cereus* provenant du lait et de l'*attiéké* sont divisés en 42 profils antibiotiques sur la base de leur sensibilité ou de leur résistance vis-à-vis des 12 antibiotiques testés. Les isolats provenant du lait se regroupent en 28 profils antibiotiques contre 27 profils pour les isolats provenant de l'*attiéké*. Le recoupage des profils antibiotiques avec les matrices alimentaires révèle 15 profils spécifiques aux

isolats provenant du lait, 14 profils spécifiques aux isolats provenant de l'*attiéké* et 13 profils communs aux isolats obtenus des deux matrices. Les isolats provenant de l'*attiéké* sont résistants à un grand nombre d'antibiotiques que ceux provenant du lait.

### **Conclusion partielle**

*B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* ont été les germes majoritaires du lait et de l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan. Les facteurs de virulence potentiels responsables du syndrome diarrhéique sont distribués au sein des espèces du groupe *B. cereus* isolées du lait et de l'*attiéké*. Elles sont multi-toxinogènes, hébergent au moins un des gènes de chacun des complexes NHE et HBL associé ou non aux gènes *bceT*, *cytK-2* et *ces*. Les isolats sont multirésistants avec une forte résistance vis-à-vis de la tétracycline et de la ciprofloxacine. Aucun isolat obtenu du lait n'était résistant à la clindamycine alors que 33,3 % pour ceux obtenus de l'*attiéké*. La grande variabilité au niveau des isolats montrent leur susceptibilité à provoquer des toxi-infections alimentaires. Par conséquent, elles posent un problème de santé publique. Cependant, le nombre de bactéries entéro-toxinogènes consommées et la quantité de toxine produite par souche donnée déterminera le résultat.

---

## 6. ÉVALUATION DES RISQUES DE TOXI-INFECTIONS LIÉS À LA CONSOMMATION DU LAIT ET DE L'ATTIÉKÉ

### 6.1. Résultats

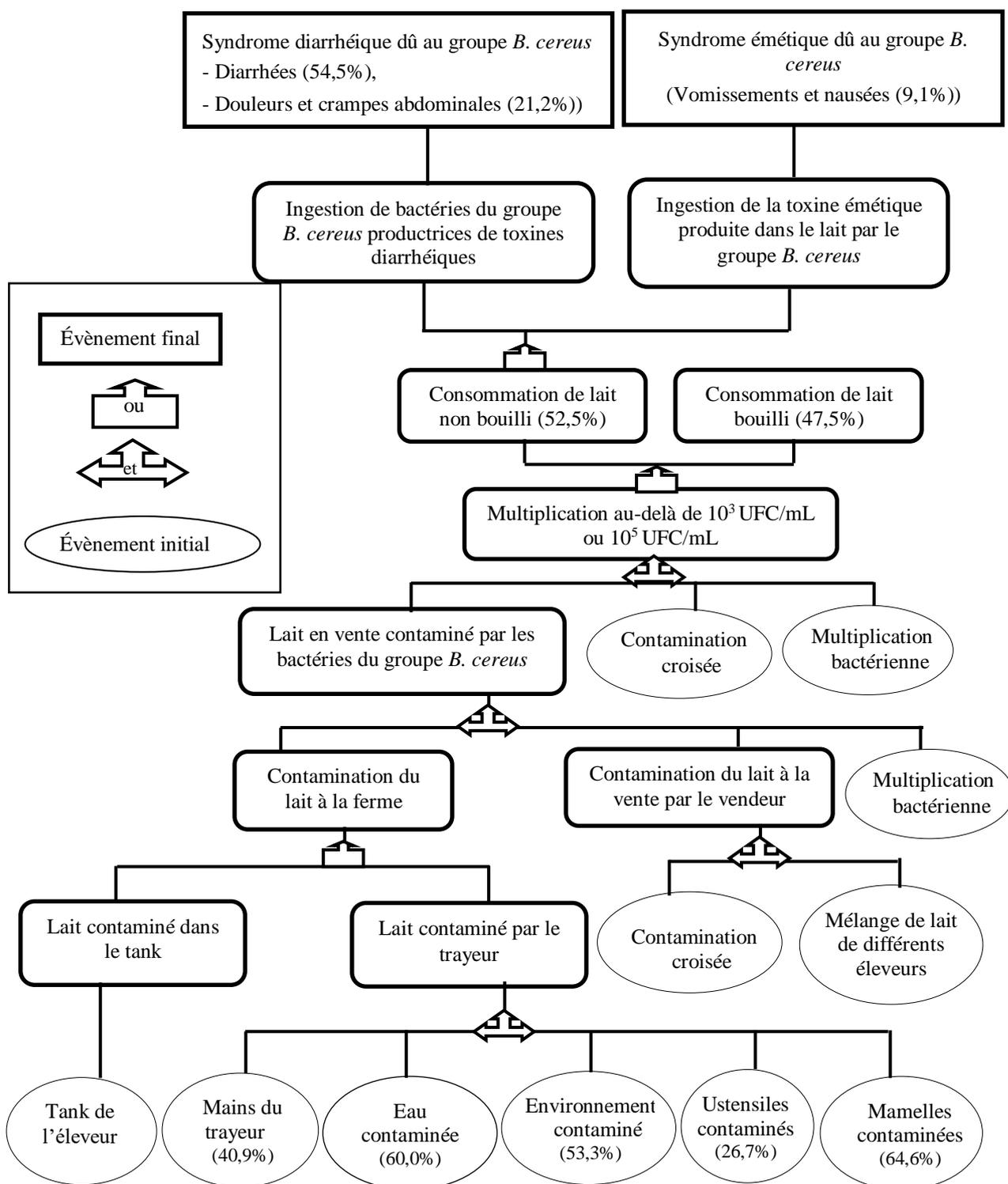
#### 6.1.1. Évaluation des risques liés à la consommation du lait

##### 6.1.1.1. Identification du danger dans le lait

L'analyse des 150 échantillons de lait a révélé un taux global de contamination par le groupe *B. cereus* de 28,7 %. Cette contamination a été observée le long de la chaîne de production, de la ferme à la vente. Ainsi, 26,9 % du lait de quartiers, 28,6 % du lait de tank et de 41,2 % du lait de vente ont été contaminés par le groupe *B. cereus*. Les espèces formellement identifiées ont été *B. cereus sensu stricto* et *B. thuringiensis* dans les mêmes proportions (28,4 %) (**Se conférer aux tableaux 24 et 38**).

##### 6.1.1.2. Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation du lait cru contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

Les événements qui interviennent dans la contraction des toxi-infections liées à la consommation de lait contaminé par le groupe *B. cereus* sont présentés à la **figure 19**. La contamination du lait à la ferme par le groupe *B. cereus* provient de la peau des mamelles (64,6 %), de l'eau utilisée (60 %), de l'environnement (53,3 %), des mains des trayeurs (40,9 %) et des ustensiles de traite (26,7 %). Il s'ensuit une série de contaminations croisées du lait à l'intérieur du tank (ou bidon) de l'éleveur par le mélange des laits contaminés et non contaminés de la même ferme d'une part, et des laits des fermes voisines d'autre part. Ensuite, les germes se développent sous l'effet de la chaleur ( $30,4 \pm 1^\circ\text{C}$ ) lors du transport du lait vers les marchés informels de vente de lait à cause du manque de chaîne de froid. Au cours de la vente, les germes, en l'absence de réfrigération et/ou d'un traitement thermique, croissent à des niveaux dépassant les limites acceptables. La consommation de lait non réchauffé ou non bouilli (52,5 %) occasionne des toxi-infections dont les symptômes sont en majorité la diarrhée (54,5 %) et les douleurs abdominales (21,2 %, **figure 19**).



**Figure 19 :** Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation du lait contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

### 6.1.1.3. Caractéristiques des consommateurs du lait

Les caractéristiques socio-démographiques des consommateurs de lait cru et les modes de consommations sont présentés dans le **tableau 50**.

L'âge moyen des 188 enquêtés est  $35 \pm 13$  ans (min = 16 ans ; max = 75 ans). Le lait est consommé en majorité (76 %) par les jeunes dont l'âge est compris entre 19 et 49 ans contre 4,4 % d'enfants dont l'âge est inférieur à 18 ans et 6,0 % de vieilles personnes dont l'âge est supérieur à 60 ans (**tableau 50**). Les consommateurs de lait sont constitués à 77,7 % d'hommes et à 22,3 % de femmes avec 50 % d'ivoiriens, 20,7 % de maliens et 19,1 % de burkinabés. La majorité (43,6 %) des consommateurs a fait l'école coranique alors que 23,4 % n'ont pas été à l'école et le niveau d'instruction majoritaire est le primaire (50 %). Seulement, 4,3 % de ces personnes ont un niveau universitaire ou supérieur. En plus, 96,3 % des consommateurs de lait sont des musulmans contre 3,2 % de chrétiens.

### 6.1.1.4. Évaluation de l'exposition, du mode et de la fréquence de consommation du lait

La fréquence de contamination du lait de vente par le groupe *B. cereus* au point de vente est de 41,2 %. Tous les laits contaminés au point de vente ont des charges qui dépassent les limites acceptables. Ainsi, parmi les 17 échantillons de lait de vente analysés, 58,8 % ont été classés de qualité microbiologique satisfaisante, 17,6 % de qualité microbiologique insatisfaisante et 23,5 % de qualité microbiologique insatisfaisante avec un risque pour la santé du consommateur (**se conférer au tableau 25 et à la figure 12**).

Environ 68,6 % du lait obtenu des marchés informels est utilisé pour des rituels contre 97,3 % pour la consommation humaine. Après les rituels, le lait est, dans 65,9 % des cas, consommé et surtout par les enfants (63,6 %). La consommation du lait cru provenant des rituels par les enfants, augmente le risque d'intoxication des enfants.

Parmi les consommateurs de lait, 32,2 % des personnes consomment le lait chaque jour et 61,2 % des personnes le consomment deux à cinq jours par semaine. La consommation moyenne de lait est de  $0,44 \pm 0,6$  litre/jour/personne. Au total, 52,5 % des personnes consomment le lait sans aucun traitement thermique (chauffage, bouilli) parmi lesquelles 26 % ont une consommation journalière (**tableau 51**). En multipliant la proportion de personnes consommant le lait cru sans aucun traitement thermique (52,5 %) par la proportion de lait de vente dépassant les limites d'acceptabilité (41,2 %), la probabilité d'ingérer du lait cru contaminé par le groupe *B. cereus* est estimée à 21,6 %. Le produit de la concentration moyenne du lait (lait de vente) au point de vente ( $8,0 \times 10^4$

---

UFC/mL) par la quantité moyenne de lait consommée par jour par personne (440 mL) permet d'estimer la dose de bactéries du groupe *B. cereus* ingérée par jour en consommant le lait cru non traité thermiquement à  $3,5 \times 10^5$  germes. La quantité de bactéries du groupe *B. cereus* ingérée ( $3,5 \times 10^5$  germes) par la consommation de lait cru non chauffé, ni bouilli est 3,5 fois plus élevée que la dose infectieuse ( $10^5$  germes). Par conséquent, la consommation régulière de lait qui n'a subi aucun traitement thermique représente un risque d'intoxication pour le consommateur.

#### 6.1.1.5. Facteurs de risque et toxi-infections liés à la consommation du lait

Aucune personne n'était malade lors des enquêtes mais des symptômes potentiels associés à une infection alimentaire relative à la consommation du lait ont été rapportés par 12,6 % des consommateurs de lait (**tableau 52**). Les symptômes les plus évoqués ont été la diarrhée (54,5 %) et les douleurs abdominales (21,2 %). Parmi les malades, 34,8 % des cas rapportés ont été sévères avec une nécessité d'un arrêt de travail et 13 % ont été sévères avec une hospitalisation d'un à trois jours. Le temps entre la consommation de lait et l'apparition des symptômes variait de 6 à 36 heures. La majorité, soit 73,9 % des symptômes, disparaît en moins de 48 heures après l'apparition des premiers signes. L'apparition des symptômes est significativement liée à la consommation de lait cru non-chauffé ( $p < 0,028$ ), mais la relation entre la consommation de lait cru qui n'a pas subi de traitement thermique et l'apparition de toxi-infection est faible ( $V = 0,163$ ). Ainsi, le risque de contracter une affection gastro-entérique ou toxi-infection est 2,6 fois plus élevé chez les personnes qui consomment le lait sans aucun traitement thermique que chez celles qui consomment le lait avec un traitement thermique (**tableau 53**). La consommation de lait cru sans traitement thermique représente par conséquent un risque pour le consommateur ( $RR = 2,6$  ; [IC 95 % : 1,1 – 7,7] ;  $V = 0,163$ ). La différence de risque (DDR) ou excès de risque qui exprime l'augmentation de l'incidence des toxi-infections chez les consommateurs de lait non chauffé par rapport à ceux qui le consomment avec un chauffage adéquat est de 10,8 %. La fraction étiologique du risque (FER) qui est la proportion de malade parmi les consommateurs de lait cru qui peut être évitée si tous les consommateurs chauffent parfaitement le lait avant toute consommation est de 45,1 %.

**Tableau 50** : Caractéristiques socio-démographiques des consommateurs de lait

<b>Caractéristiques</b>	<b>Nombre de personnes enquêtées (N = 188)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Sexe des personnes enquêtées</b>		
Homme	146	77,7
Femme	42	22,3
<b>Nationalité des consommateurs de lait</b>		
Ivoirienne	94	50
Burkinabé	39	20,7
Malienne	36	19,1
Autres	19	10,1
<b>Niveau d'instruction des consommateurs</b>		
Non scolarisé	44	23,4
Primaire	30	16
Secondaire	24	12,8
Université	8	4,3
Primaire Ecole coranique	64	34
Secondaire Ecole coranique	13	6,9
Supérieur Ecole coranique	5	2,7
<b>Religion des enquêtés/consommateurs</b>		
Chrétien	6	3,2
Musulman	181	96,3
Autres	1	0,5
<b>Age des enquêtés/consommateurs</b>		
≤ 18 ans	8	4,4
19 - 49 ans	139	76
50 - 59 ans	19	10,4
≥ 60 ans	11	6
Non déterminé	6	3,3
Age minimum	16 ans	
Age maximum	75 ans	
Age moyen	35 ± 13 ans	

**Tableau 51** : Mode et fréquence de consommation du lait cru

<b>Caractéristiques</b>	<b>Nombre de personnes enquêtées (N = 188)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Utilité du lait acheté</b>		
Consommation humaine	183	97,3
Rituels	129	68,6
<i>Devenir du lait après rituels</i>		
Rejeté	2	1,6
Non déterminé	42	32,8
Consommé	85	65,9
✓ Enfants	54	63,6
✓ Vieillards	31	36,4
<b>Mode de consommation du lait</b>		
<i>Consommateur de lait</i>		
Non	5	2,7
Oui	183	97,3
- Lait chauffé	87	47,5
- Lait non chauffé	96	52,5
✓ Consommation quotidienne de lait non chauffé	25	26
<i>Fréquence de consommation du lait</i>		
Occasionnellement (moins d'une fois tous les 2 mois)	3	1,6
Un à deux jours par mois	9	4,9
Deux à cinq jours par semaine	112	61,2
Quotidien	59	32,2
Charge moyenne en bactéries du groupe <i>Bacillus cereus</i>	8,0 x 10 <sup>4</sup> UFC/mL	
Quantité de lait consommé par jour	0,44 ± 0,6 litre/jour/personne	
Dose ingérée du groupe <i>Bacillus cereus</i>	3,5 x 10 <sup>5</sup> germes/jours/personne	
Probabilité de consommer du lait contaminé par <i>B. cereus</i>	21,6 %	

**Tableau 52 : Risque lié à la consommation du lait issu des marchés informels**

<b>Paramètres</b>	<b>Nombre de consommateurs (n = 183)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Conséquence de la consommation du lait sur la santé</b>		
Non malade	160	87,4
Malades	23	12,6
<b>Symptômes rapportés liés à la consommation du lait (n = 23)</b>		
Diarrhée	18	54,5
Douleurs abdominales	7	21,2
Fièvre	4	12,1
Vomissements et nausées	3	9,1
Toux	1	3
<i>TOTAL</i>	<i>33 cas</i>	<i>100</i>
<b>Délai d'apparition des symptômes</b>		
1 – 6 heures	0	0
6 - 18 heures	8	34,8
18 - 36 heures	15	65,2
<b>Durée des symptômes</b>		
< 24 heures	5	21,7
24 - 48 heures	12	52,2
> 48 heures	6	26,1
<b>Sévérité de la maladie</b>		
Maladie moins grave (continue de travailler)	12	52,2
Maladie sévère (reste à la maison)	8	34,8
Maladie très sévère (hospitalisation)	3	13

**Tableau 53** : Effet du traitement thermique du lait sur la survenue de la maladie

	<b>Effectif des personnes malades après la consommation du lait</b>	<b>Effectif des personnes saines après la consommation du lait</b>	<b>Total (%)</b>
<b>Consommation du lait local sans traitement thermique</b>	17	79	96
<b>Consommation du lait local avec traitement thermique</b>	6	81	87
<b>Total</b>	23	160	183

Khi deux de Pearson = 4,855 ;  $p = 0,028 < \alpha = 0,05$  ; RR = 2,6; IC 95 % : [1,1 ; 7,7] ; DDR = 0,108 (10,8 %) ;  $V = 0,163$  ; FER = 45,1 %.

RR = Risque relatif

DDR = Différence de Risque : (DDR =  $17/96 - 6/87$ )

FER = Fraction étiologique du risque

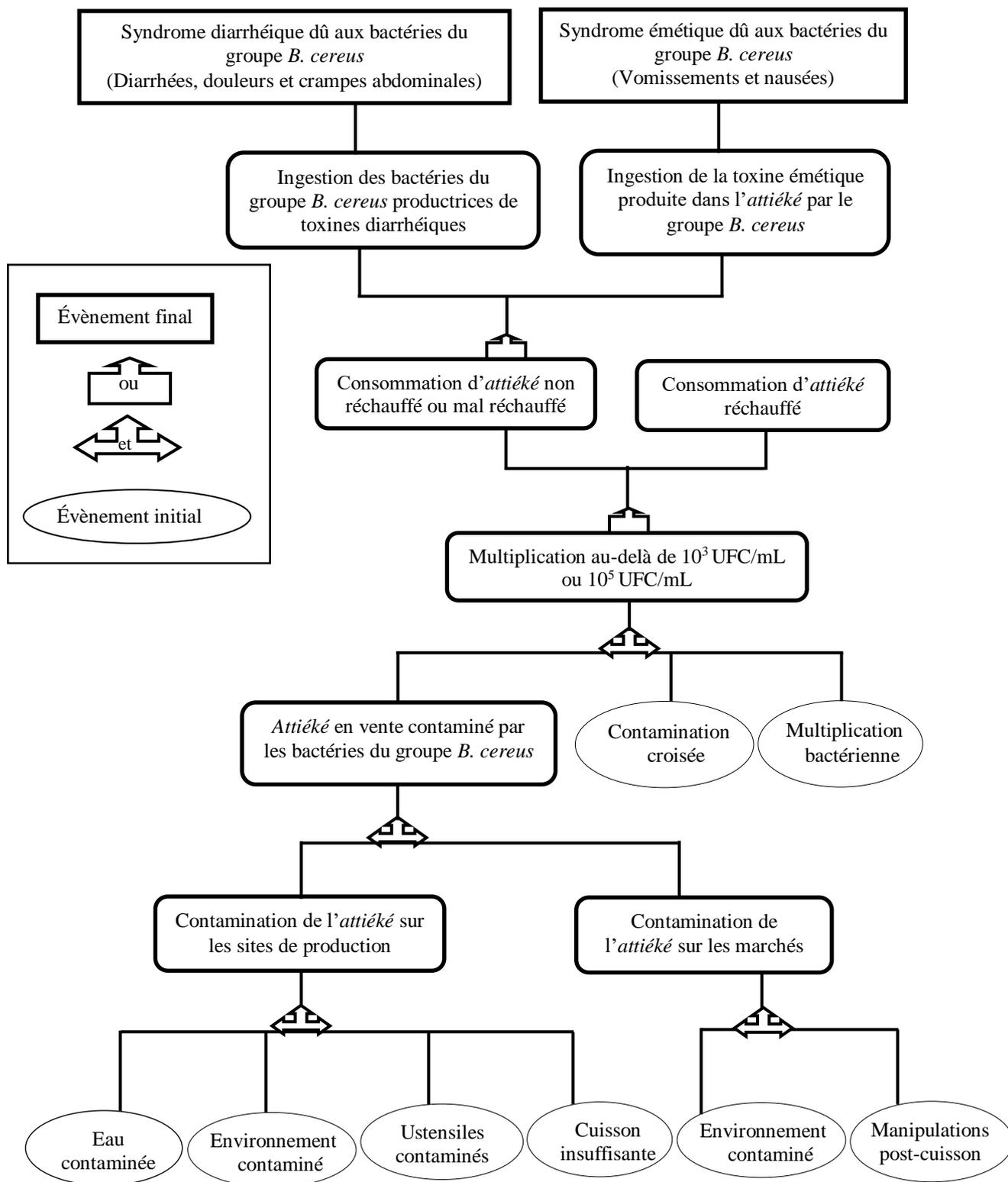
## 6.1.2. Évaluation des risques liés à la consommation de l'*attiéké*

### 6.1.2.1. Identification du danger dans l'*attiéké*

Le groupe *B. cereus* a été confirmé par les résultats de l'analyse bactériologique. Le taux de contamination des 306 échantillons d'*attiéké* obtenus sur les marchés informels par le groupe *B. cereus* était de 25,2 %. Au total, 44 % des 84 isolats confirmés du groupe *B. cereus*, ont été identifiés *B. cereus sensu stricto* contre 56 % de *B. thuringiensis* (**se référer aux tableaux 32 et 38**).

### 6.1.2.2. Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation d'*attiéké* contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

Les événements qui interviennent dans la contraction des toxi-infections liées à la consommation d'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* sont présentés à la **figure 20**. Les spores du groupe *B. cereus* ont été détectées dans la pâte de manioc fermenté pressée séchée prête à la cuisson à la vapeur d'eau. La cuisson à la vapeur d'eau par utilisation de bois de chauffage n'a pas permis de détruire toutes les spores du groupe *B. cereus*. Par la suite, il y a une série de contaminations de l'*attiéké* notamment par l'environnement, par l'eau utilisée par les productrices au cours de la production de l'*attiéké* et par les ustensiles. De plus, au cours de la vente sur les marchés, l'*attiéké* est aussi contaminé par l'environnement de vente et par les nombreuses manipulations (contamination croisée). Il s'ensuit une multiplication bactérienne au cours de la vente au détail à la température ambiante pour atteindre des charges qui dépassent les limites acceptables. La consommation de l'*attiéké* au-delà de 3 jours après la production, sans un réchauffage préalable (63,3 %), entraîne des toxi-infections (18,9 %) dont les symptômes sont en majorité la diarrhée (33,8 %) et les douleurs abdominales (23,5 %) (**se référer au tableau 56**).



**Figure 20** : Arbre de défaillance des toxi-infections liées à la consommation de l'attiéké contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

### 6.1.2.3. Caractéristiques des consommateurs d'*attiéké*

Les caractéristiques socio-démographiques des consommateurs d'*attiéké* sont présentées dans le **tableau 54**. L'*attiéké* était consommé en majorité (78,9 %) par les jeunes et les adultes dont l'âge est compris entre 19 et 49 ans contre 12,2 % d'enfants dont l'âge est inférieur à 18 ans et 1,1 % de vieilles personnes dont l'âge est supérieur à 60 ans. Les consommateurs d'*attiéké* étaient constitués de 52,5 % d'hommes et de 47,5 % de femmes parmi lesquels 69,7 % étaient célibataires et 30,3 % étaient mariés. L'*attiéké* était consommé par toutes les couches sociales avec une prédominance des élèves (19,4 %), des étudiants (14,2 %) et les commerçants (13,1 %).

**Tableau 54** : Caractéristiques socio-démographiques des consommateurs d'*attiéké*

Caractéristiques	Nombre de personnes enquêtées (n = 360)	Pourcentage (%)
<b>Sexe des consommateurs</b>		
Homme	189	52,5
Femme	171	47,5
<b>Situation matrimoniale</b>		
Marié	109	30,3
Célibataire	251	69,7
<b>Age</b>		
≤ 18 ans	44	12,2
19 - 49 ans	284	78,9
50 - 59 ans	5	1,4
≥ 60 ans	4	1,1
Non déterminé	23	6,4
<b>Classe sociale</b>		
Élève	70	19,4
Étudiant	51	14,2
Commerçant	47	13,1
Ménagère	45	12,5
Sans emploi	27	7,5
Autres professions	120	33,3

#### 6.1.2.4. Évaluation de l'exposition, mode et fréquence de consommation de l'*attiéké*

La prévalence en groupe *Bacillus cereus* dans l'*attiéké* en vente sur le marché est de 25,2 %. Tous les échantillons d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus* ont des charges qui dépassent les limites acceptables. De plus, parmi les 77 échantillons d'*attiéké* contaminés, 18,6 % sont de qualité microbiologique insatisfaisante, 5,2 % de qualité microbiologique insatisfaisante avec risque pour la santé du consommateur et 1,3 % de qualité microbiologique insatisfaisante avec un risque élevé pour la santé du consommateur car ayant des charges supérieures à 5 log (UFC/g).

L'*attiéké* obtenu du marché informel est consommé le même jour (86,7 %) ou différé (13,3 %) avec une conservation au réfrigérateur (5 %) ou à la température ambiante (8,3 %). La durée de conservation de l'*attiéké* varie de 1 à 5 jours avant sa consommation (**tableau 55**). Au total, 86,7 % et 16,7 % des consommateurs conservent l'*attiéké* au réfrigérateur pendant respectivement un jour, et 2 à 5 jours tandis que 66,7 % et 33,3 % le conserve à la température ambiante pendant respectivement un jour et 2 à 5 jours. L'*attiéké* est consommé sans être réchauffé par 63,3 % des consommateurs parmi lesquels 97,8 % le même jour d'achat et 2,2 % après au moins un jour de conservation à la température ambiante.

En multipliant la proportion de personnes consommant l'*attiéké* 3 jours après la production sans aucun traitement thermique (63,3 %) par la proportion d'*attiéké* en vente qui dépasse les limites d'acceptabilité (25,2 %), la probabilité d'ingérer de l'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* est estimée à 16,0 %.

L'*attiéké* est consommé au cours des trois principaux repas de la journée avec une consommation de 66,9 % au petit déjeuner, 63,3 % au déjeuner et 48,6 % au dîner (**tableau 55**). Il n'y a pas de différence significative ( $P > 0,05$ ) entre la consommation d'*attiéké* au cours des trois principaux repas de la journée.

L'*attiéké* est consommé à domicile (52,5 %) et hors-domicile (47,5 %). La consommation hors-domicile se fait dans les "maquis" (36,3 %), restaurants (31 %) et dans les "garbadrômes" (12,3 %).

La fréquence de consommation d'*attiéké* varie de 1 à 4 fois par jour. Ainsi, 48,1 %, 35,8 %, 15,6 % et 0,6 % des personnes consomment l'*attiéké* respectivement une, deux, trois et quatre fois par jour. La consommation de l'*attiéké* est journalière chez 21,4 % des consommateurs tandis que 78,6 % des personnes consomment l'*attiéké* 1 à 6 jours par

semaine. La quantité moyenne d'*attiéké* consommée est de  $296 \pm 310$  g/jour/personne (**tableau 56**).

En multipliant, la charge moyenne en groupe *B. cereus* de l'*attiéké* en vente ( $2,4 \log$  UFC/g soit  $2,5 \times 10^2$  UFC/g) par la quantité moyenne d'*attiéké* consommée par jour par personne (296 g), la dose de bactérie du groupe *B. cereus* ingérée par jour par personne en consommant l'*attiéké* non réchauffé 3 jours après la production est de  $7,4 \times 10^4$  germes (**tableau 56**). Cette quantité de germes ingérés par jour par jour personne est inférieure à la dose infectieuse ( $10^5$  germes) mais supérieure à la dose minimale infectieuse ( $10^3$  germes) rencontrée dans certaines toxi-infections alimentaires (**tableau 56**). Par conséquent, le risque de toxi-infection lié à la consommation d'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* est considéré comme modéré.

**Tableau 55** : Mode de consommation d'*attiéké*

<b>Caractéristiques</b>	<b>Nombre de consommateurs (N = 360)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Conservation de l'<i>attiéké</i> avant consommation</b>		
Consommation le même jour	312	86,7
Consommation différée	48	13,3
✓ Conservation au réfrigérateur	30	5
<i>Durée de conservation au réfrigérateur</i>		
- 1 jour	25	83,3
- 2 à 5 jours	5	16,7
✓ Conservation à la température ambiante	18	8,3
<i>Durée de conservation à la température ambiante</i>		
- 1 jour	12	66,7
- 2 à 5 jours	6	33,3
<b>Traitement d'<i>attiéké</i> avant consommation</b>		
<b><i>Chauffage à la vapeur d'eau</i></b>	<b>132</b>	<b>36,7</b>
- Si consommé le même jour d'achat	89	67,4
- Si conservé à la température ambiante	30	22,7
- Si conservé au réfrigérateur	13	9,8
<b><i>Absence de traitement thermique</i></b>	<b>228</b>	<b>63,3</b>
- Si consommé le même jour d'achat	223	97,8
- Si conservé à la température ambiante	5	2,2
- Si conservé au réfrigérateur	0	0,0
<b>Fréquence de consommation d'<i>attiéké</i> au cours des 3 principaux repas</b>		
Petit déjeuner	241	66,9
Déjeuner	228	63,3
Diner	175	48,6
<b>Lieux de consommation d'<i>attiéké</i></b>		
Domicile	189	52,5
Hors-domicile	171	47,5
- Restaurant	53	31,0
- "Maquis"	62	36,3
- "Garbadrôme"	21	12,3
- Autres lieux	35	20,5

**Tableau 56** : Fréquence de consommation d'*attiéké* à Abidjan

<b>Fréquence de consommation d'<i>attiéké</i></b>	<b>Nombre de consommateurs</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Fréquence de consommation d'<i>attiéké</i> par jour</b>		
Une fois par jour	173	48,1
Deux fois par jour	129	35,8
Trois fois par jour	56	15,6
Quatre fois par jour	2	0,6
<b>Fréquence de consommation d'<i>attiéké</i> par semaine</b>		
<b><i>Une à 6 fois par semaine</i></b>	<b>283</b>	<b>78,6</b>
Une fois par semaine	42	11,7
Deux fois par semaine	63	17,5
Trois fois par semaine	80	22,2
Quatre fois par semaine	44	12,2
Cinq fois par semaine	44	12,2
Six fois par semaine	10	2,8
<b><i>Quotidienne</i></b>	<b>77</b>	<b>21,4</b>
Charge moyenne en bactéries du groupe <i>B. cereus</i>	2,5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g	
Quantité d' <i>attiéké</i> consommé par jour par personne	296,3 ± 310 g/jour/personne	
Dose ingérée du groupe <i>Bacillus cereus</i>	7,4 x 10 <sup>4</sup> germes/jours/personne	
Probabilité de consommer de l' <i>attiéké</i> contaminé	21,6 %	

#### 6.1.2.5. Facteurs de risque et toxi-infections liées à la consommation d'*attiéké*

Aucun consommateur d'*attiéké* n'était malade lors des enquêtes mais des symptômes potentiels antérieurs associés à une toxi-infection alimentaire relative à la consommation d'*attiéké* ont été rapportés par 18,9 % des consommateurs d'*attiéké*. Les symptômes les plus évoqués sont la diarrhée (33,8 %), les douleurs abdominales (23,5 %) et les vomissements et nausées (17,6 %). Parmi les personnes qui ont déclaré avoir été malades à la suite de la consommation de l'*attiéké*, 27,9 % des cas ont été sévères avec une nécessité d'un arrêt de travail et 1,5 % a été très sévère avec une hospitalisation d'un à trois jours. Le temps entre la consommation d'*attiéké* et l'apparition des premiers signes de toxi-infection varie de 1 à 72 heures avec 23,5 % entre 1 à 6 heures, 14,7 % entre 7 et 18 heures et 61,8 % entre 19 à 72 heures. La majorité (70,6 %) des symptômes disparaissait en moins de 24 heures après l'apparition des premiers signes (**tableau 57**). La durée pour la disparition des symptômes est significativement liée à la sévérité de la maladie ( $p < 0,05$ ). La survenue de l'affection ou toxi-infection à l'issue de la consommation de l'*attiéké* est significativement liée à l'absence de traitement thermique ( $p < 0,05$ ) 3 jours après la production avec un risque relatif (RR) de 3,8 (IC 95 % : 1,9 – 7,4). L'apparition de toxi-infection est faiblement corrélée à la consommation d'*attiéké* non réchauffé ( $V = 0,235$  ; **tableau 58**). Ainsi, le risque de contracter une toxi-infection à l'issue de la consommation d'*attiéké* est 3,8 fois plus élevé chez les personnes qui consomment l'*attiéké* plus de 3 jours après la production sans le réchauffer que chez celles qui réchauffent l'*attiéké* avant sa consommation. La différence de risque (DDR) ou excès de risque qui exprime l'augmentation de l'incidence des toxi-infections chez les consommateurs d'*attiéké* non réchauffé par rapport à ceux qui le consomment avec un réchauffage adéquat est de 19,1 %. La fraction étiologique du risque (FER) qui est la proportion de malade parmi les consommateurs d'*attiéké* qui peut être évitée s'ils consomment tous l'*attiéké* parfaitement réchauffé à la vapeur d'eau est de 63,9 %.

La variété Garba (41,2 %) a été la plus incriminée dans les affections (**tableau 59**).

**Tableau 57** : Impact de la consommation d'*attiéké* sur la santé du consommateur

<b>Paramètres</b>	<b>Nombre de consommateurs (n = 360)</b>	<b>Pourcentage (%)</b>
<b>Conséquence de la consommation d'<i>attiéké</i> sur la santé</b>		
Non malade	292	81,1
Malades	68	18,9
Traitement thérapeutique	25	36,8
Absence de traitement thérapeutique	43	63,2
<b>Symptômes rapportés liés à la consommation d'<i>attiéké</i> (n = 68)</b>		
Diarrhée	23	33,8
Douleurs abdominales	16	23,5
Vomissements et nausées	12	17,6
Constipation	8	11,2
Fièvre	6	8,8
Maux de tête	3	4,4
<b>Délai d'apparition des symptômes rapportés par les consommateurs d'<i>attiéké</i></b>		
1 – 6 heures	16	23,5
7 - 18 heures	10	14,7
19 - 72 heures	42	61,8
<b>Durée des symptômes rapportés par les consommateurs d'<i>attiéké</i></b>		
< 24 heures	48	70,6
24 - 48 heures	19	27,9
> 48 heures	1	1,5
<b>Sévérité de la maladie</b>		
Maladie moins grave (continue de travailler)	48	70,6
Maladie sévère (reste à la maison)	19	27,9
Maladie très sévère (hospitalisation)	1	1,5

**Tableau 58** : Effet du traitement thermique de l'*attiéké* sur la survenue de l'affection

Mode de consommation	Nombre de personnes malades après consommation de l' <i>attiéké</i>	Nombre de personnes saines après consommation de l' <i>attiéké</i>	Total
Consommation de l' <i>attiéké</i>			
sans traitement thermique	59	169	228
Consommation de l' <i>attiéké</i>			
avec traitement thermique	9	123	132
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>292</b>	<b>360</b>

Khi deux de Pearson = 19,821  $p = 0,0005 < 0,05$  RR = 3,8

IC 95 % : [1,9 – 7,4],  $V = 0,235$  ; DDR = 19,1 % ; FER = 63,9 %

RR = risque relatif ; DDR = Différence de risque ; FER = Fraction étiologique du risque

**Tableau 59** : Variétés d'*attiéké* consommées par tous les malades

Variétés <i>attiéké</i>	Effectifs	Pourcentage (%)
Garba	28	41,2
<i>Attiéké</i>	17	25,0
Agbodjama	10	14,7
Ebrié	7	10,3
Adjoukrou	6	8,8
<b>Total</b>	<b>68</b>	<b>18,9</b>

## 6.2. Discussion

Le danger microbien étudié est constitué par le groupe *B. cereus* dont les espèces formellement identifiées sont *B. thuringiensis* et *B. cereus sensu stricto*. L'analyse de l'arbre de défaillance montre les événements qui mènent à une intoxication alimentaire due au groupe *B. cereus* suite à la consommation du lait ou de l'*attiéké*. La contamination du lait a lieu dans les fermes alors que celle de l'*attiéké* intervient sur les sites de production. Il s'ensuit une croissance des bactéries au cours du transport et de la vente à la température ambiante à des charges qui dépassent les limites acceptables au moment de l'achat.

L'enquête consommation du lait a révélé que 97,3 % des 188 personnes enquêtées achètent le lait pour la consommation. La consommation de lait est journalière chez 32,2 % des personnes. La consommation de lait ne fait généralement pas partie des habitudes alimentaires des ivoiriens. Cependant, dans notre étude, 50 % des consommateurs ivoiriens sont originaires du nord du pays. Les consommateurs de lait sont pour la plupart des musulmans (96,3 %) originaires du Mali et du Burkina Faso. En effet, le lait fait partie des habitudes alimentaires des peuples du Mali et du Burkina Faso. Les groupes ethniques des régions du nord de la Côte d'Ivoire consomment beaucoup plus le lait car ils partagent les mêmes traditions pastorales et les mêmes cultures que ceux du Mali et du Burkina Faso dont la consommation du lait fait partie de leur tradition (FAO, 1998). Par contre, 68,6 % des personnes utilisent le lait pour les rituels. Les rituels consistaient à distribuer du lait cru non chauffé avec des beignets ou du pain comme un cadeau aux membres de la famille et les voisins, en particulier les enfants tel que recommandé par la tradition musulmane ou par le marabout. Ces pratiques socio-culturelles ont aussi été rapportées par d'autres études précédentes, où offrir du lait aux enfants est une méthode de purification parce que les enfants sont considérés comme purs et saints (Fokou *et al.*, 2010). En effet, le lait cru représente dans les systèmes pastoraux une valeur sociale et nutritive. Il est à la fois une ressource, un produit à valeur d'usage et d'échange, un objectif de production animale et enfin une référence culturelle (Bonfoh *et al.*, 2002 ; FAO, 2009).

Le lait est toujours consommé cru sans traitement thermique bien que de nombreuses études aient démontré la présence dans le lait de microorganismes pathogènes pour l'homme. Les consommateurs dont la majorité est musulmane pensent qu'il n'y a pas de mauvais lait. Le lait cru est toujours de bonne qualité et ne peut jamais rendre malade : « *jamais, le lait ne peut rendre malade. Vraiment pour nous, le lait ne peut pas rendre malade* ». Pendant les discussions en groupe, certains consommateurs ont soutenu cette

idée : « *le lait est de bonne qualité dans la mesure où dans un premier temps nous même nous consommons le lait que nous vendons, ensuite depuis que nous commercialisons le lait, il n'y a jamais eu de plainte. Nous n'avons jamais reçu la visite d'un consommateur qui est venu se plaindre de la qualité du lait que nous vendons. Sinon, on ne peut pas dire que la nourriture que nous consommons n'est pas de bonne qualité* ». En effet, la population d'étude dont la majorité (96,3 %) est musulmane, considère le lait cru comme un produit naturel, car il n'a jamais été modifié en aucune façon ou n'a subi aucune modification. De nombreuses familles agricoles consomment le lait cru tout simplement parce que c'est une pratique traditionnelle et il est moins cher de prendre du lait à la ferme que d'acheter du lait pasteurisé au détail (**Oliver et al., 2005**). En outre, certains consommateurs de lait cru croient que le lait cru a une valeur nutritive plus élevée que le lait pasteurisé (**Hegarty et al., 2002**). Cette perception de la qualité du lait cru justifie le taux élevé (52,5 %) de la consommation de lait non bouilli, ni chauffé.

De plus, 23,5 % des consommateurs de lait n'ont pas été scolarisés tandis que la moitié (50 %) a un niveau primaire. Une étude menée par **Headrick et al. (1997)** a montré que les personnes qui ont moins d'un diplôme d'études secondaires étaient plus susceptibles de consommer du lait cru que celles qui avaient terminé leurs études secondaires ; ce qui suggère que le niveau d'éducation influence le choix d'une personne à consommer du lait cru ou non. Ainsi, la fréquence élevée de la consommation de lait non chauffé (au moins chez les consommateurs interrogés), les facteurs socioculturels et les mauvaises perceptions de la qualité du lait par les consommateurs (ne pas bouillir le lait, lait ne peut pas causer la maladie) contribuent, en général, à une augmentation du risque des maladies d'origine laitière, en particulier chez les enfants, considérés comme groupe à risque.

L'*attiéké* est consommé par toutes les couches sociales et par toutes les tranches d'âge. Tous les enquêtés consomment l'*attiéké* avec une consommation journalière chez 21,4 % des personnes parmi lesquels 48,1 % le consomment au moins une fois par jour. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par **Amani et Kamenan (2003)**. L'*attiéké* est consommé au cours des trois principaux repas de la journée avec une consommation de 66,9 % au petit déjeuner, 63,3 % au déjeuner et 48,6 % au dîner. Selon **Amani et Kamenan (2003)**, 30 % de la population abidjanaise préfèrent l'*attiéké* au petit déjeuner, 12 % au déjeuner et 15 % au dîner. La comparaison de ces résultats montre que la consommation de l'*attiéké* à Abidjan est en perpétuelle augmentation. En effet, l'*attiéké* est

un aliment disponible, à la portée de toutes les bourses à cause de son faible coût (par rapport aux autres dérivés du manioc) et de son caractère d'aliment prêt à consommer. En outre, il est devenu un aliment de plus en plus consommé dans les centres urbains africains où l'urbanisation rapide et les difficultés économiques ont favorisé l'augmentation du nombre de consommateurs (**Kouassi et al., 2008 ; Djéni et al., 2011 ; Sotomey et al., 2001**). De plus, l'éloignement des habitations des lieux de travail a encouragé la consommation d'aliment hors-domicile. Ainsi, l'*attiéké*, considéré comme un aliment prêt à consommer (**Djéni et al., 2011**) est consommé hors-domicile par 47,5 % des personnes enquêtées. Il est consommé au "maquis" (36,3 %), au restaurant (31 %) et au "garbadrôme" (12,3 %). Selon **Courade et al. (1988)**, l'*attiéké* peut être considéré comme un produit spécifique de la restauration. Sauf pour la population lagunaire et une partie des Akans gros consommateurs d'*attiéké*, l'introduction réelle de l'*attiéké* dans les modèles de consommation semble s'être opérée surtout par le biais de la restauration. De plus, 85,2 % des quantités totales d'*attiéké* produit à Abidjan sont consommées hors-domicile et représentent 23 % du budget alimentaire moyen des ménages urbains d'Abidjan. Le taux élevé de consommation hors-domicile de l'*attiéké* est dû en partie par la situation matrimoniale des consommateurs. En effet, 69,7 % des consommateurs d'*attiéké* à Abidjan sont célibataires.

La probabilité de consommer du lait contaminé par les bactéries du groupe *B. cereus* est 21,6 % contre 16,0 % pour l'*attiéké*. Ces résultats pourraient s'expliquer par la forte proportion d'échantillons dont les charges dépassent les limites acceptables. La dose de bactéries ingérées par jour/personne est  $3,5 \times 10^5$  germes et  $7,4 \times 10^4$  germes respectivement par la consommation de lait et d'*attiéké*. Ces fortes doses de bactéries ingérées s'expliquent par la régularité de consommation de ces denrées alimentaires et par les taux élevés de consommation de ces produits sans traitement thermique. Les fortes charges bactériennes des produits observées au point de vente, la fréquence de consommation et la quantité d'aliment consommé sont de potentiels facteurs de risque (**Sanaa et Cerf, 2002 ; Traoré, 2013**). La dose infectieuse est de  $10^5$  UFC/mL ou par g, mais des doses de  $10^3$  UFC/mL ou par g ont été rapportées dans les aliments associés à des épidémies (**EFSA, 2005 ; Arnesen et al., 2008**). Ainsi, le risque de l'exposition des personnes dans la communauté des consommateurs de lait ou d'*attiéké* aux bactéries pathogènes du groupe *B. cereus*, susceptibles de causer des toxi-infections chez l'homme par la consommation de lait cru ou d'*attiéké* non réchauffé peut être élevé. Par conséquent, le lait et l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan sont considérés comme des

aliments du groupe de risque 2 en tenant compte des fortes concentrations, des fortes doses ingérées par le consommateur régulier de lait ou d'*attiéké* et du taux élevé de consommateurs de lait cru et d'*attiéké* non réchauffé.

Aucune personne n'était malade lors des enquêtes mais des symptômes potentiels antérieurs associés à une toxi-infection alimentaire relative à la consommation du lait ou d'*attiéké* ont été rapportés par 12,6 % des consommateurs de lait, et par 18,9 % des consommateurs d'*attiéké*. Les symptômes les plus évoqués par les consommateurs de lait et d'*attiéké* ont été la diarrhée et les douleurs abdominales. Parmi les malades, des cas graves qui ont nécessité un arrêt de travail et des cas d'hospitalisation d'un à trois jours ont été rapportés par les consommateurs. Ces résultats sont similaires aux résultats d'autres études (**Dierick *et al.*, 2005; Dromigny, 2008; Oliver *et al.*, 2005**) qui ont rapportées des douleurs abdominales, des crampes et la diarrhée comme les principaux symptômes des syndromes diarrhéiques provoqués par la consommation d'aliments contaminés par *B. cereus*. Parfois, les maladies signalées dues au groupe *B. cereus* ont été graves, nécessitant une hospitalisation et entraînant parfois même la mort du malade (**Dierick *et al.*, 2005; Dromigny, 2008 ; Banerjee *et al.*, 2011 ; Merzougui *et al.*, 2014**). La consommation du lait cru ou de l'*attiéké* sans traitement thermique a été significativement associée à l'apparition de gastro-entérites ou toxi-infections. L'association entre le lait cru d'une part et les aliments prêts à consommer d'autre part et les toxi-infections alimentaires a été rapportée par plusieurs auteurs (**Belomaria *et al.*, 2007 ; Rosenquist *et al.*, 2005 ; Jonkuvienė *et al.*, 2012**). Malgré cela, il est difficile d'établir une relation directe entre la consommation de lait ou d'*attiéké* et les affections rapportées par les malades car les symptômes évoqués par les malades ne sont pas spécifiques au groupe *B. cereus*. En effet, le groupe *B. cereus* est responsable de deux types de syndrome de toxi-infections alimentaires distincts. Le syndrome émétique, une intoxication alimentaire semblable à l'intoxication due à *Staphylococcus aureus* et le syndrome diarrhéique, une toxi-infection similaire à l'infection alimentaire produite par *Clostridium perfringens* (**Dromigny, 2008**). Cependant, la consommation du lait et de l'*attiéké* dans les conditions décrites dans notre étude n'est pas sans conséquence sur la santé des consommateurs.

L'évaluation du risque n'est pas allée à son terme à cause du manque d'informations sur la relation dose/réponse. Malgré les quantités élevées de lait cru ou d'*attiéké* non réchauffé après plusieurs jours de vente, consommées quotidiennement, les

toxi-infections alimentaires collectives déclarées sont relativement rares. De plus, il n'y a eu aucun cas avéré de toxi-infections à Abidjan lié à la consommation de lait ou d'*attiéké* au cours de notre étude. En outre, il est probable que de nombreux cas ne soient pas signalés car les infections sont bénignes et disparaissent d'elles-mêmes en moins de 24 h. En effet, dans les pays en développement, comme la Côte d'Ivoire, les personnes présentant des toxi-infections se rendent rarement à l'hôpital à cause du manque de couverture médicale et de la pauvreté (FDA, 2012 ; Kouamé-Sina, 2013). Cependant, faisant le rapprochement entre le caractère multi-toxinogène des souches du groupe *B. cereus* isolées du lait et de l'*attiéké*, les symptômes évoqués par les malades, les fortes concentrations des produits au point de vente et le taux élevé de consommateur de produits crus ou non réchauffés, le lait et l'*attiéké* sont considérés comme des aliments du groupe de risque 2 pour le consommateur et le groupe *B. cereus* sont l'une des causes probables.

Les variétés Garba (41,2 %) et *attiéké* (25 %) ont été les plus incriminées dans les affections. En effet, ces deux variantes de l'*attiéké* ont été rapportées par certains auteurs comme de l'*attiéké* de moins qualité obtenu par raccourcissement du processus normal de fabrication de l'*attiéké* (Djéni, 2009 ; Heuberger, 2005).

### **Conclusion partielle**

La consommation de lait cru ou de l'*attiéké* sans aucun traitement thermique augmente la probabilité d'ingérer les agents pathogènes d'origine alimentaires dont le groupe *B. cereus*. Cependant, au stade de cette étude, il n'est pas possible d'établir une relation directe de cause-effet entre la consommation du lait ou de l'*attiéké* et les affections rapportées par les consommateurs. Mais, compte tenu des similitudes observées au niveau des symptômes rapportés, du caractère multi-toxinogène des souches du groupe *B. cereus* isolées, le lait et l'*attiéké* peuvent être considérés comme des aliments du groupe de risque 2 pour le consommateur, et le groupe *Bacillus cereus* est l'une des causes possibles. Afin d'éviter la survenue d'incident grave sur la santé de la population consommatrice de ces aliments, il est impérieux d'adopter des mesures efficaces pour réduire le niveau de contamination du lait et de l'*attiéké* ou le niveau de consommation de produits pouvant présenter un risque de toxi-infections.

---

## 7. GESTION DES RISQUES DE CONSOMMATION DE LAIT OU D'ATTIÉKÉ CONTAMINÉ PAR LE GROUPE *B. CEREUS*

### 7.1. Résultats

#### 7.1.1. Réduction du risque de consommation de lait contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

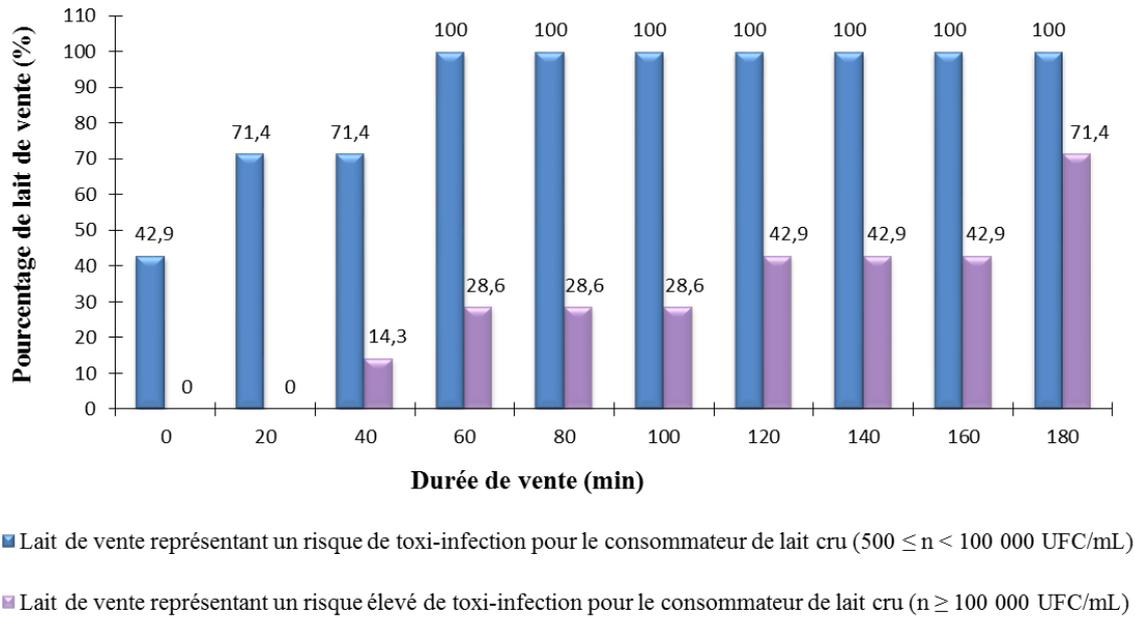
Au cours de la vente du lait à la température ambiante, les espèces du groupe *B. cereus* croissent augmentant ainsi le risque de provoquer des toxi-infections (**figure 21**). L'estimation de la charge au cours de la vente a permis de déduire qu'au bout de 60 minutes de vente, tous les laits de vente contaminés sont de qualité microbiologique insatisfaisante avec un risque pour la santé du consommateur. À la 40<sup>ème</sup> de vente à la température ambiante (25-30 °C), la proportion de lait cru sans traitement thermique représentant un risque élevé de toxi-infection pour le consommateur a été estimée à 14,3 %. Ces résultats permettent d'estimer le délai limite de vente du lait à la température ambiante à 40 minutes. Au-delà de ce temps, un réchauffage du lait avant toute consommation est recommandé.

La fraction étiologique chez les consommateurs de lait non chauffé c'est-à-dire la proportion de toxi-infection liée à la consommation de lait non chauffé est 61,5 %. En tenant compte de la proportion de personnes consommant le lait non chauffé (52,5 %), la fraction étiologique du risque c'est-à-dire la proportion de toxi-infection dans la population générale qui pourrait être évitée si toutes les personnes consommaient le lait chauffé est de 45,1 %. Ainsi, si tous les consommateurs consomment le lait chauffé jusqu'au point d'ébullition, 10 des 23 cas de toxi-infections rapportés dans la population des consommateurs de lait cru auraient été évités.

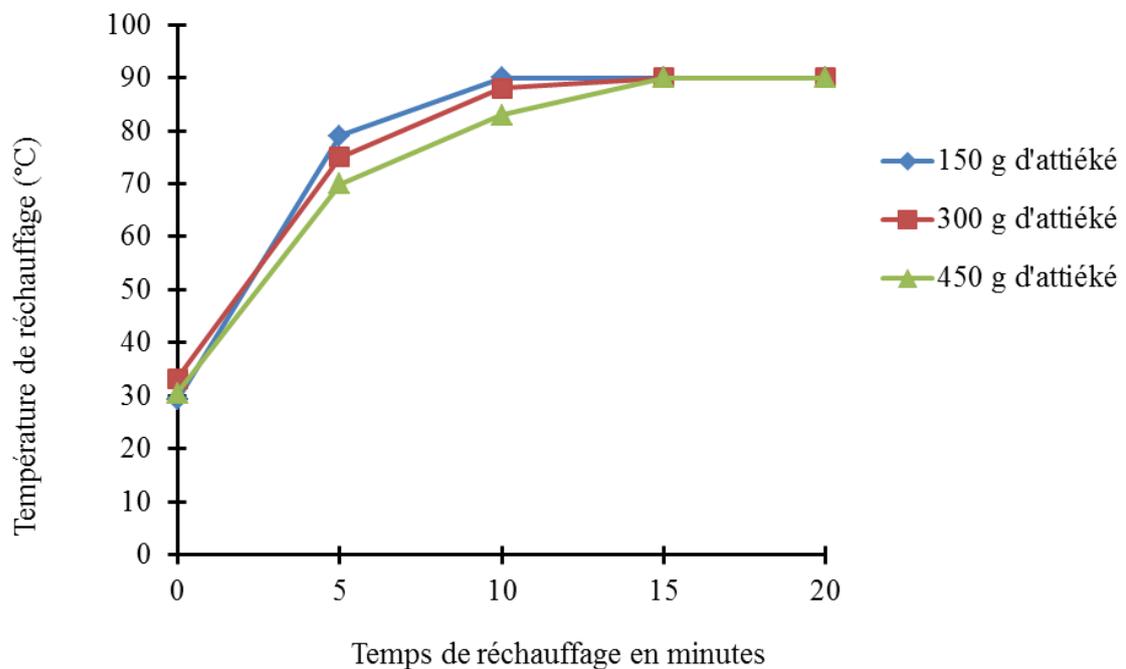
#### 7.1.2. Réduction du risque de consommation d'attiéké contaminé par le groupe *Bacillus cereus*

##### 7.1.2.1. Température de réchauffage de l'attiéké

La température maximale atteinte par l'attiéké au cours du réchauffage a été de 90 °C pour des quantités d'attiéké variant de 150 à 450 g. Cette température a été atteinte en moyenne entre 10 et 15 min de réchauffage et a varié en fonction de la quantité d'attiéké dans le couscoussier. Pour 150 g, 300 g et 450 g d'attiéké, la température de réchauffage a atteint en 5 min respectivement 78, 75 et 70 °C. Ces températures sont passées après 10 min à respectivement 90, 88 et 80 °C. À la 15<sup>ème</sup> minute, toutes les températures se sont stabilisées à 90 °C (**figure 22**).



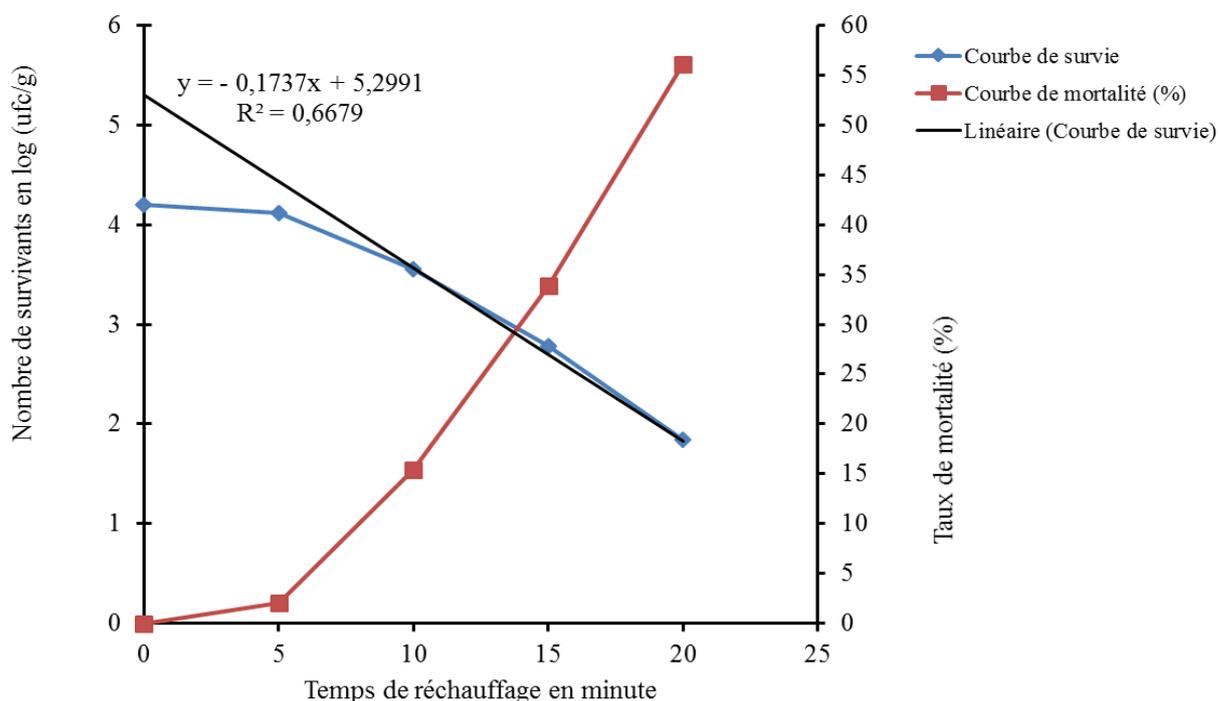
**Figure 21 :** Proportion de lait de vente susceptible de provoquer une toxi-infection au cours de la vente à la température ambiante



**Figure 22 :** Courbe de variation de la température au cours du réchauffage d'attiéké selon la quantité

### 7.1.2.2. Thermorésistance du groupe *B. cereus* au cours du réchauffage de l'attiéké à 90 °C

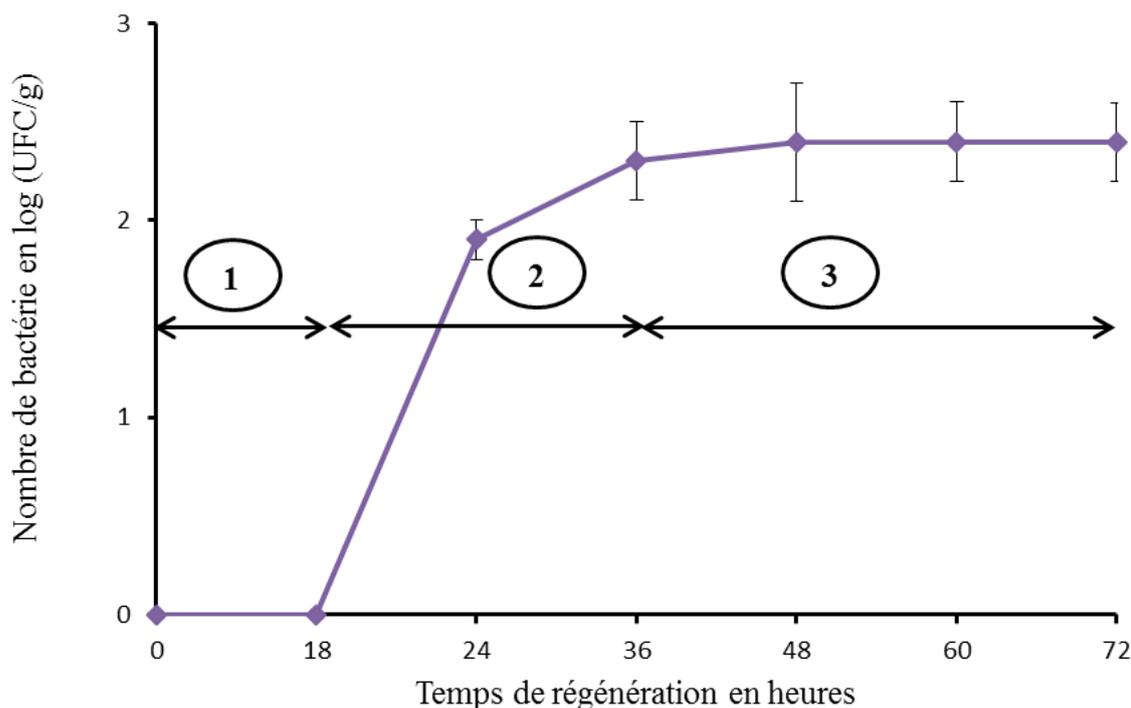
La courbe de survie ou de destruction thermique à 90 °C avait une forme concave orientée vers le bas (**figure 23**). L'expression de la cinétique de survie des spores du groupe *B. cereus* était de forme non log linéaire avec une phase d'adaptation moyenne d'une durée de 5 minutes, suivie d'une phase de destruction massive à partir de la cinquième minute. Le taux de mortalité qui était de 2,1 % les cinq premières minutes de réchauffage hydrothermique, a augmenté rapidement pour atteindre un taux de mortalité maximum de 56,1 % à la vingtième minute. La charge moyenne des survivants était alors de  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g) [min = 1,3 log (UFC/g) ; max = 2,4 log (UFC/g)]. Le temps de réduction décimale (D) des bactéries du groupe *B. cereus* au cours du réchauffage de l'attiéké a été de  $8,5 \pm 1,9$  min. Il a été calculé à partir de l'analyse de la régression parcellaire des meilleurs ajustements de la partie linéaire de la courbe de survie. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de la courbe de tendance du temps de réduction décimale des spores du groupe *B. cereus* dans l'attiéké soumis au réchauffage hydrothermique a été de 0,67.



**Figure 23 :** Courbe de survie et de mortalité à 90 °C des bactéries du groupe *Bacillus cereus* au cours du réchauffage de 150 g d'attiéké

### 7.1.2.3. Régénération du groupe *B. cereus* après réchauffage de l'*attiéké* à 90 °C

La courbe de régénération des bactéries du groupe *B. cereus* après 15 min de réchauffage de l'*attiéké* à 90 °C avait une allure sigmoïde (**figure 24**). La croissance du groupe *B. cereus* après le réchauffage a montré un temps de latence variant de 18 à 24 heures à partir d'une charge initiale de 4,2 log (UFC/g) d'*attiéké*, permettant de déduire que le délai limite maximal de consommation sans risque de l'*attiéké* réchauffé était de 18 h. La phase de latence était suivie d'une phase de croissance exponentielle qui variait entre 18 et 36 h de culture, caractérisée par un taux de croissance maximale de 2,042 germes/h [0,083 – 4,1 germes/h] et d'un temps de génération de 17 h. La croissance du groupe *B. cereus* s'est ralentie après 36 h de culture, aboutissant à une phase stationnaire qui a commencé lorsque la population microbienne a atteint une concentration maximale de 2,4 log (UFC/g) d'*attiéké* et un taux de germination de 0,063 germes/h. Cette charge en *B. cereus* correspondait à des doses non toxiques.



(1) Phase de latence, (2) Phase de croissance exponentielle, (3) Phase stationnaire

**Figure 24 :** Courbe de régénération du groupe *Bacillus cereus* dans l'*attiéké* après 15 minutes de réchauffage à 90 °C

## 7.2. Discussion

Dans le but d'atténuer le risque pour le consommateur, des stratégies ont été déterminées pour diminuer la consommation de lait ou d'*attiéké* représentant un risque pour le consommateur. La première option a consisté à déterminer le délai limite de vente du lait avec comme point de mire la préconisation du chauffage avant toute consommation si les bonnes pratiques de production et d'hygiène ne peuvent pas être assurées ou ne peuvent pas assurées la qualité du produit. La seconde option a consisté à évaluer l'effet du traitement hydrothermique de l'*attiéké* sur la survie du groupe *B. cereus*.

La valorisation du lait local en Côte d'Ivoire passe nécessairement par des stratégies d'assainissement de l'environnement des animaux, de prophylaxie et d'asepsie permanentes de l'ensemble du personnel et du matériel impliqué dans le processus de production du lait donc de l'intégration des bonnes pratiques d'hygiène de la ferme au point de vente (N'goran *et al.*, 2013). Selon De Reu *et al.* (2004) les améliorations en termes d'hygiène ont résulté en la production en routine de lait de bovins contenant moins de  $2,0 \times 10^4$  de germes totaux par millilitre. Cependant, un lait cru de bonne qualité, avec une teneur en germes totaux en-dessous d'une valeur limite, n'est pas nécessairement indemne d'agents pathogènes dangereux pour la santé humaine. À cause de sa haute valeur nutritionnelle, son pH neutre et son activité de l'eau élevée, le lait cru est un excellent milieu de culture pour certains microorganismes. Ainsi, le lait de vente est fortement contaminé au point de vente avec un risque pour la santé du consommateur. Au cours de la vente du lait à la température ambiante, les bactéries du groupe *B. cereus* croissent et le nombre de lait susceptible de provoquer des toxi-infections augmente, exposant davantage le consommateur de lait cru. Après 40 minutes de vente, 14,3 % des laits de vente ont présenté un risque élevé pour la santé du consommateur de lait cru permettant de déduire que le lait arrivant au point de vente à partir de 7 h doit être chauffé avant toute consommation après 40 minutes de vente à la température ambiante.

Le traitement thermique est jusqu'à présent le moyen le plus utilisé et le plus efficace pour augmenter la sécurité microbiologique du lait, sans modifier substantiellement sa valeur nutritionnelle, ni réduire les autres bénéfices associés à la consommation de lait cru (AFSCA, 2011). Le consommateur peut facilement obtenir le même effet en chauffant le lait jusqu'à la température d'ébullition. Dans cette étude, avec la stratégie de chauffer le lait jusqu'à la température d'ébullition avant toute consommation par le consommateur à domicile, les toxi-infections liées à la consommation de lait cru non

chauffé qui pourraient être évitées dans la population générale ont été estimées à 45,1 %. Ainsi, le chauffage du lait jusqu'à la température d'ébullition avant toute consommation est une condition non négociable, mais doit intégrer la promotion des bonnes pratiques d'hygiène de la ferme au point de vente afin de préserver la santé du consommateur.

La seconde option de gestion du risque utilisée a été la réduction de la charge bactérienne par le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké*. Le dispositif utilisé pour le réchauffage de l'*attiéké* de plus de 3 jours après la production est simple, peu coûteux pour les ménagères et les vendeurs et disponible dans plusieurs foyers. L'étude a permis d'évaluer scientifiquement l'efficacité de cette technique de traitement traditionnelle de l'*attiéké*, en termes de garantie de la sécurité sanitaire, relativement au groupe *B. cereus*. En effet, le suivi de la destruction des contaminants (*B. cereus*) en fonction de la température et du temps de réchauffage de l'*attiéké*, comportait deux phases. La première, caractérisée par une variation de température passant de celle de l'*attiéké* (température de l'environnement, 25 °C) à 90 °C, n'induit qu'une faible réduction (0,1 log UFC/g) de la flore. Cette situation peut être expliquée en considérant la conjonction de plusieurs facteurs. Une évolution de température appliquée entre 25 et 90 °C dans un temps réduit, ne peut être destructrice de façon sensible, ni de la flore végétative, ni des spores du groupe *B. cereus*. Le temps d'évolution vers la température d'équilibre peut être lié à l'intensité de la source de chaleur, à la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier (capacité), à la structure de la matière en termes de conductivité de la chaleur à destination des souches cibles (Bahrani 2012 ; Zarguili *et al.*, 2006).

Il en résulte que cette première phase présente peu d'intérêt dans la réduction du risque de contamination relativement à *B. cereus*. La deuxième phase, isotherme, s'est poursuivie jusqu'à la fin de la durée de réchauffage et a induit une réduction de la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. La vapeur d'eau, apportée par la chaleur au cours du réchauffage, augmente la teneur en eau résiduelle de l'*attiéké* jusqu'à une teneur d'équilibre correspondant au regorgement d'eau des interstices. Par conséquent, tout apport de chaleur n'influence plus la variation de la température qui se stabilise à 90 °C après un temps moyen de réchauffage hydrothermique de 15 min. Selon, Bahrani (2012), la température de la vapeur d'eau dans le matériau, la durée du réchauffage et la teneur en eau du produit sont les paramètres qui contrôlent le réchauffage hydrothermique. L'épaisseur de la couche d'*attiéké* donc la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier influence

quant à elle l'homogénéité du réchauffage hydrothermique. Il se crée un gradient de température d'autant plus important que l'épaisseur de la couche du produit est importante, mais qui disparaît pour des temps de réchauffage hydrothermique plus longs (**Zarguili et al., 2006**).

Le profil de destruction des germes à 90 °C n'a pas été linéaire au cours des premières minutes du réchauffage. La cinétique de destruction thermique obtenue, avec une forme concave orientée vers le bas et un épaulement, résulte d'une part, d'une activation de la population microbienne avant leur destruction. D'autre part, la présence d'épaulement s'explique notamment par l'agrégation et l'hétérogénéité de résistance ou à la diversité de réponse des spores à un traitement thermique (**Couvert, 2002**) illustrée par la valeur du coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,67$ ). Pour ce type de cinétique, la destruction commence lentement puis s'accélère au cours du réchauffage hydrothermique. Ceci s'explique par le fait que pour permettre leur germination, certaines spores nécessitent une activation qui peut être engendrée par un choc physique, tel que le choc thermique.

La température du réchauffage hydrothermique a un effet sur la germination du genre *Bacillus*. Ainsi, le pourcentage de spores germées diminue lorsque la température augmente. Les spores s'affaiblissent et se fragilisent lorsque des températures et des durées importantes leur sont appliquées. **Levinson et Hyatt (1970)**, travaillant sur l'activation de *Bacillus megaterium*, ont observé une meilleure capacité d'activation à certaines températures de traitement. Cette capacité d'activation est optimale entre 62 et 78 °C avec un taux de germination maximal obtenu entre 64 et 68 °C. Cependant, ces auteurs ont enregistré une diminution du taux de germination et une augmentation du temps de latence lorsque la température était supérieure à 68 °C. Nos résultats concordent avec ces différentes observations lorsque l'*attiéké* est réchauffé à 90 °C avec un temps de latence de variant entre 18 et 24 h. Ces résultats pourraient s'expliquer par un phénomène de rupture de liaisons au sein de la paroi de la spore grâce à l'énergie fournie par le traitement hydrothermique. Les cibles de ce phénomène de rupture seraient des enzymes lytiques impliquées dans le processus de dégradation du peptidoglycane qui conduit à la réhydratation et par conséquent à la germination de la spore (**Leuschner et Lillford, 1999**).

La germination ou non de la spore est aussi influencée par la température de traitement et par la composition de la matrice alimentaire. En effet, l'amidon, constituant

majoritaire de l'*attiéké*, gélatinisé sous l'effet de la chaleur, retarde ou diminue la germination de la spore (Gonzalez *et al.*, 2007).

Par ailleurs, les spores du groupe *B. cereus* n'ont pas montré un fort potentiel de croissance dans l'*attiéké* après le réchauffage hydrothermique à 90 °C pendant plus de 15 min. La population du groupe *B. cereus* n'a pas excédé la concentration seuil de 5 log (UFC/g) fixée dans les normes, ni celle de 3 log (UFC/g) rencontrée dans certaines épidémies, avec un temps de latence de variant de 18 à 24 h. Le réchauffage hydrothermique réduit la charge de l'*attiéké* en *B. cereus* mais aussi élimine la flore de contamination responsable de gastro-entérites. Le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé est de 18 h.

L'augmentation de l'incidence des toxi-infections chez les consommateurs d'*attiéké* non réchauffé par rapport à ceux qui le consomment avec un réchauffage adéquat est de 18,5 %. En effet, parmi les consommateurs d'*attiéké* non réchauffé qui ont contracté une toxi-infection, un certain nombre l'aurait contracté, même si elles n'avaient pas consommés l'*attiéké* non réchauffé. Le réchauffage adéquat de l'*attiéké* en vente avant toute consommation par le consommateur à domicile permet d'estimer les toxi-infections liées à la consommation d'*attiéké* qui pourraient être évitées à 51,4 %.

Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* n'est pas une innovation, mais c'est une technique utilisée par les ménagères et les commerçantes pour réchauffer l'*attiéké* plus de 3 jours après la production. Il nécessite un dispositif constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. Ce dispositif est disponible dans tous les foyers. La technique de réchauffage de l'*attiéké* est très simple et n'est pas coûteuse pour les ménages et les vendeurs.

### **Conclusion partielle**

La température maximale atteinte par l'*attiéké* au bout de 15 min de réchauffage hydrothermique est 90 °C pour des quantités d'*attiéké* variant de 150 à 450 g. Elle est fonction de la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier. Les spores du groupe *B. cereus* n'ont pas montré un fort potentiel de croissance dans l'*attiéké* après un réchauffage hydrothermique à 90 °C pendant plus de 15 min pour des quantités d'*attiéké* variant de 150 à 450 g. Le traitement thermique, est une pratique qui peut permettre de réduire le risque de consommation du lait et d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus*. L'*attiéké* de plus

de 2 à 3 jours après la production, peut être régénéré par réchauffage, basé sur un réchauffage hydrothermique de 90 °C pendant au moins 15 minutes, qui réduit la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [de 4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. Le délai limite de vente du lait à la température ambiante est de 40 minutes tandis que le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé est de 18 h. Le réchauffage adéquat de l'*attiéké* en vente avant toute consommation par le consommateur à domicile permet d'éviter au moins 51,4 % des toxi-infections dont il en est la cause. Il est donc recommandé de chauffer le lait jusqu'à la température d'ébullition avant toute consommation et de réchauffer l'*attiéké* pendant au moins 15 min et le consommer dans un délai de 18 h. La technique est si simple et n'est pas coûteuse pour les ménages et les vendeurs.

---

## 8. COMMUNICATION DES RISQUES DE CONSOMMATION DE LAIT OU D'ATTIÉKÉ CONTAMINÉ PAR LE GROUPE *B. CEREUS*

La communication sur les risques liés à la consommation du lait local ou de l'*attiéké* s'est effectuée tout au long du processus d'analyse des risques par un procédé interactif d'échanges d'informations et d'opinions entre notre équipe de recherche, les éleveurs, les vendeurs et les parties prenantes de la filière laitière ou de la filière *attiéké* à Abidjan au cours des discussions en groupe.

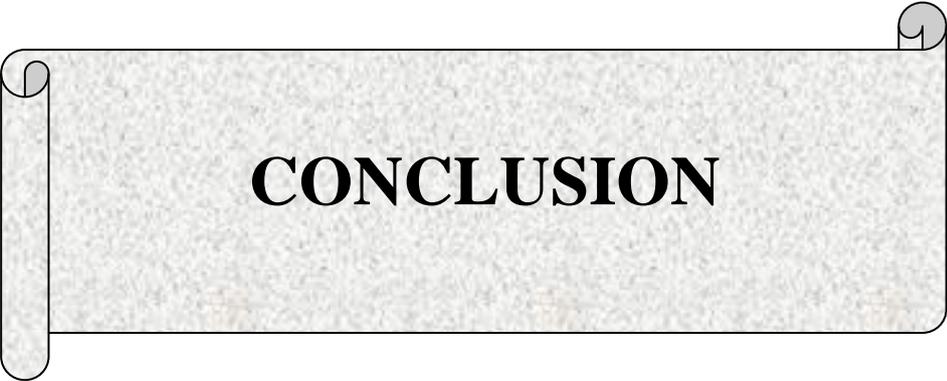
Cet échange d'informations a été d'abord réalisé lors de l'atelier du 29 Janvier 2009 organisé par le projet « *Safe Food Fair Food* phase 1 » sur « l'analyse situationnelle de la gestion de la sécurité sanitaire des denrées alimentaires d'origine animale en Côte d'Ivoire ». Cet atelier a rassemblé les acteurs gouvernementaux, les techniciens d'élevage et les organismes en charge de la sécurité sanitaire des aliments en Côte d'Ivoire. De plus, au cours des focus group et de l'enquête sur les habitudes et les modes de consommation du lait à Abidjan, les producteurs, les vendeurs et les consommateurs ont été sensibilisés sur les dangers présents dans le lait local, sur les pratiques à risques à proscrire, les bonnes pratiques d'hygiène et sur le chauffage systématique du lait avant toute consommation. Un colloque national a été aussi organisé du 2 au 4 Juin 2010 au CSRS sur le thème « Analyse participative des risques des denrées alimentaires d'origine animale ». Ce colloque avait pour ambition de faire le bilan de l'analyse des risques et de partager les expériences. C'était un espace de réflexion sur les cadres réglementaires, les stratégies nationales et les outils d'une meilleure pratique de l'analyse des risques dans la production des aliments en vue de réduire les risques de maladies chez les populations et améliorer l'accès au marché.

La deuxième voie de communication sur les risques a été la participation à des conférences nationales et internationales où des communications orales et des posters ont été présentés. Au total, six communications ont été dites dont trois orales et trois posters. Aussi, un cours a-t-il été dispensé au bénéfice des scouts sur le thème « L'*attiéké* mal conservé et mal réchauffé peut provoquer des maux de ventre, diarrhées, vomissements et nausées ».

Le troisième niveau de communication sur les risques a été la rédaction d'articles dans les newsletters (N° 4 – CSRS, 2013), dans les journaux à comité de lecteur, la rédaction de chapitres de livre (*Food Safety and informal Markets – Animal products in Sub-Saharan Africa*) et report dans les journaux.

Dans cette étude, l'évaluation des risques n'a pas été complète à cause du manque de données pour établir la relation dose/réponse. De plus, des données sur la cytotoxicité des isolats étudiés s'avèrent nécessaire pour bien apprécier leur potentiel de pathogénicité. Cependant, cette étude présente plusieurs avantages qui sont :

- l'utilisation d'une approche inter et transdisciplinaire impliquant la microbiologie, la biologie moléculaire, l'épidémiologie et la sociologie ;
- l'utilisation de la méthode participative en complément à l'évaluation classique des risques.
- l'utilisation de la méthode déterminisme pour les estimations ;
- la détermination du délai limite de vente de lait cru à la température ambiante ;
- la détermination du délai limite de consommation de l'*attiéké* réchauffé.
- l'utilisation du réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* pour réduire à la consommation, la charge bactérienne de l'*attiéké* à des concentrations non toxiques et par conséquent, réduire le risque de toxi-infections alimentaires lié à la consommation de l'*attiéké*, qui coûte très cher à l'État de Côte d'Ivoire.



# **CONCLUSION**

---

L'étude est la première en Côte d'Ivoire, du point de vu de l'évaluation des risques possibles sur la santé du consommateur, liés à la consommation du lait ou de l'*attiéké* contaminés par le groupe *Bacillus cereus* à Abidjan et à réduire le risque de consommer du lait ou de l'*attiéké* contaminé.

Le lait et l'*attiéké* consommé à Abidjan sont produits et vendus dans des conditions d'hygiène précaire. La précarité sanitaire des fermes, de l'environnement de traite ou des zones de production d'*attiéké* et les nombreuses manipulations après la traite ou après la cuisson contribuent fortement à la contamination du lait ou de l'*attiéké* par le groupe de *B. cereus*. Le lait et l'*attiéké* sont fortement contaminés respectivement tout le long de la chaîne de production à la commercialisation et des zones de production aux marchés de vente par des souches de *Bacillus cereus* multi-toxigéniques et multirésistantes aux antibiotiques utilisés dans le traitement des toxi-infections alimentaires. Les espèces formellement identifiées sont *B. thuringiensis* (41,9 %) et *B. cereus sensu stricto* (36,0 %) et 38 (22,1 %) isolats du groupe *B. cereus* provenant du lait n'ont pas pu être identifiés.

Tous les gènes mis en évidence, en dépit du gène *ces*, sont impliqués dans l'étiologie du syndrome diarrhéique. D'une part, l'environnement, la peau des mamelles des vaches laitières et l'eau de robinet conservée dans la barrique de l'éleveur, utilisée pour la traite sont les principales sources de contamination du lait, tandis que les mains des trayeurs et les ustensiles sont les sources secondaires de contamination du lait par le groupe *B. cereus*. D'autre part, l'environnement, l'air et l'eau utilisée sur les sites de production sont les sources de contamination de l'*attiéké*.

La mauvaise perception de la qualité du lait par les consommateurs, les pratiques coutumières et socioculturelles ainsi que les pratiques frauduleuses des vendeurs contribuent à la consommation de lait contaminé.

L'*attiéké* de plus de 2 à 3 jours après la production, peut être régénéré par réchauffage, basé sur un réchauffage hydrothermique de 90 °C pendant au moins 15 minutes, qui réduit la charge initiale en *B. cereus* de 4,2 à 1,8 log (UFC/g) et la durée moyenne pour réduire la concentration initiale de 90 % est de 8,5 min ± 1,9 min ( $D_{90\text{ °C}} = 8,5 \pm 1,9$  min) pour des quantités d'*attiéké* variant de 150 à 450 g. Le réchauffage adéquat de l'*attiéké* en vente avant toute consommation par le consommateur à domicile permet d'éviter au moins 51,4 % des toxi-infections dont il en est la cause.

La durée maximale de vente du lait à la température ambiante est de 40 min alors que le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé à 90 °C est de 18 h.

Le lait et l'*attiéké* représentent un risque modéré pour le consommateur et le groupe *B. cereus* est l'une des causes probables. Par conséquent, des mesures devraient être prises pour améliorer la qualité du lait ou de l'*attiéké* en vue de protéger la santé du consommateur. Ces mesures doivent prendre en compte les systèmes de surveillance de la qualité et inciter les acteurs et toutes les parties prenantes à respecter les normes de qualité. Ainsi, comme le lait et l'*attiéké* jouent un rôle important dans la nutrition humaine et dans la lutte contre l'autosuffisance alimentaire, et fournissent des ressources financières importantes aux acteurs, des précautions sont nécessaires pour assurer que les mesures prises pour améliorer la qualité ne compromettent pas ces avantages. Ainsi, il est formellement recommandé de chauffer le lait jusqu'au point d'ébullition ou de réchauffer l'*attiéké* à la vapeur d'eau pendant au moins 15 min à 90 °C avant toute consommation, si les bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication ne peuvent pas garantir la sécurité de ces aliments. Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* est une pratique traditionnelle courante, simple et peu coûteuse pour les acteurs de la filière, mais utilisée de façon empirique et non maîtrisée. L'évaluation de l'efficacité et de l'optimisation de cette technique dans cette étude contribuent à la préservation de la santé du consommateur, par la réduction du risque de consommation du lait et de l'*attiéké* contaminé par *Bacillus cereus* à des doses toxiques.



# **RECOMMENDATIONS**

Le lait et l'*attiéké* produits et vendus sur les marchés informels à Abidjan sont des aliments du groupe de risque 2 pour le consommateur. Au cours du processus de production et de vente, des stratégies pour réduire le risque doivent être mises en œuvre pour réduire leur contamination par les microorganismes en général et par le groupe *Bacillus cereus* en particulier.

En effet, le package d'hygiène comme proposé par Bonfoh *et al.*, (2006) et Oliver *et al.*, (2005) doit être appliqué. La meilleure pratique dans le contexte du marché informel est l'amélioration des conditions d'hygiène, le traitement thermique et la fermentation. Les acteurs doivent donc être formés et éduqués à la pratique de l'hygiène.

Sur la base des résultats obtenus, il est recommandé :

Aux producteurs de lait :

- s'assurer de la bonne santé des animaux produisant du lait par un suivi sanitaire approprié ;
- appliquer les substances et les médicaments vétérinaires conformément aux prescriptions et respecter les délais d'attente requis ;
- s'inscrire dans un programme de prophylaxie ;
- veiller à ce que les pratiques de traite n'entraînent pas de contamination du lait ;
- jeter le lait des animaux malades ou sous traitement médicamenteux ;
- veiller à ce que les ustensiles de traite soient correctement lavés et désinfectés ;
- laver et désinfecter les mamelles de chaque vache avant la traite ;
- se laver les mains avant la traite et d'une vache à une autre ;
- veiller à un approvisionnement convenable en eau potable ;
- faire en sorte que l'eau de boisson des animaux soit de bonne qualité ;
- veiller à maintenir propre le lieu de la traite et que les trayeurs suivent bien les règles de base d'hygiène ;
- mettre en place un système de refroidissement rapide du lait après la traite ;
- s'assurer que les déchets sont stockés de façon à réduire au minimum le risque de pollution de l'environnement ;

Aux vendeurs de lait :

- éviter le mélange du lait provenant de fermes différentes ;
- entreposer le lait de vente dans des glacières contenant de la glace au cours de la vente ;
- bien laver et désinfecter les ustensiles de vente du lait ;

Aux services sanitaires :

Améliorer l'encadrement des acteurs de la filière laitière traditionnelle par une initiation aux Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) et aux Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) liées à la conduite et à la propreté des animaux, de leur environnement et la salubrité de la traite et de la production de l'*attiéké*.

Aux producteurs d'*attiéké* :

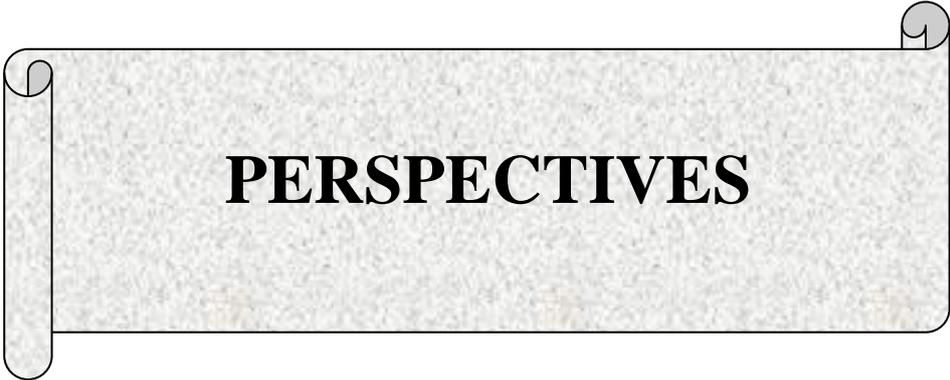
- laver et désinfecter les ustensiles avant toute réutilisation pour éviter la formation de biofilm ;
- sécher la semoule d'*attiéké* sur des claies en hauteur pour éviter la contamination par la poussière et le sol ;
- utiliser les foyers améliorés avec utilisation du gaz butane comme combustible ;
- utiliser des récipients en inox ou à défaut en aluminium à la place des bassines en plastique pour éviter la formation de biofilms.
- procéder au conditionnement immédiat de l'*attiéké* fraîchement préparé sous vide dans des emballages alimentaires pour éviter les manipulations multiples au cours de la vente.
- Améliorer l'environnement de production de l'*attiéké* par la création d'espaces aménagés.

Aux consommateurs de lait et d'*attiéké* :

- chauffer le lait jusqu'au point d'ébullition avant toute consommation et le consommer le plus tôt possible, sinon le réfrigérer ;
- si l'*attiéké* est consommé plus de 2 jours après la production, le réchauffer à la vapeur d'eau et le consommer le même jour dans un délai limite maximal de 18 h.

Aux ONG et les services de normalisation:

- organiser et former les producteurs d'*attiéké* sur les règles d'hygiène et de bonnes pratiques de fabrication.
- sensibiliser les producteurs à l'application de la norme ivoirienne portant sur les bonnes pratiques de production de l'*attiéké* (NI 713, 2013).



**PERSPECTIVES**

- Afin de modéliser le risque de toxi-infection suite à la consommation de lait, il est nécessaire de collecter les données sur la répartition des consommateurs au cours de la vente journalière du lait et la proportion de survie des spores des bactéries du groupe *B. cereus* suite au réchauffage en mi-journée.

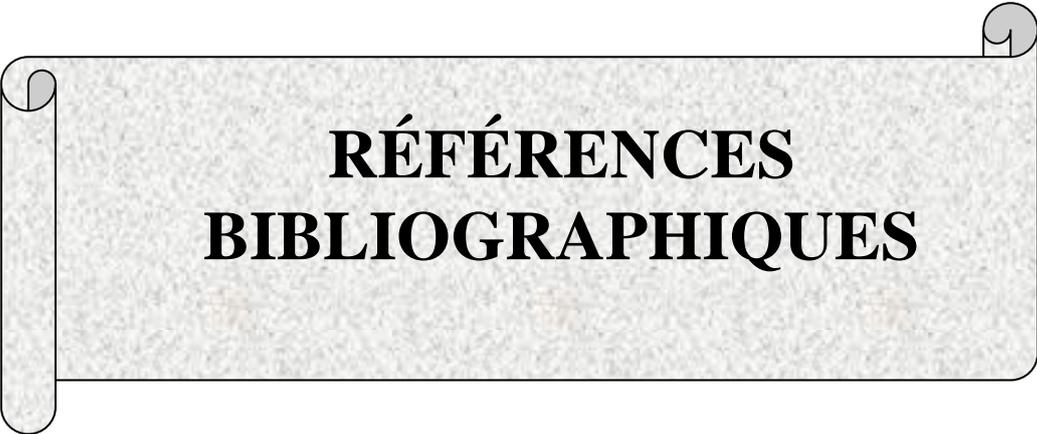
- Faire les tests de cytotoxicité et l'affiliation aux groupes phylogéniques sur la base de données moléculaires de l'analyse fluorescente par polymorphisme en association avec les séquences des gènes ribosomiques afin de fournir une indication plus précise des risques des isolats du groupe *B. cereus* étudiés. L'application de ces méthodes aux isolats étudiés dans ce travail pourra générer des données supplémentaires et contribuer à avoir une évaluation complète et précise du risque à *B. cereus* dans la chaîne de production informelle du lait et de l'*attiéké* jusqu'à l'assiette du consommateur.

- Identifier formellement les 38 (22,1 %) isolats du lait, positifs pour le groupe *B. cereus* dont l'espèce n'a pas pu être identifiée par la méthode utilisée dans l'étude.

- Intégrer d'autres pathogènes tels que *Staphylococcus aureus* et *Clostridium perfringens* dans l'analyse des risques liés à la consommation de l'*attiéké* ;

- Rechercher les caractéristiques fermentaires et d'altération des souches du groupe *B. cereus* isolées dans cette étude ;

- Réaliser une étude coût/bénéfice par l'utilisation des foyers améliorés utilisant comme combustible le gaz butane.



**RÉFÉRENCES  
BIBLIOGRAPHIQUES**

- Abidi K. (2004).** Résidus d'antibiotiques dans le lait de boisson. Thèse de Médecine vétérinaire, Ecole nationale de médecine vétérinaire de Sidi Thabet, Tunisie. 80 pp.
- Aboutayeb R. (2009).** Technologie du lait et dérivés laitiers. <http://www.azaquar.com>. (Consulté le 15/06/2013).
- Ahl A.S., Acree J.A., Gipson P.S., Mc Dowell R.M., Miller L., Mc Elvaine M.D. (1993).** Standardization of nomenclature for animal health risk analysis. *Revue Scientifique et Technique de l'Office Internationale des Epizooties* **12** (4) : 1045-1053.
- Afchain A.L., Carlin F., Nguyen-The C., Albert I. (2008).** Improving quantitative exposure assessment by considering genetic diversity of *B. cereus* in cooked, pasteurized and chilled foods. *International Journal of Food Microbiology*, **128**: 165-173.
- AFNOR (1996).** Norme NF V 08-010. In : Microbiologie des aliments - Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen. Analyse microbiologique recueil de normes françaises. 6<sup>ème</sup> Ed. Paris, pp. 67-75.
- AFSCA (2005).** Terminologie en matière d'analyse des dangers et des risques selon le *Codex Alimentarius*. PB 05 - I 01 - REV 0 – 2005 – 30. p.46.
- AFSCA (2011).** Avis 15-2011 du comité scientifique de l'agence fédérale pour la sécurité de la chaîne alimentaire. Évaluation des risques et bénéfices de la consommation de lait cru de bovins, et de l'effet du traitement thermique du lait cru sur ces risques et bénéfices (dossier Sci Com 2010/25, auto-saisine), 26 p.
- AFSSA (2006).** Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. Rapport. France. 214 p.
- Agata N., Mori M., Ohta M., Suwan S., Ohtani I., Isobe M. (1994).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from *Bacillus cereus* causes vacuole formation in HEp-2 cells. *FEMS Microbiology Letters*, **121** : 31-34.
- Agata N., Ohta M., Mori M., Isobe M. (1995).** A novel dodecadepsipeptide, cereulide, is an emetic toxin of *Bacillus-cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, **129** : 17-19.
- Agata N., Ohta M., Yokoyama K. (2002).** Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereulide) in various foods. *International Journal of Food Microbiology*, **73** : 23-27.
- Agwa O. K., Uzoigwe C.I., Wokoma E.C. (2012).** Incidence and antibiotic sensitivity of *Bacillus cereus* isolated from ready to eat foods sold in some markets in portharcourt, rivers state, Nigeria. *Asian Journal of Microbiology and Biotechnology Environmental Science*, **14** :13 – 1.

- Akely P.M.T. (2012).** Influence de la fermentation contrôlée, du pressage et du semoulage mécanisés du manioc râpé (*Manihot esculenta* Crantz) sur les caractéristiques physicochimiques et sensorielles de l'*attiéké*. Thèse unique de doctorat, Université Abobo-Adjamé, 134 p.
- Al-Abri S.S., Al-Jardani A.K., Al-Hosni M.S., Kurup P.J., Al-Busaidi S., Beeching N.J. (2011).** A hospital acquired outbreak of *Bacillus cereus* gastroenteritis, Oman. *Journal of Infection Public Health*, 4 : 180 – 186.
- Al-Khatib M.S., Khyami-Horani H., Badran E., Shehabi A. (2007).** Incidence and characterization of diarrheal enterotoxins of fecal *Bacillus cereus* isolates associated with diarrhea. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 59 : 383 - 397.
- Altayar M., Sutherland A.D. (2006).** *Bacillus cereus* is common in the environment but emetic toxin producing isolates are rare. *Journal of Applied Microbiology*, 100 : 7-14
- Amani N.G., Kamenan A. (2003).** Potentialités nutritionnelles et technologie traditionnelle de transformation des denrées amylacées en Côte d'Ivoire. 2<sup>ème</sup> Atelier international. Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles, 23-28 Novembre 2003, Ouagadougou, Burkina Faso, 383-392.
- Amiot J., Fournier S., Lebeuf Y., Paquin P., Simpson R. (2002).** Composition, propriétés physicochimiques, valeur nutritive, qualité technologique et techniques d'analyse du lait *In*: Vignola C.L., Science et technologie du Lait : transformation du Lait (2<sup>ème</sup> Eds). École polytechnique de Montréal, ISBN : 3-25-29 pp 600.
- Amoa-awua W.K., Jakobsen M. (1996).** The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava. *Journal of Applied Bacteriology*, 79 : 250 – 256.
- Andrews J., Wise R. (2002).** Susceptibility testing of *Bacillus* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49: 1040-1042.
- Ankolekar C., Rahmati T., Labbé R.G. (2009).** Detection of toxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* spores in U.S. rice. *International Journal of Food Microbiology*, 128 : 460 – 466.
- Ankolekar C., Labbé R.G. (2010).** Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 : 982-984.
- Anonyme 1 (2011).** Épidémiologie des toxi-infections alimentaires collectives en Tunisie. Bienne 2010-2011.
- Anonyme 2 (2011).** Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires - Lignes directrices pour l'interprétation. Ministère de la santé, Direction de la santé,

- Service de la sécurité alimentaire. Luxembourg, Belgique, fiche FC/LZ/PH, F-054 Rev02, pp 49.
- Aouadhi C., Maaroufi A., Mejri S. (2013).** Incidence and characterization of aerobic spore-forming bacteria originating from dairy milk in Tunisia. *International Journal of Dairy Technology*, **67** : 95 - 102.
- Aragon-Alegro L.C., Palcich G., Lopes G.V., Ribeiro V.C.B., Landgraf M., Destro M.T. (2008).** Enterotoxigenic and Genetic Profiles of *Bacillus cereus* Strains of Food Origin in Brazil. *Journal of Food Protection*, **71** : 2115–2118.
- Arnesen L.P.S., Fagerlund A. Granum P.E. (2008).** From soil to gut : *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Reviews*, **32** : 579606.
- Arnesen L., O'Sullivan K., Granum P (2007).** Food poisoning potential of *Bacillus cereus* strains from Norwegian dairies. *International Journal of Food Microbiology*, **116** : 292-96.
- Asano S.I., Nukumizu Y., Bando H., Iizuka T. Yamamoto T. (1997).** Cloning of novel enterotoxin genes from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology*, **63** : 1054-1057.
- Assanvo J.B., Agbo N.G., Behi N.E.N., Farah Z. (2000).** Enquêtes de consommation et de production d'*attiéké* réalisées à Abidjan, Dabou et à Jacqueville. Rapport. Université de Cocody, Côte d'Ivoire, Laboratoire de Biochimie et Science des Aliments (LBSA)/ Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS)/Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich (ETHZ), Abidjan-Côte d'Ivoire. 25p.
- Assanvo J.B., Agbo G.N., Behi Y.E.N., Coulin P., Farah Z. (2006).** Microflora of traditional starter made from cassava for "*Attieké*" production in Dabou (Côte d'Ivoire). *Food Control*, **17** : 37–41.
- Assidjo E., Sadat A., Akmel C., Akaki D., Elleingand E., Yao B. (2013).** L'analyse des risques : Outils innovant d'amélioration de la sécurité sanitaire des aliments. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animale*. **11** (S) : 3-13.
- Atta G. (2008).** Promotion de l'*attiéké*, 20 milliards de FCFA des revenus annuels pour les producteurs et les commerçants. Fraternité matin jeudi 31 juillet 2008.
- BAD (2002).** Banque Africaine de Développement. Projet de développement de l'Élevage phase II. Évaluation à mi-parcours, Rapport définitif. BDPA, Abidjan, Côte d'Ivoire, 215 p.
- Bahrani S.A. (2012).** Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couplés chaleur-

- masse. PhD thèse, Université de La Rochelle, France. <NNT : 2012LAROS366>. 217 pp.
- Banerjee M., Nair G.B., Ramamurthy T. (2011).** Phenotypic & genetic characterization from the acute diarrhoeal patients. *Indian Journal of Medical Research*, **133** : 88-95.
- Barker G.C., Bayley C., Cassidy A., French S., Hart A., Malakar P.K., Maule I.J., Petkov M. et Shepherd R. (2010).** Can a Participatory Approach Contribute to Food Chain Risk Analysis? *Risk Analysis*, **30** (5) : 766-781.
- Bartoszewicz M., Hansen B.M., Swiecicka I. (2008).** The members of the *Bacillus cereus* group are commonly present contaminants of fresh and heat-treated mil., *Food Microbiology*, **25** : 588-96.
- Beecher D.J., Olsen T.W., Somers E.B., Wong A.C. (2000).** Evidence for contribution of tripartite hemolysin BL, phosphatidylcholine-preferring phospholipase C, and collagenase to virulence of *Bacillus cereus* endophthalmitis. *Infection and Immunity*, **68** : 5269-5276.
- Beecher D.J., Wong A.C. (2000).** Tripartite haemolysin BL: isolation and characterization of two distinct homologous sets of components from a single *Bacillus cereus* isolate. *Microbiology*, **146**: 1371-1380.
- Belomaria M., Ahami A.O.T., Aboussaleh Y., Elbouhali B., Cherrah Y., Soulaymani A., (2007).** Origine environnementale des intoxications alimentaires collectives au Maroc: Cas de la région du Gharb Chrarda Bni Hssen. *Antropo*, **14** : 83 - 88.
- Benlahcen K., Mouloudi F., Kihal M. (2013).** Study of the microbiological and physicochemical quality of raw milk from cows exposed to environmental pollutants in the region of west Algeria. *International Journal of Environmental Engineering Science and Technology Research*, **1** : 229-240.
- Bokanga M. (1998).** Cassava in Africa: the root of development in the twenty first century. *Tropical Agriculture (Trinidad)* **75** : 89–92.
- Bonfoh B., Fané A., Traoré N.A., Coulibaly Z., Simbé C.F., Alfaroukh O.I., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J. (2002).** Qualité microbiologique du lait et des produits laitiers vendus en saison chaude dans le District de Bamako au Mali. *Bioterre, Revue Internationale des Sciences de la Vie et de la Terre*, N°spécial : 242–250.
- Bonfoh B., Wasem A., Traore A.N., Fané A., Spillmann H., Simbé C.F., Alfaroukh I.O., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J. (2003).** Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to the selling point in Bamako (Mali). *Food Control*, **14** : 495-500.

- Bonfoh B., Roth C., Traoré AN., Fané A., Simbé CF., Alfaroukh IO., Nicolet J., Farah Z., Zinsstag J. (2006).** Effect of washing and disinfecting containers on the microbiological quality of fresh milk sold in Bamako (Mali). *Food Control* **17** : 153–161.
- Bonfoh B. (2010).** Valeur ajoutée de la participation dans l'analyse de risques des aliments à l'intersection des secteurs formel et informel. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **8** (S) : 1-2.
- Bonfoh B., Fokou G., Traoré S.G., Kouamé-Sina S.M, Bechir M., Zinsstag J., Grace D., Dao D. (2013).** Valeur ajoutée de la participation à l'analyse des risques des produits d'origine animale vendus dans le secteur informel. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **11**(S) : 15-21.
- Bravo A., Gill S.S., Soberon M. (2007).** Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon*, **49** : 423-435.
- Brillard J., Lereclus D. (2004).** Comparison of cytotoxin cytK promoters from *Bacillus cereus* strain ATCC 14579 and from a *Bacillus cereus* food-poisoning strain. *Microbiology*, **150** : 2699-2705.
- Cadot C., Tran S.L., Vignaud M.L., De Buyser M.L., Kolstø A.B., Brisabois A., Nguyen-Thé C., Lereclus D., Guinebretiere M.H., Ramarao N. (2010).** InhA1, NprA, and HlyII as candidates for markers to differentiate pathogenic from nonpathogenic *Bacillus cereus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **48** (4) : 1358-1365.
- Carlin F. (2011).** Origin of bacterial spores contaminating foods. *Food Microbiology*, **28** : 177-182.
- Carlin F., Fricker M., Pielaat A., Heisterkamp S., Shaheen R., Salonen M.S., Svensson B., Nguyen-the C., Ehling-Schulz M. (2006).** Emetic toxin-producing strains of *Bacillus cereus* show distinct characteristics within the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Food Microbiology*, **109** : 132-138.
- Carlin F., Brillard J., Broussole V., Clavel T., Duport C., Jobin M., Guinebretiere M.H, Auger S., Sorokine A., Nguyen-Thé C. (2009).** Adaptation of *Bacillus cereus*, an ubiquitous worldwide-distributed foodborne pathogen, to a changing environment. *Food Research International*, **43** : 1885-1894.
- Carlson C.R., Caugant D.A., Kolsto A.B. (1994).** Genotypic Diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **60** : 1719-1725.

- CA-SFM (2010).** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. Available online : [http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm\\_2010.pdf](http://www.sfm-microbiologie.org/UserFiles/files/casfm_2010.pdf)  
Consulté le 06/10/2010.
- Caudrillier J.R.G. (2008).** Évaluation et validation des traitements thermiques appliqués à une gamme de matériels et de milieux de culture. Thèse de doctorat vétérinaire, École nationale vétérinaire d'Alfort, Créteil, France. 167 p.
- Cazeau G., Chazel M., Jarrige N., Sala C., Calavas D., Gay E. (2010).** Utilisation des antibiotiques par les éleveurs en filière bovine en France. *Renc. Rech. Ruminants*, **17** : 71-74.
- Ceballos H., Sáncheza T., Cháveza AL., Iglesias C., Deboucka D., Maflaa G., Tohmea J. (2006).** Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. *Journal of Food Composition and Analysis* **19** : 589-593.
- Chaves J.Q., Pires E.S., Vivoni A.M. (2011).** Genetic diversity, antimicrobial resistance and toxigenic profiles of *Bacillus cereus* isolated from food in Brazil over three decades. *International Journal of Food Microbiology*, **147** : 12–16.
- Cherif A., Brusetti L., Borin S., Rizzi A., Boudabous A., Khyami-Horani H., Daffonchio D. (2003).** Genetic relationship in the *Bacillus cereus* group by rep-PCR fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific rep-PCR fragment. *Journal of Applied Microbiology*, **94** : 1108-1119.
- Chevance A., Moulin G. (2013).** Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2012. Volumes et estimation de l'exposition des animaux aux antibiotiques. Rapport. Anses - Agence nationale du médicament vétérinaire. Hal id : hal-00876998; <https://hal-anses.archives-ouvertes.fr/hal-00876998>. Consulté le 29/01/2015.
- Chitov T., Dispan R., Kasinrerak W. (2008).** Incidence and diarrhegenic potential of *Bacillus cereus* in pasteurized milk and cereal products in Thailand. *Journal of Food Safety*, **28** : 467-481.
- Choma C., Guinebretiere M.H., Carlin F., Schmitt P., Velge P., Granum P.E., Nguyen-The C. (2000).** Prevalence, characterization and growth of *Bacillus cereus* in commercial cooked chilled foods containing vegetables. *Journal in Applied Microbiology*, **88** : 617–625.
- Chon J-W., Kim J-H., Lee S-J., Hyeon J-Y., Seo K-H. (2012).** Toxin profile, antibiotic resistance, and phenotypic and molecular characterization of *Bacillus cereus* in Sunsik. *Food Microbiology*, **32** : 217-222.

- Christiansson A., Bertilsson J., Svensson B. (1999).** *Bacillus cereus* spores in raw milk: factors affecting the contamination of milk during the grazing Period. *Journal of Dairy Science*, **82** : 305-314.
- CNRA (2003).** Manioc et *Attiéké* : du nouveau. Bulletin d'information et de liaison du CNRA, *CNRA Info* N° 8, 8 p.
- Clair G., Roussi S., Armengaud J., Duport C. (2010).** Expanding the known repertoire of virulence factors produced by *Bacillus cereus* through early secretome profiling in three redox conditions. *Molecular & Cellular Proteomics*, **9** : 1486-1498.
- Codex Alimentarius Commission (2007).** Principes et directives pour la gestion des risques microbiologiques. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Geneva, 12 p.
- Communautés Européennes (2000).** Livre Blanc sur la sécurité alimentaire. Commission des Communautés Européennes : Bruxelles, 61 p.
- Communautés Européennes (2002).** Regulation (EC) no 178/2002 of the European Parliament and of the Council of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *Official Journal of European Union*, L31/1-L31/24.
- Communautés Européennes (2005).** Commission regulation (EC) n°2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, 338/331-338/326.
- Communauté Européenne, (2007a).** Règlement (CE) 1234/2007 du conseil XIII du 22 octobre 2007 portant organisation commune des marchés dans le secteur agricole et dispositions spécifiques en ce qui concerne certains produits de ce secteur (règlement « OCM unique »). *Journal Officiel de l'Union Européenne*, 07.12.2007. L322/12–L322/29.
- Communauté Européenne, (2007b).** Règlement (CE) n° 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires.
- Coulin P., Farah Z., Assanvo J. B., Spillmann J., Puhon Z. (2006).** Characterisation of the microflora of the fermented cassava product *attiéké* during traditional small scale preparation. *International Journal of Food Microbiology*, **2** : 131-136.

- Couvert O. (2002).** Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques. Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, France, Soutenue le 2 Avril 2002, 192 pp.
- Courade G.I., Droy I., Harre D., Roch J., Nicklaus D., Akindès F.A. (1988).** Rapport principal. In : Évaluation des habitudes à la consommation des produits alimentaires en Côte d'Ivoire. Paris : ORSTOM, 123 p. [http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins\\_textes/doc34-05/26077.pdf](http://horizon.documentation.ird.fr/exl-doc/pleins_textes/doc34-05/26077.pdf). Consulté le 20/03/2011.
- Dao D. (2013).** Etude relative à la formulation du programme d'actions détaillé de développement de la filière lait en zone UEMOA. Annexe 3 : Rapport Côte d'Ivoire, 26 p.
- Delmas G., da Silva J.N., Pihier N., Weill F.X., Vaillant V., De Valk H. (2010).** Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin d'Épidémiologie Hebdomadaire*, **31** : 344 - 348.
- Derby G (2007).** Lait, nutrition et santé, Ed : Tec et doc, Lavoisier, Paris. 566 p. ISBN 10: 2743008199.
- De Reu K., Grijspeerdt K., Herman L. (2004).** A Belgian survey of hygiene indicator bacteria and pathogenic bacteria in raw milk and direct marketing of raw milk farm products. *Journal of Food Safety*, **24** : 17 - 36.
- Dierick K., Van Coillie E., Swiecicka I., Meyfroidt G., Devlieger H., Meulemans A., Hoedemaekers G., Fourie L., Heyndrickx M., Mahillon J. (2005).** Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, **43** : 4277-4279.
- Djè K.M., Djéni N.T., Toka M.D., Aka S., (2008).** Biochemical and microbiological changes of cassava dough fermenting under different temperature conditions. *Journal of Food Technology*, **6** : 114-119.
- Djéni N.T., N'guessan K.F., Dadié A.T., Djè K. M. (2008).** Impact of different levels of a traditional starter on the fermentation of cassava dough for Attiéké production. *Food*, **2** : 145-151.
- Djéni N.T. (2009).** Typologie de l'*attiéké* de trois zones de production de Côte d'Ivoire et analyse des propriétés des levains traditionnels utilisés pour sa préparation. Thèse unique de doctorat, Université Abobo-Adjamé, 170 p.
- Djéni N.T., N'Guessan K.F., Toka D.M., Kouamé K.A., Dje K.M. (2011).** Quality of *attiéké* (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte d'Ivoire. *Food Research International*, **44** : 410-416.

- Djéni N.T., Kouamé K.A., Traoré Y., Nevry K.R., Dje K.M. (2014).** Assessment of knowledge, attitudes and practices of food handlers in Attieke production units in relation to food hygiene and safety in Côte d'Ivoire in 2012. *Food and Nutrition Sciences*, **5** : 896-904.
- Djoulde R.D. (2004).** Mise au point d'un ferment mixte destiné à la bioconversion des tubercules de manioc cyanogène. Thèse de Doctorat de l'École Nationale Supérieure Des Sciences Agroindustrielles (ENSAI), Université de Ngaoundéré, Cameroun, 200 p.
- Dohoo I.R., Martin S.W., Stryhn H. (2010).** Veterinary epidemiologic research (2<sup>nd</sup> Ed.). VER Inc., Canada.
- Donkor E.S., Newman M.J., Tay S.C.K., Dayie N.T.K.D., Bannerman E., Olu-Taiwo M. (2011).** Investigation into the risk of exposure to antibiotic residues contaminating meat and egg in Ghana. *Food Control*, **22** : 869–873.
- Doyle M.P., Loneragan G.H., Scott H.M., Singer R.S. (2013).** Antimicrobial resistance: challenges and perspectives. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **12** : 234–248.
- Dromigny E. (2008).** *Bacillus cereus*. Collection « Monographies de microbiologie ». Éditions Lavoisier Paris. 392 p.
- Duraiappah A.K., Roddy P.V., Parry J.E. (2005).** Have participatory approaches increased capabilities ? IISD Publications Centre. International Institute for Sustainable Development, UK.
- EFSA (2005).** Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. in foodstuffs. *The EFSA Journal*, **175** : 1-48.
- Eglezos S., Huang B., Dykes G.A., Fegan N. (2010).** The Prevalence and Concentration of *Bacillus cereus* in Retail Food Products in Brisbane, Australia. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7** : 867-870.
- Ehling-Schulz M., Fricker M., Scherer S. (2004).** *Bacillus cereus*, the causative agent of an emetic type of food-borne illness. *Molecular Nutrition & Food Research*, **48** : 479-487.
- Ehling-Schulz M., Vukov N., Schulz A., Shaheen R., Andersson M., Märtilbauer E., Scherer S. (2005).** Identification and partial characterization of the non-ribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** : 105-113.

- Ehling-Schulz M., Fricker M., Grallert H., Rieck P., Wagner M., Scherer S. (2006).** Cereulide synthetase gene cluster from emetic *Bacillus cereus*: Structure and location on a mega virulence plasmid related to *Bacillus anthracis* toxin plasmid pXO1. *BMC Microbiology*, **6** : 20.
- Eneroth A., Christiansson A., Brendehaug J., Molin G. (1998).** Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora. *International Dairy Journal*, **8** : 829-834.
- Esbelin J. (2009).** La protéine Fnr et le système à deux composants ResDE, régulateurs majeurs de la synthèse des entérotoxines de *Bacillus cereus*. Thèse de doctorat en Biotechnologie, microbiologie. Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse. Soutenue le 2 juillet 2009. 197 p.
- Fabre J-M., Petit C., Bosquet G. (2006).** Comprendre et prévenir les risques des résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale, édition 2006, Programme delvotest en 10 points ; 12 pp.  
[http://www.dsm.com/le/static/delvotest/downloads/GuideDelvotest10Points\\_Fr.pdf](http://www.dsm.com/le/static/delvotest/downloads/GuideDelvotest10Points_Fr.pdf).  
(Consulté le 02-05-2011).
- Fagerlund A., Ween O., Lund T., Hardy S.P., Granum P.E. (2004).** Genetic and functional analysis of the cytK family of genes in *Bacillus cereus*. *Microbiology*, **150** : 2689-2697.
- Fagerlund A., Lindback T., Granum P.E. (2010).** *Bacillus cereus* cytotoxins Hbl, Nhe and CytK are secreted via the Sec translocation pathway. *BMC Microbiology*, **10** : 304.
- Fangio M.F., Roura S.I., Fritz R. (2010).** Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods. *Journal of Food Science*, **75** : M218–M221.
- FAO (1998).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition, n°28, ISBN 92-5-20534-6.
- FAO (2004).** The state of food and agriculture. FAO, Rome, 208 p.
- FAO (2009).** La situation mondiale de l'alimentation et de l'agriculture. Rome, 202 p.
- FAO (2011).** Le lait et les produits laitiers dans la nutrition humaine. Collection FAO : Alimentation et nutrition n° 28. ISBN 92-5-20534-6.
- FAO (2016).** FAOSTAT Division de la statistique. Agriculture Organization of the United Nations FAO. <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/F>. Consulté le 06/04/2016.

- FAO/OMS (1997).** Dispositions générales sur l'hygiène alimentaire. *Codex Alimentarius*. Supplement au volume 1B. FAO, Rome.
- FAO/OMS (2007).** Principes de travail pour l'analyse des risques en matière de sécurité sanitaire des aliments destinés à être appliqués par les gouvernements. *Codex Alimentarius*. 1<sup>ère</sup> Edition, Rome, Italie 41pp.
- FAO/OMS (2004).** Caractérisation des dangers liés à la présence de pathogènes dans les aliments et dans l'eau - directives. Évaluation des Risques Microbiologiques, Série n°3. 80 pp.
- Faye B., Loiseau G. (2002).** Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité. *In* : Hanak E., Boutrif E., Fabre P., Pineiro M., 2002. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO, 11-13 déc. 2000, Montpellier, France, Cirad, Cédérom.
- Floristean V., Cretu M., Carp-Cărare C. (2007).** Bacteriological characteristics of *Bacillus cereus* isolates from poultry. *Bulletin USAMV-CN* 64 : 425-430.
- FDA (2012).** Bad Bug Book, Handbook of foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Second Edition [*Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp, pp. 92 - 95].
- Fokou G., Koné B.V., Bonfoh B. (2010).** Mon lait est pur et ne peut pas rendre malade : motivations des acteurs du secteur informel et qualité du lait local au Mali. *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **8 (S)** : 75–86.
- Frank J.F., Hassan A.N. (2002).** Microorganisms associated with milk. *Encyclopedia of Dairy Sciences*. Oxford: Elsevier, pp. 1786-1796.
- Franworth E., Mainville I. (2010).** Les produits laitiers fermentés et leur potentiel thérapeutique, Centre de recherche et de développement sur les aliments, Saint-Hyacinthe. <http://www.dos.transf.edwa.pdf>. Consulté le 11/10/ 2012.
- FSAI (2011).** Microbial factsheet series: *Bacillus cereus*. N°1. September 2011. 1 - 4.
- Gohar M., Okstad O.A., Gilois N., Sanchis,V., Kolsto A.B., Lereclus D. (2002).** Two-dimensional electrophoresis analysis of the extracellular proteome of *Bacillus cereus* reveals the importance of the PlcR regulon. *Proteomics*, **2** : 784-791.
- Goldenberger D., Perschil I., Ritzler M., Altwegg M. (1995).** A simple “universal” DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification. *PCR Methods and Applications*, **4** : 368-370.
- Gonzalez I., Lopez M., Mazas M., Gonzalez J., Bernardo A. (2007).** Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in the recovery medium. *Journal of Food Safety*, **17** : 1 - 12.

- Grace D., Randolph T., Olawoye J. Dipelou M., Kang'ethe E.K. (2008).** Participatory risk assessment: a new approach for safer food in vulnerable African communities. *Development in Practice*, **18** : 611-618.
- Granum P.E. (2007).** *Bacillus cereus*. In : Doyle M. P. and Beuchat L. R (ed.). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers, ASM Press, Washington D.C., 440-456.
- Granum P.E., O'Sullivan K., Lund T. (1999).** The sequence of the non-haemolytic enterotoxin operon from *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, **177** : 225 – 229.
- Grillet N., Grimaud P., Loiseau G., Wesuta M., Faye B. (2005).** Qualité sanitaire du lait cru tout au long de la filière dans le district de Mbarara et la ville de Kampala en Ouganda. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **58** : 245-255.
- Guillemet E., Cadot C., Tran S.L., Guinebretiere M.H., Lereclus D., Ramarao N. (2010).** The InhA metalloproteases of *Bacillus cereus* contribute concomitantly to virulence. *Journal of Bacteriology*, **192** : 286-294.
- Guinebretiere M.H., Nguyen The C. (2003).** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurised zucchini puree processing plant, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiology Ecology*, **43** : 207-215.
- Guinebretiere M. H., Sanchis V. (2003).** *Bacillus cereus lato*. Bulletin de la Société Française de Microbiologie, **18** : 95-103.
- Guinebretiere M.H., Broussolle V., Nguyen-The C. (2002).** Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. *Journal of Clinical Microbiology*, **40** (8) : 3053–3056.
- Guinebretiere M.H., Girardin H., Dargaignaratz C., Carlin F., Nguyen-The C. (2003).** Contamination flows of *Bacillus cereus* and spore-forming aerobic bacteria in a cooked, pasteurized and chilled zucchini purée processing line. *International Journal of Food Microbiology*, **82** : 223-232.
- Guinebretiere M.H., Fagerlund A., Granum E., Nguyen-The C. (2006).** Rapid discrimination of *cytK-1* and *cytK-2* genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system, *FEMS Microbiology Letters*, **259** : 74-80.
- Guinebretiere M.H., Thompson F.L., Sorokin A., Normand P., Dawyndt P., Ehling-Schulz M., Svensson B., Sanchis V., Nguyen-The C., Heyndrickx M., De Vos P. (2008).** Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group. *Environmental Microbiology*, **10** : 851-65.

- Guiraud (2003).** Méthode d'analyse en microbiologie alimentaire. *In : Microbiologie alimentaire.* Paris.
- Hansen B.M., Hendriksen N.B. (2001).** Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** : 185–189
- Hardy S.P., Lund T., Granum P.E. (2001).** CytK toxin of *Bacillus cereus* forms pores in planar lipid bilayers and is cytotoxic to intestinal epithelia. *FEMS Microbiology Letters*, **197** : 47-51.
- Headrick M.L., B. Timbo K.C. Klontz, et al. (1997).** Profile of raw milk consumers in California. *Public Health Report*, 112 : 418–422.
- Hegarty H., O’Sullivan M.B., Buckley J., et al. (2002).** Continued raw milk consumption on farms: why? *Community Disease Public Health*, **5** : 151–156.
- Helgason E, Okstad, O.A., Caugant D.A, Johansen H.A, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolstø A.B. (2000).** *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—One Species on the Basis of Genetic Evidence. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** (6) : 2627-2630.
- Helgason E., Tourasse N.J., Meisal R., Caugant D.A., Kolstø A.B. (2004).** Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** : 191-201.
- Heuberger C. (2005).** Cyanide content of cassava and fermented products with focus on *Attiéké* and *Attiéké garba*. Ph. D thesis, Swiss Federal Institute of Technology Zurich, 126 p.
- Hill K.K., Ticknor L.O., Okinaka R.T., Asay M., Blair H., Bliss K.A., Laker M., Pardington P.E., Richardson A.P., Tonks M., Beecher D.J., Kemp J.D., Kolstø A.B., Wong A.C., Keim P., Jackson P.J. (2004).** Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **70** (2) : 1068-1080.
- Hoa N.T., Baccigalupi L., Huxham,A., Smertenko A., Van P. H., Ammendola S., Ricca E., Cutting S.M. (2000).** Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** : 5241-5247.
- HPA (2011).** Reported outbreaks of *Bacillus* spp. 1992-2010. Health Protection agency.
- IDF (1990).** Handbook on milk collection in warm developing countries. Brussels, Belgium. special issue N°9002 (pp. 1-148).

- INS (1998)**. Synthèse des résultats définitifs du Recensement Général de la Population et de l'Habitat 1998, Côte d'Ivoire. Institut National de la Statistique, p. 32.
- ISO 7932 (2004)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony count technique at 30°C. 13 p.
- ISO 21871 (2006)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the determination of low numbers of presumptive *Bacillus cereus* - Most probable number technique and detection method. 14 p.
- ISO 22000 (2005)**. Systèmes de management de la sécurité des denrées alimentaires. Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire. Réf. n° EN ISO 22000 : 2005 F, 1<sup>er</sup> tirage, 10 p. V01-010, AFNOR.
- ISO 7218 (2007)**. Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations. Third edition, 66 p.
- Iurlina M. O., Saiz A.I., Fuselli S.R., Fritz R. (2006)**. Prevalence of *Bacillus spp.* in different food products collected in Argentina. *LWT - Food Science and Technology*, **39** : 105-110.
- Jackson S.G., Goodbrand R.B., Ahmed R, Kasatiya S. (1995)**. *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated from Gastroenteritis outbreak investigation. *Letters in Applied Microbiology*, **21** : 103-105.
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. (2005)**. Modern Food Microbiology 7<sup>th</sup> edition. Springer Science + Business Media. New York, NY. 790 p.
- Janssens M. (2001)**. Cassava. In: Crop Production in Tropical Africa, Raemaekers, R.H. (Ed.). Directorate General for International Cooperation, Brussels, Belgium, pp: 195-218.
- Jensen L.B., Baloda S., Boye M., Arestrup F.M. (2001)**. Antimicrobial resistance among *Pseudomonas spp.* and *Bacillus cereus* group isolated from Danish agricultural soil. *Environment International*, **26** : 581–587.
- Jensen G.B., Hansen B.M., Eilenberg J., Mahillon J. (2003)**. The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology*, **5** : 631-640.
- Jeantet R., Croguennec T., Mahaut M., Schuck P. et Brule G., (2008)**. Les produits laitiers, 2<sup>ème</sup> édition, Tec et Doc, Lavoisier: 1-3-13-14-17 (185 pages).
- Jonkuvienė D., Šalomskienė J., Žvirdauskienė R., Narkevičius R. (2012)**. Determining differences in characteristics of *Bacillus cereus* isolated from various foods. *Veterinarija Ir Zootechnika*, **60** : 22 – 29.

- Kelton D.F., Lissemore K.D., Martin R.E. (1998).** Recommendations for recording and calculating the incidence of selected clinical diseases of dairy cattle. *Journal of dairy Science*, **81** : 2502 – 2509.
- Kimaryo V.M., Massawi G.A., Olasupo N.A., Holzapfel W.H. (2000).** The use of a starter culture in the fermentation of cassava for the production of “Kivunde”, a traditional Tanzanian food product. *International Journal of Food Microbiology*, **56** : 179–190.
- Kniehl E., Becker A., Forster D.H. (2003).** Pseudo-outbreak of toxigenic *Bacillus cereus* isolated from stools of three patients with diarrhoea after oral administration of a probiotic medication. *Journal of Hospital Infection*, **55** : 33-38.
- Kouamé A.K., Djéni T.N., N’Guessan F.K. Djè K. M. (2012).** Postprocessing microflora of commercial *attiéké* (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d’Ivoire. *Letters in Applied Microbiology* **56** : 44-50.
- Kouamé-Sina S.M., Bassa A., Dadié A., Makita K., Grace D., Djè M., Bonfoh B. (2010).** Analyse des risques microbiens du lait cru local à Abidjan (Côte d’Ivoire). *Revue Africaine de Santé et de Productions Animales*, **8 (S)** :35-42.
- Kouamé-Sina S.M. (2013).** Contribution à la gestion des risques de contamination microbienne et diversité génotypique des espèces du genre *Bifidobacterium* isolées de la chaîne de production du lait local à Abidjan. Thèse unique de doctorant, Université Nangui Abrogoua, Côte d’Ivoire, soutenue le 12/12/2013. 144 p.
- Kouassi B. Y., Traoré A., Sirpé G. (2008).** Transformation et consommation des denrées alimentaires en Afrique de l’ouest centrale : Burkina Faso, Côte d’Ivoire et Ghana. KARTHALA Editions, 180 p.
- Kunwar P.S., Dinesh M., Sarita S., Dalwani R. (2004).** Impact Assessment of Treated/Untreated Wastewater Toxicants Discharged by Sewage Treatment Plants on Health, Agricultural and Environmental Quality in the Wastewater Disposal Area. *Chemosphere*, **55**: 227-255. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.050>.
- Lapidus A., Goltsman E., Auger S., Galleron N., Ségurens B., Dossat C., Land M.L., Broussolle V., Brillard J., Guinebretiere M.H., Sanchis V., Nguen-The C., Lereclus D., Richardson P., Wincker P., Weissenbach J., Ehrlich SD., Sorokin A. (2008).** Extending the *Bacillus cereus* group genomics to putative food-borne pathogens of different toxicity. *Chemico-Biological Interactions*, **171 (2)** : 236–249.
- Lechner S., Mayr R., Francis K.P., Pruss B.M., Kaplan T., Wiessner-Gunkel E., Stewart G.S., Scherer S. (1998).** *Bacillus weihenstephanensis* sp. nov. is a new

- psychrotolerant species of the *Bacillus cereus* group. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48** : 1373-1382.
- Lejeune J.T., Rajala-Schultz P.J. (2009)**. Food safety: unpasteurized milk: a continued public health threat. *Clinical and infectious disease*, **48** : 93–100.
- Leuschner R., Lillford P., (1999)**. Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*. *Letters in Applied Microbiology*, **29** : 228 – 232.
- Levinson H.S., Hyatt M., (1970)**. Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores. *Journal of Bacteriology*, **101** : 58 - 64
- Leymarios F.C. (2010)**. Qualité nutritionnelle du lait de vache et de ses acides gras. Voies d'amélioration par l'alimentation. Thèse pour le doctorat vétérinaire. Faculté de médecine de Créteil, école nationale vétérinaire D'ALFORT, France, 120 p.
- Lindbäck T., Fagerlund A., Rodland M.S., Granum P.E. (2004)**. Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin. *Microbiology*, **150** : 3959-3967.
- Lindbäck T., Hardy S.P., Dietrich R., Hardy S.P., Dietrich R., Sødring M., Didier A., Moravek M., Fagerlund A., Bock S., Nielsen C., Casteel M., Granum P.E., Märklbauer E. (2010)**. Cytotoxicity of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin requires specific binding order of its three exoprotein components. *Infection and Immunity*, **78** : 3813-3821.
- Logan N., Turnbull P.C.B. (2003)**. *Bacillus* and other aerobic endospore-forming bacteria. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH *et al.*, eds. *Manual of Clinical Microbiology*, 8<sup>ème</sup> Edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, pp 445–460.
- Logan N.A., Halket G. (2011)**. Developments in the taxonomy of the aerobic, endospore-forming bacteria. In *Aerobic, Endospore-forming Soil Bacteria* ed. Logan, N.A. and De Vos, P. Berlin: Springer-Verlag, pp. 1-29.
- Luna V.A., King D.S., Gullede J., Cannons A.C., Amuso P.T., Cattani J. (2007)**. Susceptibility of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* and *Bacillus thuringiensis* to 24 antimicrobials using Sensititre automated microbroth dilution and Etest agar gradient diffusion methods. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, **60** : 555-567.
- Lund T., De Buyser M.L., Granum P.E. (2000)**. A new cytotoxin from *Bacillus cereus* that may cause necrotic enteritis. *Molecular Microbiology*, **38** : 254-261.
- Magnusson M. (2007)**. *Bacillus cereus* in the housing environment of dairy cows. Thèse de doctorat, Alnarp, Sweden: Swedish University of Agricultural Sciences. pp. 46.

- Mahler H., Pasi A., Kramer J.M., Schulte P., Scoging A.C., Bar W., Krahenbuhl S. (1997).** Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of *Bacillus cereus*. *New England Journal of Medicine*, **336** : 1142-1148.
- Mantynen V., Lindström K. (1998).** A rapid PCR based DNA test for enterotoxic *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, **64** : 1634 - 1639.
- Margulis L., Jorgensen J.Z., Dolan S., Kolchinsky Rainey F.A., Lo S.C. (1998).** The Arthromitus stage of *Bacillus cereus* : Intestinal symbionts of animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95** : 1236-1241.
- Merzougui S., Lkhider M., Grosset N., Gautier M., Cohen N. (2014).** Prevalence, PFGE typing, and antibiotic resistance of *Bacillus cereus* group isolated from food in Morocco. *Foodborne pathogens and Disease*, **11** : 145-149.
- Michelet N., Mahillon J. (2003).** *Bacillus cereus* opportuniste et pathogène. *Bulletin de la société française de microbiologie*, **18** : 113-122.
- Mikkola R., Saris N.E.L., Grigoriev PA., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M.S. (1999).** Ionophoretic properties and mitochondrial effects of cereulide: the emetic toxin of *B. cereus*. *European Journal of Biochemistry*, **263** : 112-117.
- Minnaard J., Delfederico L., Vasseur V., Hollmann A., Rolny I., Semorile L., Perez P.F. (2007).** Virulence of *Bacillus cereus* : A multivariate analysis. *International Journal of Food Microbiology*, **116** : 197-206.
- MIPARH-DPP (2003).** Rapport national sur l'état des ressources zoogénétiques. Département de la Production Animale du Ministère de la Production Animale et des Ressources Halieutiques, Abidjan, Côte d'Ivoire, 80 p.
- MIRAH-DPP (2012).** Annuaire des statistiques des ressources animales et halieutiques. Direction de la Planification et des programmations, Ministère de Ressources Animales et Halieutiques, Abidjan, Côte d'Ivoire, 26 p.
- MMWR (2013).** Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks - United States, 1998 - 2008. Centers for Disease Control and Prevention. *Surveillance Summaries*. **62** : 1-34.
- Mock M., Fouet A. (2001).** Anthrax. *Annual Review of Microbiology*, **55** : 647-671.
- Moravek M., Wegscheider M., Schulz A., Dietrich R., Burk C., Martlbauer E. (2004).** Colony immunoblot assay for the detection of hemolysin BL enterotoxin producing *Bacillus cereus*. *FEMS Microbiology Letters*, 2004 Sep 1; **238** (1) : 107-113.
- Moravek M., Dietrich R., Burk C., Broussolle V., Guinebretiere M.H., Granum P.E., Nguyenthe C., Martlbauer E. (2006).** Determination of the toxic potential of

- Bacillus cereus* isolates by quantitative enterotoxin analyses. *FEMS Microbiology Letters*, **257** : 293 – 298.
- Moreau A., Dedianne M-C., Letrilliart L., Le Goaziou M-F., Labarère J., Terre J.L., (2004).** S'approprier la méthode du *focus group*. La revue du praticien – médecine générale. Tome 18. n° 645 du 15 mars : 382-384.
- Mossel D.A.A., Koopman MJ, Jongerius E. (1967).** Enumeration of *Bacillus cereus* in foods, *Applied Microbiology*, **15** : 650-653.
- Mosso K., Kouadio N., Nemlin G.J. (1996).** Transformations traditionnelles de la banane, du manioc, du taro et de l'igname dans les régions du Centre et du Sud de la Côte d'Ivoire. *Industries alimentaires et agricoles*, **3** : 91-96.
- Nakamura L.K. (1998).** *Bacillus pseudomycooides* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, **48** : 1031-1035.
- Naranjo M., Denayer S., Botteldoorn N., Delbrassinne L., Veys, J., Waegenaere J., Sirtaine N., Driesen R.B., Sipido K.R., Mahillon J., Dierick K. (2011).** Sudden death of a young adult associated with *Bacillus cereus* food poisoning. *Journal of Clinical Microbiology*, **49** : 4379-4381.
- Ngoune L.T., Tanedjeu K. S., Mbofung C.M.F. (2009).** Impact de l'utilisation des antibiotiques sur la sensibilité des bactéries pathogènes de poules dans la ville de Ngaoundéré. *Cameroon Journal of Experimental Biology*, **5** : 52 - 61.
- N'goran K.E., Yapi Gnaoré C.V., Fantodji T.A., N'goran A. (2008).** Caractérisation phénotypique et performances des vaches laitières de trois régions de Côte d'Ivoire. *Archives de Zootechnique*, **57** : 415 – 426.
- N'goran K.E., Yapi-Gnaoré V.C., Fantodji A.T., Coulibaly J.K., Aké Y.A. (2013).** Qualité hygiénique et prévalence de contamination du lait des fermes péri-urbaines dans le district des lagunes (au sud de la Côte d'Ivoire). *Agronomie Africaine*, **25** : 239 – 249.
- NI 484 (2013).** Norme ivoirienne, *attiéké* - Spécification, Côte d'Ivoire Normalisation, 1<sup>ère</sup> Édition, 5 p.
- NI 713 (2013).** Norme ivoirienne, Guide de bonnes pratiques de production de l'*attiéké*, Côte d'Ivoire Normalisation, 1<sup>ère</sup> Édition 15 p.
- Noblet B. (2012).** Le lait : produits, composition et consommation en France. *Cahier de nutrition diététique*, **47** : 242-249. Doi:10.1016/j.cnd.2012.01.001
- NRC (1983).** National Research Council. *Risk Assessment in the Federal Government: Managing the Process*, National Academy Press, Washington D.C.

- Oliver S.P., Jayarao B.M., Almeida R.A. (2005).** Foodborne Pathogens in Milk and the Dairy Farm Environment: Food Safety and Public Health Implications. *Foodborne pathogens and disease*, **2** : 115-129.
- Oliwa-Stasiak K., Molnar C.I., Arshak K., Bartoszcze M., Adley C.C. (2010).** Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *Journal of Applied Microbiology*, **108** : 266–273.
- OMC (1994).** Accord sur l'application des mesures sanitaires et phytosanitaires. Parlement européen et Conseil, 2002. *Journal officiel des Communautés européennes*, L31, 1.
- OMS (1991).** Manuel d'épidémiologie pour la gestion de la santé au niveau du district. Ed. Organisation mondiale de la santé, 186 p.
- Oomes S.J.C.M., van Zuijlen A., Hehenkamp, J. O., Witsenboer, H., Van der Vossen J., Brul, S. (2007).** The characterisation of *Bacillus* spores occurring in the manufacturing of (low acid) canned products. *International Journal of Food Microbiology*, **120** : 85-94.
- Oulaï J. (2004).** Distribution et utilisation des médicaments vétérinaires en Côte d'Ivoire : Cas de la région des lagunes. Thèse de doctorant vétérinaire, Université Cheikh Anta Diop de Dakar, E.I.S.M.V ; soutenu le 13 juillet, 92 p.
- Pacova Z., Svec P., Stenfors L.P., Vyletelova M., Sedlacek I. (2003).** Isolation of the psychrotolerant species *Bacillus weihenstephanensis* from raw cow's milk. *Czech Journal of Animal Science*, **48** : 93-96.
- Park S.H., Kim H.J., Kim J.H., Kim T.W., Kim H.Y. (2007).** Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **17** : 1177–1182.
- Park Y.B., Kim J.B., Shin S.W., Kim J.C., Cho S.H., Lee B.K., Ahn J., Kim J.M., Oh D.H. (2009).** Prevalence, genetic diversity, and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* strains isolated from rice and cereals collected in Korea. *Journal of Food Protection*, **72** : 612-617.
- Perani M., Bishop A.H., Vaid, A. (1998).** Prevalence of beta-exotoxin, diarrhoeal toxin and specific delta-endotoxin in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters*, **160** :55-60.
- Pirttijarvi T.S.M., Ahonen L.M., Maunuksela L.M., Salkinoja-Salonen M.S. (1998).** *Bacillus cereus* in a whey process. *International Journal of Food Microbiology*, **44** : 31-41.

- Pirttijarvi T.S.M., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M. S. (2000).** Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes. *International Journal of Food Microbiology*, **60** : 231-239.
- Pointurier H. (2003).** La gestion matières dans l'industrie laitière. Tec et Doc, Lavoisier, France, 388 p.
- Pol M., Ruegg P.L. (2007).** Relationship between antimicrobial drug usage and antimicrobial susceptibility of gram-positive mastitis pathogens. *Journal of Dairy Sciences*, **90** : 262-273.
- Pomerantsev A.P., Kalnin K.V., Osorio M. Leppla S.H. (2003).** Phosphatidylcholine-specific phospholipase C and sphingomyelinase activities in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Infection and Immunity*, **71** : 6591-6606.
- Pougheon S.I.A.S. (2001).** Contribution à l'étude des variations de la composition du lait et ses conséquences en technologie laitière. Thèse de doctorat d'état, École Nationale Vétérinaire, Université Toulouse III - Paul Sabatier, France, 102 pages.
- Rahimi E., Abdos F., Momtaz H., Baghbadorani Z.T., Jalali M. (2013).** *Bacillus cereus* in Infant Foods: Prevalence Study and Distribution of Enterotoxigenic Virulence Factors in Isfahan Province, Iran. *The Scientific World Journal*, pg 292571, 5 p.
- Rajkovic A., Uyttendaele M., Courtens T., Heyndrickx M., Debevere J. (2006).** "Prevalence and characterisation of *Bacillus cereus* in vacuum packed potato puree". *International Journal of Food Science & Technology*, **41** : 878-884.
- Rajkovic A., Uyttendaele M., Dierick K., Samapundo S., Botteldoorn N., Mahillon J., Heyndrickx M. (2008).** Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. Report for the superior Health Council Belgium. "CSS-HGR 8316 Public health implications of *Bacillus cereus* in food"; 80 p.
- Ramarao N., Lereclus D. (2005).** The InhA1 metalloprotease allows spores of the *B-cereus* group to escape macrophages. *Cellular Microbiology*, **7** : 1357-1364.
- Rather M.A., Aulakh R.S., Gill J.P.S., Verma R., Rao T.S. (2011).** Enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* strains isolated from raw and pasteurized milk. *The Indian Journal of Animal Sciences*, **81** : 448-452.
- Rasko D.A., Altherr M.R., Han C.S., Ravel J. (2005).** Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiology Reviews*, **29** (2) : 303-329.
- Rasolofso E.A. (2010).** Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Mémoire pour l'obtention du grade de Philosophie doctor (Ph.D.) de l'université Laval .Québec. Canada.

- Ray B. (1996).** Fundamental Food Microbiology. New York: CRC Press. 528 p.
- Reis A.L.S., Montanhini M.T.M., Bittencourt J.V.M., Destro M.T., Bersot L.S. (2013).** Gene detection and toxin production evaluation of hemolysin BL of *Bacillus cereus* isolated from milk and dairy products marketed in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, **44** : 1195-1198.
- Reyes-Ramirez A., Ibarra J.E. (2005).** Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence based PCR analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** : 1346-1355.
- Reyes J. E., Bastias J. M., Gutiérrez, M. R., Rodríguez, M. (2007).** Prevalence of *Bacillus cereus* in dried milk products used by Chilean School Feeding Program. *Food Microbiology*, **24** : 1-6.
- Rivera A.M.G., Granum P.E., Priest F.G. (2000).** Common occurrence of enterotoxin genes and enterotoxicity in *Bacillus thuringiensis*. *FEMS Microbiology Letters* **190**: 151–155.
- Rosenquist H., Smidt L., Anderson R.S., Jensen B.G., Wilcks A. (2005).** Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food. *FEMS Microbiology Letters*, **250** : 129-136.
- Rasolofo E.A. (2010).** Analyse du microbiote du lait par les méthodes moléculaires. Thèse de doctorat (Ph. D) de l'Université de Laval, Québec, Département des sciences des aliments et de nutrition, 155 pp.
- Roig-Sagués A.X., Velázquez R.M., Legre-Agramont P.M., López-Pedemonte T.J., Brinze-Zambrano W.J., Guamis-López B., Hernandez M.M. (2009).** Fat content increases the lethality of ultra-high-pressure homogenization on *Listeria monocytogenes* in milk. *Journal of Dairy Science*, **92** : 5396-5402.
- Roy A., Moktan B., Sarkar P.K. (2007).** Characteristics of *Bacillus cereus* isolates from legume-based Indian fermented foods. *Food control*, **18** : 1555-1564.
- Saidi N., Guessas B., Bensalah F., Badis A., Haladji M., Henni D. E., Prevost H., Kihal M. (2002).** Caractérisation des bactéries lactiques isolées du lait des régions arides. *Journal Algérien des Régions Arides*, **1** : 1-11.
- Samapundo S., Heyndrickx M., Xhaferi R., Devlieghere F. (2011).** Incidence, diversity and toxin gene characteristics of *Bacillus cereus* group strains isolated from food products marketed in Belgium. *International Journal of Food Microbiology*, **150** : 34 – 41.

- Sanaa M. (2002).** Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques. *Épidémiologie et santé animale*, **41** : 169-177.
- Sanaa M., Cerf O. (2002).** La démarche d'analyse quantitative des risques de maladies infectieuses transmises par les aliments. *Épidémiologie et Santé Animale*, **41** : 157-168.
- Sauka D.H., Benintende G.B. (2008).** *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pests. *Revista Argentina de Microbiologia*, **40** : 124-40.
- Scheldeman P., Pil A., Herman L., De Vos P., Heyndrickx M. (2005).** Incidence and diversity of potentially highly heat-resistant spores isolated at dairy farms. *Applied and Environmental Microbiology*, **71** : 1480-1494.
- Schwarz S., Chaslus-Dancla E. (2001).** Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*, **32** : 201-225.
- Schwenninger S.M., Von Ah U., Niederer B., Teuber M., Meile L. (2005).** Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *Journal of Food Protection*, **68** : 111-119.
- Scott S.A., Brooks J.D., Rakonjac J., Walker K.M.R., Flint, S.H. (2007).** The formation of thermophilic spores during the manufacture of whole milk powder. *International Journal of Dairy Technology*, **60** : 109-117.
- Sergeev N., Distler M., Vargas M., Chizhikov V., Herold K.E., Rasooly A. (2005).** Microarray analysis of *Bacillus cereus* group virulence factors. *Journal of Microbiological Methods*, **65** : 488-502.
- Shinagawa K., Ueno Y., Hu D., Ueda S., Sugii S. (1996).** Mouse lethal activity of a HEp-2 vacuolation factor, cereulide, produced by *Bacillus cereus* isolated from vomiting-type food poisoning. *Journal of Veterinary Medical Science*, **58** : 1027-1029.
- Siousarran V. (2003).** Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger. Rapport de stage. CIRAD-EMVT; Université Montpellier II, pp 65.
- Sivakumar T., Shankar T., Vijayabaskar P., Muthukumar J., Nagendrakanna E. (2012).** Amylase Production Using *Bacillus cereus* Isolated from a Vermicompost Site. *International Journal of Microbiology Research*, **3** : 117-123.
- Slaghuis B. A., Te Giffel M. C., Beumer, R. R., André G. (1997).** Effect of pasturing on the incidence of *Bacillus cereus* spores in raw milk. *International Dairy Journal*, **7** : 201-205.

- Sorokin A., Candelon B., Guilloux K., Galleron N., Wackerow-Kouzova N., Ehrlich S.D., Bourguet D., Sanchis V. (2006).** Multiple-locus sequence typing analysis of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* reveals separate clustering and a distinct population structure of psychrotrophic strains. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** : 1569-1578.
- Sotomey M., Ategbro E.-A.D., Mitchipke E.C., Gutierrez M.-L., Nago M.C. (2001).** Innovation et diffusion des produits alimentaires en Afrique: l'*attiéké* au Bénin. Alimentation. Savoir-faire et Innovation en Agroalimentaire en Afrique de l'Ouest. CIRAD 2001, 97 p.
- Spencer R.C. (2003).** *Bacillus anthracis*. *Journal of Clinical Pathology*, **56** : 182-187.
- Sraïri M.T., Alaoui I.H., Hamama A., Faye B. (2005).** Relations entre pratiques d'élevage et qualité globale du lait de vache en étables suburbaines au Maroc. *Revue de Médecine Vétérinaire*, **156** : 155-162.
- Stenfors L.P., Granum P.E. (2001).** Psychrotolerant species from the *Bacillus cereus* group are not necessarily *Bacillus weihenstephanensis*. *FEMS Microbiology Letters* **197** : 223-228.
- Stenfors A.L.P., Fagerlund A., Granum P.E. (2008).** From soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. *FEMS Microbiology Review*, **32** : 579 -606.
- Stupak M., Vanderschuren H., Gruissem W et Zhang P. (2006).** Biotechnological approaches to cassava protein improvement. *Trends Food Science and Technology*, **17** : 634-641.
- Svensson B., Monthán A., Shaheen R., Andersson M.A., Salkinoja-Salonen M., Christiansson A. (2006).** Occurrence of emetic toxin producing *Bacillus cereus* in the dairy production chain. *International Dairy Journal*, **16** : 740–749.
- Swiecicka I., Van der Auwera G.A., Mahillon J. (2006).** Hemolytic and nonhemolytic enterotoxin genes are broadly distributed among *Bacillus thuringiensis* isolated from wild mammals. *Microbial ecology*, **52** : 544-51.
- Tahiri Y., Diouri A. (2004).** Antibiorésistance et consommation de viande. *Rev. Bio. Biotechnol.* **3** : 2-15.
- Tewari A., Singh S.P., Singh R. (2013).** Incidence and enterotoxigenic profile of *Bacillus cereus* in meat and meat products of Uttarakhand, India. *Journal of Food Science and Technology*, **52** : 1796 -1801. DOI 10.1007/s13197-013-1162-0.
- Thomas D.J., Morgan J.A., Whipps J.M., Saunders J.R. (2000).** Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory

- culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, **66** : 118-124.
- Thorsen L., Budde B.B., Henrichsen L., Martinussen T., Jakobsen M (2009).** Cereulide formation by *Bacillus weihenstephanensis* and mesophilic emetic *Bacillus cereus* at temperature abuse depends on pre-incubation conditions. *International Journal of Food Microbiology*; **134** : 133-9.
- Thorsen L., Hansen B.M., Nielsen K.F., Hendriksen N.B., Phipps R.K., Budde B.B. (2006).** Characterization of emetic *Bacillus weihenstephanensis*, a new cereulide-producing bacterium. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** (7) : 5118-5121.
- Thrusfield M. (2005).** Veterinary epidemiology, 3rd ed. Oxford, UK, Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, USA. 610 p.
- Ticknor L.O., Kolstø A.B., Hill K.K., Keim P., Laker M.T, Tonks M., Jackson P.J. (2001).** Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism Analysis of Norwegian *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* Soil Isolates. *Applied and Environmental Microbiology*, **67** : 4863-4873.
- Toka D.M. (1998).** Conservation longue durée des pâtes de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) pour la préparation du placali et de l'attiéké : Étude de leur composition physico-chimique et microbiologique. Thèse de Doctorat 3<sup>ème</sup> cycle, Université de Cocody-Abidjan, 104 p.
- Toma B., Dufour B., Sanaa M. (2002).** Généralités sur l'analyse de risque. *Epidémiologie et santé animale*, **41** : 5-17.
- Tourette I., Messad S., Faye B. (2002).** Impact des pratiques de traite des éleveurs sur la qualité sanitaire du lait de chamelle en Mauritanie. *Revue d'élevage et médecine vétérinaire des pays tropicaux*, **55** : 229-233.
- Traoré S.G. (2013).** Risques de contraction des affections à *Vibrio* sp. et à *Paragonimus* sp. Liés à la consommation des crabes et des crevettes vendus sur les marchés d'Abidjan et de Dabou. Thèse de doctorat unique, Université Nangui Abrogoua, UFR des Sciences et Technologies des Aliments, 198 pp. Soutenue le 23/07/2013, Abidjan, Côte d'Ivoire.
- TSCA (1997).** Final risk assessment of *Bacillus licheniformis*. (TSCA). Disponible à <http://www.epa.gov/oppt/biotech/pubs/pdf/fra005.pdf>. Consulté le 09/07/2014.
- Vacheyrou M., Normand A-C., Guyot P., Cassagne C., Piarroux R., Bouton Y. (2011).** Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from

- stables of sixteen French farms. *International journal of food microbiology*, **146** : 253–262.
- Vaerewijck M.J.M., De Vos P., Lebbe L., Scheldeman P., Hoste B., Heyndrickx M. (2001).** Occurrence of *Bacillus sporothermodurans* and other aerobic spore-forming species in feed concentrate for dairy cattle. *Journal of Applied Microbiology*, **91** : 1074-1084.
- Valero M., Hernández-Herrero L.A., Fernández P.S., Salmerón M.C. (2002).** Characterization of *Bacillus cereus* from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests. *Food Microbiology*, **19** : 491–499.
- Valero M., Hernandez-Herrero L.M., Giner M.J (2007).** Survival, isolation and characterization of a psychrotrophic *Bacillus cereus* strain from a mayonnaise-based ready-to-eat vegetable salad. *Food Microbiology*; **24** : 671-7.
- Van der Auwera G.A., Timmery S., Hoton F., Mahillon J. (2007).** Plasmid exchanges among members of the *Bacillus cereus* group in foodstuffs. *International Journal of Food Microbiology*, **113** (2) : 164-172.
- Vignola C.L. (2002).** Science et technologie du lait : transformation du Lait (2<sup>ème</sup> Eds). École polytechnique de Montréal, ISBN:3-25-29 pp 600.
- Vilain S., Luo Y., Hildreth M.B., Brözel V.S. (2006).** Analysis of the Life Cycle of the Soil Saprophyte *Bacillus cereus* in Liquid Soil Extract and in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, **72** : 4970-4977.
- Vilas-Boas G., Sanchis V., Lereclus D., Lemos M.V., Bourguet D. (2002).** Genetic differentiation between sympatric populations of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. *Applied Environmental of Microbiology*, **68** : 1414 – 1424.
- Vilas-Boas G.T., Peruca A.P., Arantes O.M. (2007).** Biology and taxonomy of *Bacillus cereus*, *Bacillus anthracis*, and *Bacillus thuringiensis*. *Canadian Journal of Microbiology*, **53** : 673-687.
- Vissers M.M.M., Te Giffel M. C., Driehuis F., De Jong P., Lankveld J. M. G. (2007).** Predictive modeling of *Bacillus cereus* spores in farm tank milk during grazing and housing periods. *Journal of Dairy Science*, **90** : 281-292.
- Vose D. (2000).** Risk Analysis. A quantitative guide. Willey, pp 418.
- Wahab T., Hjalmarsson S., Wollin R., Engstrand L. (2005).** Pyrosequencing *Bacillus anthracis*. *Emerging Infectious Diseases*, **11** : 1527-31.

- Weber F. (2011).** Réfrigération du lait à la ferme et organisation des transports. Étude FAO production et santé animale N°47. Rome.
- Wijnands L.M., Dufrenne J.B., Rombouts F.M., in 't Veld, P.H., van Leusden F.M., (2006).** Prevalence of potentially pathogenic *Bacillus cereus* in food commodities in The Netherlands. *Journal of Food Protection*, **69** : 2587-2594.
- Witkowska A.M., Hickey D.K., Alonso-Gomez M., Wilkinson M.G. (2011).** The microbiological quality of commercial herb and spice preparations used in the formulation of a chicken supreme ready meal and microbial survival following a simulated industrial heating process. *Food Control*, **22** : 616-625.
- Yapi-Gnaoré C.V., N'Goran K. E., Fantodji T.A., Ahoussou N. (2009).** Influence des facteurs de production sur l'élevage laitier périurbain des régions de savane et de forêt de Côte d'Ivoire. *Journal of Applied Biosciences*, **19** : 1065 – 1073.
- Youan-Bi A (2008).** Efficacité managériale des éleveurs de bovins en Côte d'Ivoire : cas des départements de Toumodi et de Korhogo, Thèse Unique de doctorat de l'Université de Cocody, UFR Sciences Économiques et de Gestion, 170 pp, Soutenue le 28 juin 2008, Abidjan.Z
- Zarguili I., Maache-Rezzoug Z., Loisel C., Doublié J.-L. (2006).** Influence of DIC hydrothermal process conditions on the gelatinization properties of standard maize starch. *Journal of Food Engineering*, **77** : 454 - 461.
- Zhou G., Liu H., He J., Yuan Y., Yuan Z. (2008).** The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *International Journal of Food Microbiology*, **121** : 195–200.
- Ziane M., Desriac N., Le Chevalier P., Couvert O., Moussa-Boudjemaa B., Leguérinel I. (2014).** Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous. *Food Control*, **45** : 16-21.



**PUBLICATIONS,  
CHAPITRES DE LIVRE ET  
COMMUNICATIONS**

**A. Contribution avec comité de lecture**

1. **Yobouet, B.A., Kouamé-Sina, S.M., Dadié, A., Makita, K., Delia, G., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2014)**. Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Côte d'Ivoire and possible health implications. *Dairy Science & Technology*, **94** (1), 51-60. DOI 10.1007/s13594-013-0140-7.
2. **Yobouet, B.A., Dadié, A., Traoré S.G., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2016)**. Contamination par *Bacillus cereus* de l'*attiéké* produit dans le secteur informel au sud de la Côte d'Ivoire et gestion du risque par le réchauffage hydrothermique, *International Journal of Innovation and Applied Studies*, **15** (3), 637-654.
3. **Yobouet, B.A., Dadié, A., Djè, K.M., Makita, K., Delia, G., Bonfoh, B., Meile, L.** PCR-mediated analysis of the enterotoxigenic potential and antibiotic susceptibility of *Bacillus cereus* group isolates from traditionally marketed raw milk in Abidjan, Côte d'Ivoire, *Microbial pathogenesis, Soumis, Octobre 2015*.

**B. Chapitres de livre**

1. **Yobouet, B.A., Roesel, K., Kouamé-Sina, S.M., Dadié, A., Makita, K., Delia, G., Meile L., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2015)**. When clean milk production cannot be assured, boiling before consumption is non-negotiable. *In: Roesel K. and Grace D. (eds) Food safety and informal markets: Animal products in sub-saharan Africa. International Livestock Research Institute (ILRI), New York (USA). ISBN: 978-1-138-81873-6 (hbk) pp. 166 - 170.*
2. **Kouamé-Sina, S.M., Roesel, K., Yobouet, B.A., Costard, S., Dadié, A., Makita, K., Delia, G., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2015)**. Hand-washing is likely to turn Ivoirian milk into a safe and competitive product. *In: Roesel K. and Grace D. (eds) Food safety and informal markets: Animal products in sub-saharan Africa. International Livestock Research Institute (ILRI), New York (USA). ISBN: 978-1-138-81873-6 (hbk) pp. 161 – 165.*

3. **Roesel K., Grace D., Makita K., Bonfoh B., Kang'ethe E., Kurwijila L., Hendrickx S., McCrindle C., Tano-Debrah K., Zewde G., Matusse H., Bomfeh K., Desissa F., Datté Y.A.A., Traoré S.G., Appiah J., Ndongo F., Spengler M., Kouamé-Sina S.M., Kilango K., Yobouet B. A., Sow I., Amenu K. (2015).** Can participation improve food safety? *In*: Roesel K. and Grace D. (eds) Food safety and informal markets: Animal products in sub-saharan Africa. International Livestock Research Institute (ILRI), New York (USA). ISBN: 978-1-138-81873-6 (hbk) pp. 44-68.
  
4. **Roesel K., Grace D., Yobouet B. A., Traoré S.G., Kouamé-Sina S.M., Datté Y.A.A., Koné B.V., Ndongo F., Sow I., Bomfeh K., Mwai C., Kago J., Kilango K., Amenu K., Spengler M., Desissa F., Appiah J., Toyomaki H., Kabui K., Mahundi E., Oguttu J., Ramrajh S., Molefe M., Heeb A. (2015).** Understanding values and culture is crucial for food safety management. *In*: Roesel K. and Grace D. (eds) Food safety and informal markets: Animal products in sub-saharan Africa. International Livestock Research Institute (ILRI), New York (USA). ISBN: 978-1-138-81873-6 (hbk) pp. 84-105.

#### *C. Newsletters*

**Yobouet B. A. (2012).** *L'attiéké mal conservé et mal réchauffé, quels risques ? Bulletin d'information du CSRS, N°004, p 39.*

#### *D. Communications orales*

1. **Yobouet B. A., Dadié A., Meile L., Bonfoh B., Djè K. M. (2012).** Facteurs de virulence et profil de résistance des bactéries du groupe *Bacillus cereus* isolées de l'*attiéké* vendu à Abidjan, Côte d'Ivoire. *In* : 5<sup>ème</sup> rendez-vous de l'Observatoire des Microorganismes aux anti-Infectieux en Côte d'Ivoire (ORMICI), 02 Février 2012, Institut Pasteur, Côte d'Ivoire.
  
2. **Yobouet B. A., Kouamé-Sina S.M., Dadié A., Makita K., Grace D., Meile L., Djè K. M., and Bonfoh B. (2012).** *Bacillus cereus*: a potential or a threat for food production in Côte d'Ivoire? *In*: CSRS Scientific Seminar, Abidjan, CSRS, 8 Mars 2012.

3. **Yobouet B. A., Kouamé-Sina S. M., Dadié A., Makita K., Delia G., Meile L., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2011).** *Bacillus cereus* risk assessment in raw milk consumed in the informal dairy sector in Côte d'Ivoire. In : 1<sup>er</sup> Congrès international sur les agents pathogènes à l'interface homme-animal (ICOPHAI), 15 Septembre 2011, Addis-Abeba, Éthiopie.
  
4. **Yobouet B. A., Kouamé S M., Dadié A., Makita K., Djè K M., Bonfoh B. (2010).** Risque de contamination par *Bacillus cereus* du lait cru de vache produit dans les élevages traditionnels à Abidjan. In : Colloque national sur l'Analyse Participative des Risques des Denrées Alimentaires d'Origine Animale (APR/DAOA), Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Abidjan du 02 au 04 Juin 2010.

#### *E. Communications écrites*

1. **Yobouet, B.A., Kouamé-Sina, S.M., Dadié, A., Makita, K., Delia, G., Meile, L., Djè, K.M., Bonfoh, B. (2012).** Caractérisation moléculaire et résistance aux antibiotiques de *Bacillus cereus* isolées dans la chaîne de production locale du lait à Abidjan, Côte d'Ivoire. In : 5<sup>ème</sup> rendez-vous de l'Observatoire des Micro-organismes aux anti-Infectieux en Côte d'Ivoire (ORMICI), Institut Pasteur de Côte d'Ivoire, Abidjan, 02 Février 2012.
  
2. **Yobouet B.A., Dadié A., Djè K.M., Meile L., Bonfoh B. (2011).** L'*attiéké* mal conservé et mal réchauffé peut provoquer des maux de ventre, diarrhées, vomissements et nausées. Journées Portes Ouvertes des 60 ans du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Abidjan, 1<sup>er</sup> au 07 septembre 2011.



**PUBLICATION 1**

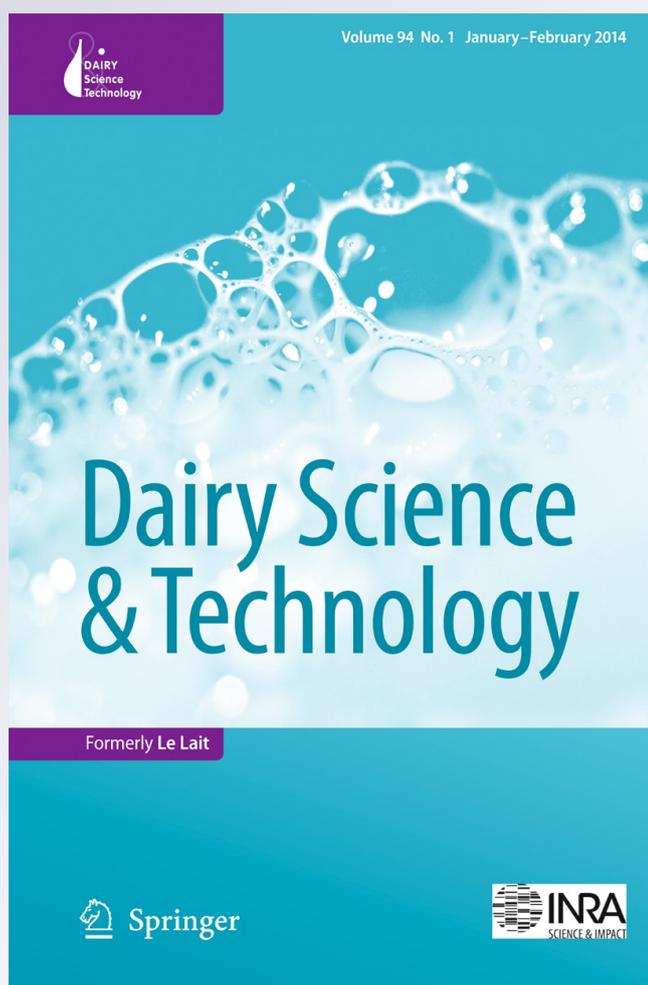
# *Contamination of raw milk with Bacillus cereus from farm to retail in Abidjan, Côte d'Ivoire and possible health implications*

**Bassa Antoine Yobouet, Sylvie Mireille Kouamé-Sina, Adjéhi Dadié, Kohei Makita, Delia Grace, Koffi Marcellin Djè & Bassirou Bonfoh**

**Dairy Science & Technology**  
Official journal of the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) Formerly 'Le Lait'

ISSN 1958-5586  
Volume 94  
Number 1

Dairy Sci. & Technol. (2014) 94:51-60  
DOI 10.1007/s13594-013-0140-7



**Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by INRA and Springer-Verlag France. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your article, please use the accepted manuscript version for posting on your own website. You may further deposit the accepted manuscript version in any repository, provided it is only made publicly available 12 months after official publication or later and provided acknowledgement is given to the original source of publication and a link is inserted to the published article on Springer's website. The link must be accompanied by the following text: "The final publication is available at [link.springer.com](http://link.springer.com)".**

## Contamination of raw milk with *Bacillus cereus* from farm to retail in Abidjan, Côte d'Ivoire and possible health implications

Bassa Antoine Yobouet · Sylvie Mireille Kouamé-Sina ·  
Adjéhi Dadié · Kohei Makita · Delia Grace ·  
Koffi Marcellin Djè · Bassirou Bonfoh

Received: 25 March 2013 / Revised: 29 May 2013 / Accepted: 30 May 2013 /

Published online: 27 June 2013

© INRA and Springer-Verlag France 2013

**Abstract** In Africa, milk and dairy products play an important role in human nutrition but could represent a risk to human health, due to poor hygiene throughout the production chain. This study aimed firstly to assess the contamination of raw milk produced in traditional dairy farms in Abidjan with *Bacillus cereus* from farm to retail and secondly to assess the associated health risk for consumers in informal markets using a participatory approach. In total, 320 samples including 150 milk samples were collected in 15 purposively selected traditional dairy farms from four sites of Abidjan and analysed according to EN ISO 7932:2004 with slight modification. In addition, a survey was conducted in the three informal markets with 188 individuals who bought milk. *B. cereus* was found in 27% of the udder milk samples while 41% of the samples taken from seller's pooled milk contained *B. cereus*. Out of the 183 milk consumers, 14% reported daily consumption of unheated milk, indicating the high probability of exposure to *B. cereus* and other foodborne illnesses. After milk consumption, 13% of consumers reported that they contracted a foodborne illness. In conclusion, milk produced and sold in informal markets in Abidjan represents a risk

B. A. Yobouet · S. M. Kouamé-Sina · A. Dadié · K. M. Djè  
Department of Food Science and Technology, Laboratory of Biotechnology and Food Microbiology,  
University of Nangui Abrogoua, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

B. A. Yobouet (✉) · S. M. Kouamé-Sina · B. Bonfoh  
Environment and Health Department, Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire,  
01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire  
e-mail: antoine.yobouet@csrs.ci

B. A. Yobouet  
e-mail: bassaantoine2007@yahoo.fr

K. Makita · D. Grace  
International Livestock Research Institute (ILRI), PO Box 30709, Nairobi, Kenya

K. Makita  
Rakuno Gakuen University, 582 Bunkyo-dai Midorimachi, Ebetsu 069-8501, Japan

for consumers' health and *B. cereus* is one possible cause. Milk quality could be improved by good hygiene practices, strengthening and targeting educational interventions and effective monitoring throughout the production and delivery chain.

**Keywords** Raw milk · *Bacillus cereus* · Risk · Health · Abidjan

## 1 Introduction

In Africa, milk and dairy products play an important role in human nutrition. Milk production is one of the most important livestock activities in West Africa and contributes to approximately 34% of the income of the milk producer (CSAO-OCDE/CEDEAO 2008). In Côte d'Ivoire, milk production fills only 10–18% of national demand for dairy products (BAD 2002). Approximately 92% of farmers are small scale (Youan-Bi 2008) and the majority of fresh milk is sold directly to consumers by farmers and small-scale traders in informal markets.

Most herders and milkers have little understanding of the hygiene and sanitary aspects of milk production. The practices of herders, milkers, collectors and sellers throughout the production chain do not adequately prevent or reduce contamination by pathogens capable of causing foodborne illnesses amongst consumers. *Bacillus cereus*, a common soil inhabitant, is one such pathogen. It is often present in milk and dairy products and considered an emerging opportunistic pathogen and an indicator of environmental contamination (Larsen and Jorgensen 1997). It is responsible for two different types of foodborne illnesses in humans, namely diarrhoeal and emetic forms, which are attributed to the bacteria's toxins (Rajkovic et al. 2008).

The impact of *B. cereus* on milk quality has never been studied in Abidjan, the largest city in Côte d'Ivoire. This study aimed at assessing the contamination of raw milk produced in traditional dairy farms in Abidjan with *B. cereus*, from the farm to retail, and to assess the risk for consumers in informal markets using a participatory approach. To achieve these objectives, (a) the milk production and marketing systems in Abidjan were characterised, (b) *B. cereus* isolates were identified at different stages of the production chain and (c) the risk to consumers was assessed through a survey relating to the consumption of raw milk and potential risk factors were identified.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Study area

We conducted a cross-sectional study of the traditional dairy production system and informal marketing chain for raw milk in Abidjan. Four milk production sites were selected in peri-urban areas of Abidjan: Port-Bouët abattoir (four farms), Songon-té (one farm), Lièvre-rouge in Yopougon (two farms) and N'dotré Abobo (eight farms). Three of these four sites had informal raw milk markets and were selected for sampling pooled milk from sellers and for interviewing milk sellers: Port-Bouët abattoir (six sellers), Lièvre-rouge in Yopougon (two sellers) and Abobo-derrière rails (seven sellers). These sites were selected purposively, based on the population

density, importance of the markets for the traditional dairy sector and the willingness of the actors (herdsmen, livestock owners, milk collectors and sellers) to participate in the study. The sites selected were estimated to incorporate 70% of traditional milk production chain in Abidjan.

## 2.2 Milk and water samples

Samples were collected on 17 occasions between October 2008 and September 2009, in the early morning after Muslim prayer time between 6:30 and 8:00 a.m. To identify the sources of contamination with *B. cereus*, different types of samples were aseptically collected before milking. Firstly, a pot containing 100 mL sterile distilled water was exposed to the open environment in an area where cows are milked for 15 min to assess environmental bacterial pollution. Secondly, the herder's milk containers were washed with 100 mL sterile distilled tap water and the recovered water was then collected in a sterile container to determine the contamination of the containers. Thirdly, swabs were collected from the skin of the udders of each cow milked. Fourthly, swabs from the hands of each milker were sampled. Fifthly, if farmers used a water storage container for water for household use, a volume of 100 mL of tap water from the household water storage container was collected in 150 mL sterile pots. To determine the points along the "farm to retail" chain at which contamination with *B. cereus* could occur, samples (100 mL aliquots) were collected aseptically in sterile 150 mL pots from the following three steps of milk production chain: (a) raw milk directly taken from all four teats of each cow after removal of the first jet of milk; (b) bulk milk from each farm, after brief mixing; and (c) pooled milk from sellers in informal markets. All samples examined are showed in Table 1. Immediately after collection, samples were chilled in an ice cooler box at 4 °C and transported to the laboratory of the Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS) for analysis within 2 h after sampling.

## 2.3 Isolation and identification of *B. cereus*

In total, 320 samples including 150 milk samples were collected for the identification and quantification of *B. cereus*. Samples were decimal diluted according to standard NF V 08-010 (AFNOR 1996) and aliquots of 0.1 mL from appropriate dilutions were plated on sterile Mossel agar medium (Merck, Germany) according to the standard EN ISO 7932:2004 (European Standard EN ISO 7932 2004) with a slight modification. For this, haemolysis test on sheep blood agar was replaced by biochemical tests. Gram stain, motility, catalase production and fermentation of glucose anaerobically were determined. The number of *B. cereus* per millilitre was calculated according to the European Standard ISO 7218 (2007).

## 2.4 Participatory risk assessment of the production chain of local raw milk

Farmers were interviewed using a structured questionnaire in order to obtain information about the dairy production system, milk handling, hygiene and sanitary conditions of the farms.

**Table 1** Counts and prevalence of *Bacillus cereus* at critical milk handling points and in potential sources of contamination

Samples	Count log (CFU.mL <sup>-1</sup> )			Number and percentage (%) of contaminated samples by <i>B. cereus</i>	Number of samples examined
	Minimum	Mean ± SD	Maximum		
Critical points of contamination					
Udder milk	2.6	2.6±0.6	4.1	32 (27)	119
Farm's bulk milk	2.3	2.8±0.6	3.7	4 (29)	14
Seller's pooled milk	2.0	2.9±1.0	4.5	7 (41)	17
Total				43 (29)	150
Sources of contamination					
Udder skin	1.0	2.2±0.6	5.5	73 (65)	113
Tap water from the household water storage container	2.1	2.6±0.7	3.5	3 (60)	5
Environment (air)	1.0	1.8±0.5	2.5	8 (53)	15
Hand of milker	1.5	2.3±0.4	2.9	9 (41)	22
Farmer containers	1.6	1.8±0.5	2.1	4 (33)	15
Total					170

SD standard deviation

An assessment of the impact of raw milk consumption on consumer health was conducted through consumer surveys. A total of 188 individuals who bought milk in the three informal markets were interviewed at the selling points. The questionnaire included questions relating to consumers' perceptions of the benefits of milk, consumption patterns, quantity and frequency of milk consumption and history and severity of illness following consumption of raw milk. Basic demographic information such as age, educational level and religion were also collected. The severity of adverse health effects due to milk consumption was determined by a scale ranging from 1 to 10, defined as follows: (1–3) mild illness, (4–8) severe illness and (9–10) very severe illness resulting in hospitalisation. Additionally, four focus group discussions were conducted in order to understand the practices and risk behaviours observed throughout the production chain and during milk consumption, such as knowledge of foodborne illness and factors influencing raw milk consumption. Each focus group included the livestock herders, the milkers, the livestock owners, the milk collectors, the milk sellers and the milk consumers.

## 2.5 Statistical analysis

All data were analysed with the statistical programme IBM SPSS version 19 (French version) for Windows (SPSS Inc., Chicago, USA). Descriptive statistics such as prevalence, mean and standard deviation were calculated for quantitative variables. Geometric and log-transformed means were used to calculate bacterial load. The least significant difference between the mean was determined. The relative risk (RR) of reported illness after milk consumption was calculated for various hypothesised risk factors. The mean probability of ingestion of raw milk contaminated by *B. cereus* at

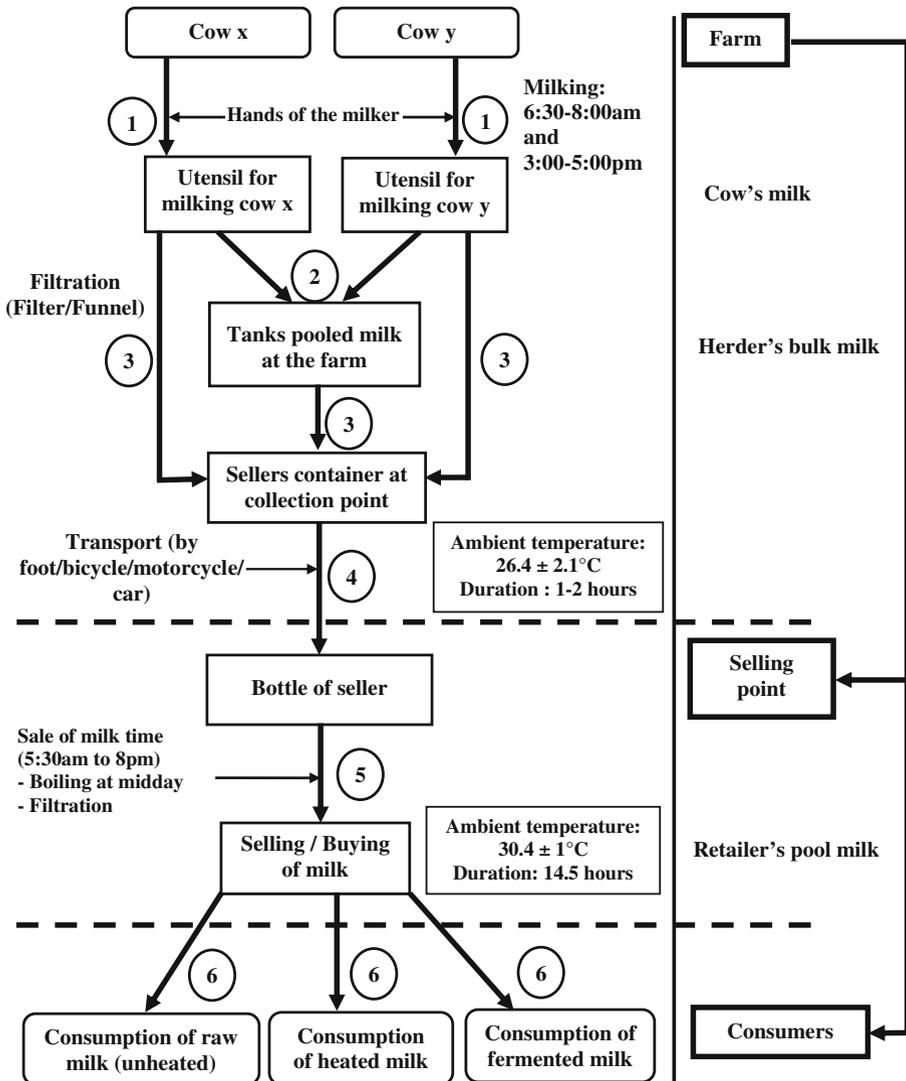
the level posing a risk to human health was calculated as the proportion of raw milk that had not undergone any heat treatment multiplied by the proportion of milk sales in excess of acceptable limits. These acceptable limits ( $m=50$  CFU.mL<sup>-1</sup>,  $M=500$  CFU.mL<sup>-1</sup>, infectious dose=10<sup>5</sup> CFU.mL<sup>-1</sup>) were defined using a combination of different regulations described elsewhere (Clabots 2007; European 2007). The threshold for statistical significance was set at  $p<0.05$ .

### 3 Results and discussion

The milk production chain from farm to consumer in the informal sector in peri-urban areas of Abidjan is shown in Fig. 1. High humidity, mud and animal excrement were present in all milking areas. The milking environment for 94% farms was deemed to be unsafe. Before, during and after milking, the skin of the udder and the hands of the milkers were not cleaned or disinfected. Soap and disinfectant were also not used. Only one milker washed the utensils during all of the stages of milking. Calves usually suckled before milking. The milk was transported and distributed from farmers to sellers without cooling or heating. The unhygienic and unsanitary methods of milk production identified in the present study have also been described by several authors in Bamako, Mali (Bonfoh et al. 2003) and Niamey, Niger (Siousarran 2003). The practices identified could lead to contamination of raw milk on the farm with environmental *B. cereus*. Other sources of contamination are udder infections, addition of contaminated water and environmental contamination between farm and point of retail.

The average loads and the prevalence of *B. cereus* along the milk production chain from farmers to sellers are shown in Table 1. Of the *B. cereus* positive (7/17) pooled milk samples from sellers, three (18%) contained *B. cereus* from  $1.7\pm 0.5$  to  $2.7\pm 0.8$  log CFU.mL<sup>-1</sup> and four (23%) contained *B. cereus* from  $2.7\pm 0.8$  to  $5.0\pm 0.8$  log CFU.mL<sup>-1</sup>. In view of international standards, 18% of the pooled milk from sellers was classified to be of poor microbiological quality and 23% as very poor, posing a risk to human health. All of the contaminated pooled milk from sellers was above acceptable limits. *B. cereus* was found in 29% of the milk samples. Improper handling and temperature abuse between milking and retail would support growth of *B. cereus*. Indeed, the proportion of contaminated milk with *B. cereus* increased significantly from 27% to 41% from cows' udders to sellers' containers. Along the milk production chain, cows' udders and containers of herders and sellers are the critical points where the milk was contaminated by *B. cereus*. The udder skin, the tap water used by milker from household water container and the environment were the main sources of contamination (Table 1). The average load of *B. cereus* in the environment, on the udder skin and in the tap water used by milkers from household water container was  $1.8\pm 0.5$ ,  $2.2\pm 0.6$  and  $2.6\pm 0.7$  log CFU.mL<sup>-1</sup>, respectively. Milker's hands and utensils used for milking were secondary sources of contamination of milk by *B. cereus*, as prevalences were determined to be lower.

The consumer's survey is currently given in Table 2. Only milk consumers were included in these calculations. The results showed that out of the 188 individuals who had bought milk at retail point, 183 (97%) consumed milk, 59 (32%) of these consumed milk daily and 112 (61%) consumed milk 1 to 5 days/week. On average,



**Fig. 1** The informal milk production chain from farm to consumer in Abidjan. (1) Milking, (2) filling the tank, (3) collection, (4) transport, (5) selling, (6) milk consumption trends

0.44±0.6 L of milk was consumed per person each day. Overall, 52% (96/183) of the surveyed population consumed milk without any heat treatment. Nearly 14% (25/183) of consumers consumed unheated milk daily. Focus group discussion revealed that producers, sellers and some consumers believed that raw milk was of better quality than boiled milk, and they preferred to drink raw milk. They believed that milk consumption did not ever cause illness. The raw milk produced in the study area was used for cultural rituals (68%) and personal consumption (97%). Rituals involved distributing raw milk with bread products as a gift to family members and neighbours, particularly children as recommended by Muslim tradition. The results are in line with previous reports, in which offering milk to children is a method of

**Table 2** Characteristics of milk customers and consumption behaviours

Characteristic	Number of customers (n=188)	Percentage
Sex of customers		
Male	146	77.7
Female	42	22.3
Educational level of customers		
No schooling	44	23.4
Primary school	30	16.0
Secondary school	24	12.8
University	8	4.3
Koranic school	52	27.7
No Koranic school	13	6.9
Primary Koranic school	13	6.4
Secondary Koranic school	5	2.7
Religion of customers/consumers		
Christian	6	3.2
Muslim	181	96.3
Others	1	0.5
Age of customers/consumers		
≤18 years	8	4.4
19–49 years	139	76.0
50–59 years	19	10.4
≥60 years	11	6.0
Not determined	6	3.3
Milk consumption patterns		
Consumption of milk		
No	5	3
Yes	183	97
-Heated milk	87	47
-Unheated milk	96	52
✓ Daily consumption of unheated milk	25	14
Frequency of milk consumption		
Occasionally (least 1 day every 2 months)	3	2
One to 2 days/month	9	5
One to 5 days/week	112	61
Daily	59	32

purification because children are considered to be pure and holy (Fokou et al. 2010). Indeed, the study population considered raw milk as a natural product because it had been modified in any way. Thus, the high frequency of consumption of unheated milk (at least among consumers surveyed), sociocultural factors and consumers' mis-perception of milk quality (not boiling milk, milk cannot cause illness) could

**Table 3** Health implications linked to milk consumption among 183 consumers in informal markets in Abidjan, Côte d'Ivoire

Parameters	Number of milk consumers (n=183)	Percentage
Health implication linked to milk consumption		
Diseases	23	13
No diseases	160	87
Symptoms reported to be linked to milk consumption (n=23)		
Diarrhoea	18	54
Stomach pains	7	21
Fever	4	12
Vomiting and nausea	3	9
Cough	1	3
Total	33 cases	100.0
Onset of symptoms links to milk consumption (h)		
20	8	35
24	9	39
36	6	26
Duration of symptoms (h)		
Less than 24	5	22
More than 24–48	12	52
>48	6	26
Severity of diseases		
Mild illness (continues working)	12	52
Severe illness (stay at home)	8	35
Very severe illness (stay in hospital)	3	13

contribute to an overall increased risk, particularly to children is a risk factor for milk-borne disease.

By multiplying the proportion of raw milk that had not undergone any heat treatment (52%) with the proportion of seller's milk samples over acceptable limits (41%), it was estimated that the probability of consuming milk contaminated by *B. cereus* at the level posing a risk to human health was 21%. No one reported being ill after milk consumption at the time of interview, but symptoms potentially associated with food poisoning due to the consumption of milk were reported by milk consumers. In our study, symptoms potentially associated with food poisoning linked to the consumption of milk were reported by 13% (23/183) of milk consumers and most of these symptoms (74%) occurred less than 24 h after milk consumption (Table 3). The occurrence of self-reported gastrointestinal illness was significantly related to the consumption of unheated local milk (RR=2.9; 95% CI=1.1–7.7,  $p=0.025$ ). The fraction of risk attributable to the consumption of unheated milk was 61% and the attributable risk was 11%. Symptoms most often mentioned were diarrhoea (54%) and stomach pains (21%; Table 3). Of these illnesses, 13% were very severe requiring a stay for 1 to 3 days in a hospital. These results are similar to the findings of other studies (Dierick et al. 2005; Dromigny 2008; Oliver et al. 2009) which reported abdominal pain, cramps and diarrhoea as the main

symptoms of the diarrhoeal syndromes. Sometimes, illnesses reported due to *B. cereus* can be severe, requiring hospitalisation and even sometimes resulting in death (Dierick et al. 2005; Dromigny 2008).

#### 4 Conclusion

This study is to our knowledge the first reported assessment of *B. cereus* in the traditional milk value chain in Abidjan. Milk was shown to be heavily contaminated by *B. cereus* throughout the production chain from the farm to retail point. It is likely that milk produced and sold in informal markets in Abidjan presents a risk for consumers' health and *B. cereus* is one possible cause. Therefore, steps should be taken to improve milk quality including systems for monitoring milk quality and providing incentives for meeting quality standards are recommended. However, as milk and dairy products provide important contributions to livelihoods and nutrition, precaution is needed to ensure that measures taken to improve quality do not jeopardize these benefits. This study contributes to the understanding of the contamination of raw milk in Abidjan by *B. cereus* and the possible health implications.

**Acknowledgments** The present study was conducted under the Safe Food Fair Food project of the International Livestock Research Institute and funded jointly by the German Federal Ministry of International Cooperation (GIZ), the Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire, the Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, the Federal Commission for Scholarships for Foreign Students of the Swiss Confederation (ref. 2010.0197/Ivory Coast/OP) and by ETH Zürich through the laboratory of food biotechnology. We sincerely thank all partners. The management team and laboratory staff at the CSRS and all participating farmers are gratefully acknowledged. Finally, we thank Professor Christophe Lacroix and Professor Leo Meile who kindly welcomed the primary author in the Laboratory of Food Biotechnology at the ETH and Ms. Kristina Rosel, Dr. Solenne Costard and Dr. Anna Dean for their support during the drafting of this manuscript

**Conflict of interest** There is no conflict of interest concerning this manuscript.

#### References

- AFNOR (1996) Norm NF V 08-010. In: Microbiologie des aliments - Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen. Analyse microbiologique recueil de normes françaises. 6ème Ed. Paris, pp 67–75. [Food microbiology—general rules for preparation of dilutions for the analysis. Microbiological analysis compendium of French standards]
- BAD (2002) Projet de Développement de l'Elevage phase II. Evaluation à mi-parcours, Rapport définitif. BDPA, Abidjan, Côte d'Ivoire, pp 215. [Proposed livestock development phase II. Mid-term review, final report]
- Bonfoh B, Wasem A, Traoré AN, Fané A, Spillmann H, Simbé CF, Alfaroukh IO, Nicolet J, Farah Z, Zinsstag J (2003) Microbiological quality of cows' milk taken at different intervals from the udder to selling point in Bamako (Mali). Food Control 14:495–500
- Clabots (2007) Critères microbiologiques des denrées alimentaires, lignes directrices pour l'interprétation. Luxembourg. F-054 Rev01, pp 30. [Microbiological Criteria for Foodstuffs, guidelines for interpretation]. <http://www.securite-alimentaire.public.lu/>
- CSAO-OCDE/CEDEAO (2008) Elevage et marché régional au sahel et en Afrique de l'ouest. Potentialités et défis. Edn Club du Sahel et de l'Afrique de l'ouest/OCEDE. 182 p. [Livestock and regional market for the Sahel and West Africa. Opportunities and challenges]

- Dierick K, Van Coillie E, Swiecicka I, Meyfroidt G, Devlieger H, Meulemans A, Hoedemaekers G, Fourie L, Heyndrickx M, Mahillon J (2005) Fatal family outbreak of *Bacillus cereus*-associated food poisoning. *J Clin Microbiol* 43(8):4277–4279
- Dromigny E (2008) *Bacillus cereus*. Monographies de microbiologie, Edn Tec & Doc, Lavoisier, Paris [Monographs of Microbiology]
- European Standard EN ISO 7932 (2004) Microbiology of food and animal feeding stuffs—Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*—Colony-count technique at 30°C (ISO 7932:2004). 24 pp
- European Standard ISO 7218 (2007) Microbiology of food and animal feeding stuffs—general requirements and guidance for microbiological examinations. 66 pp
- European Union (2007) Commission Regulation (EC) no. of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No. 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs. Official Journal of the European Union of 07.12.2007. L 322/12–L322/29
- Fokou G, Koné BV, Bonfoh B (2010) Mon lait est pur et ne peut pas rendre malade: motivations des acteurs du secteur informel et qualité du lait local au Mali. *Rev. Afr. Santé et Prod. Anim.* 8(S): 75–86. [My milk is pure cannot make someone sick: informal sector stakeholders' motivations and quality of local milk in Mali]
- Larsen HD, Jorgensen K (1997) The occurrence of *Bacillus cereus* in Danish pasteurized milk. *Int J Food Microbiol* 34:179–186
- Oliver SP, Boor KJ, Murphy SC, Murinda SE (2009) Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis* 6(7):793–806
- Rajkovic A, Uyttendaele M, Dierick K, Samapundo S, Botteldoorn N, Mahillon J, Heyndrickx M (2008) Risk profile of the *Bacillus cereus* group implicated in food poisoning. Report for the Superior Health Council Belgium. CSS-HGR 8316 public health implications of *Bacillus cereus* in food. 80 pp
- Siousarran V (2003) Hygiène du lait cru en zone urbaine et périurbaine de Niamey, Niger. Rapport de stage. CIRAD-EMVT; Université Montpellier II, pp 65. [Hygiene of raw milk in urban and peri-urban of Niamey, Niger]
- Youan-Bi A (2008) Efficacité managériale des éleveurs de bovins en Côte d'Ivoire : cas des départements de Toumodi et de Korhogo, Thèse Unique de doctorat de l'Université de Cocody, UFR Sciences Economiques et de Gestion, 170 pp, Soutenue le 28 juin 2008, Abidjan. [Managerial efficiency of cattle in Côte d'Ivoire: case of departments of Toumodi and Korhogo]



**PUBLICATION 2**

## Contamination par *Bacillus cereus* de l'*attiéké* produit dans le secteur informel au sud de la Côte d'Ivoire et gestion du risque par le réchauffage hydrothermique

### [ Contamination with *Bacillus cereus* of *attiéké* produced in the informal sector in the south of Côte d'Ivoire and risk management by the hydrothermal reheating ]

Bassa Antoine YOBOUET<sup>1,2</sup>, Adjéhi DADIÉ<sup>1</sup>, Sylvain Gnamien TRAORÉ<sup>2,3</sup>, Koffi Marcellin DJÈ<sup>1</sup>, and Bassirou BONFOH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui Abrogoua, Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Alimentaire (LBMA), 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>Direction Recherche et Développement, Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

<sup>3</sup>Université Péléforo Gon Coulibaly, BPV 151 Korhogo, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** This study aimed to reduce the risk of consumption of *attiéké* contaminated with *B. cereus* at doses higher than the acceptable limits. In total, 16 samples of *attiéké* freshly prepared and 306 samples of *attiéké* sold on the market were collected and analyzed according to the standard EN ISO 7932: 2004 with slight modification. The presumptive *B. cereus* isolates were identified by polymerization chain reaction (PCR). In addition, the resistance of *B. cereus* group spores to hydrothermal reheating of *attiéké* was evaluated. The results showed that *B. cereus* group was found in 25.2% of *attiéké* on sale and an average load of vegetative cells and spores were  $2.4 \pm 1.1$  log (CFU/g) and  $2.3 \pm 1.1$  log (CFU/g) respectively. *B. thuringiensis* (56%) and *B. cereus sensu stricto* (44%) were identified species. The hydrothermal reheating of *attiéké* by steam at 90°C for at least 15 min reduced *B. cereus* spores count from 4.2 log (CFU/g) in *attiéké* into  $1.8 \pm 1.0$  log (CFU/g). An average time to reduce the initial concentration of one logarithm was  $8.5 \pm 1.9$  min ( $D_{90^\circ\text{C}} = 8.5 \pm 1.9$  min). The maximum time limit of consumption of *attiéké* reheated by steam at 90°C was 18 hours. Therefore, it is recommended to reheat *attiéké* by steam for at least 15 min at 90°C before any consumption, if good hygiene practices cannot guarantee his safety.

**KEYWORDS:** Contamination, *Attiéké*, *Bacillus cereus*, Hydrothermal reheating, Côte d'Ivoire.

**RESUME:** L'objectif de cette étude était de contribuer à la réduction du risque de consommation d'*attiéké* contaminé par *Bacillus cereus* à des doses supérieures aux limites acceptables. Au total, 16 échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons d'*attiéké* en vente sur le marché ont été collectés et analysés selon la norme EN ISO 7932 : 2004. Les isolats présomptifs de *B. cereus* ont été identifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Enfin, la résistance des spores du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* a été évaluée. Les résultats ont montré que le groupe *B. cereus* a été isolé dans 25,2 % de l'*attiéké* en vente avec une charge moyenne en cellules végétatives de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) et en spores de  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g). *B. thuringiensis* (56 %) et *B. cereus sensu stricto* (44 %) ont été les espèces identifiées. Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* à une température supérieure ou égale à 90 °C pendant 15 min a réduit la concentration en spores de *B. cereus* dans l'*attiéké*, de 4,2 à  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g). Le temps de réduction décimale a été de  $8,5 \pm 1,9$  min ( $D_{90^\circ\text{C}} = 8,5 \pm 1,9$  min). Le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé à 90 °C était de 18 h. Il

est recommandé de réchauffer l'*attiéké* à la vapeur d'eau au moins 15 min à 90 °C avant toute consommation, si les bonnes pratiques d'hygiène ne peuvent pas garantir sa sécurité.

**MOTS-CLEFS:** Contamination, *Attiéké*, *Bacillus cereus*, réchauffage hydrothermique, Côte d'Ivoire.

## 1 INTRODUCTION

L'*attiéké*, est une semoule de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) fermenté, partiellement déshydratée, cuite à la vapeur d'eau et d'apparence agglomérée [1], [2]. Cet aliment est obtenu à partir de la pâte de racines fraîches de manioc selon les opérations unitaires d'épluchage, concassage ou découpage, lavage à l'eau, râpage ou broyage, fermentation, essorage, émottage, semoulage, pré-séchage, tamisage, vannage et cuisson à la vapeur d'eau [2]. C'est un aliment typiquement ivoirien, dont la consommation locale annuelle est estimée à plus de 450 000 tonnes [3], [4]. À l'origine, l'*attiéké* a longtemps été produit pour l'autoconsommation familiale, avant que l'évolution de cette production n'atteigne le niveau semi-industriel qui la caractérise actuellement. Les Adjoukrou, Alladjan et Ebrié sont les trois groupes ethniques du sud de la Côte d'Ivoire, considérés comme les plus gros producteurs et consommateurs [3], [5]. Mais de plus en plus, la production et la consommation de l'*attiéké* se sont répandues sur tout le territoire ivoirien et dans la sous-région africaine, avec les migrations des populations [6], [7]. À Abidjan, plus de 34 % des ménages consomment l'*attiéké* au moins une fois par jour avec du poisson ou de la viande [8], [9]. Par ailleurs, avec son coût jugé à la portée de toutes les bourses, l'*attiéké* est devenu l'un des aliments les plus consommés dans plusieurs pays africains où l'urbanisation rapide et les difficultés économiques ont favorisé l'augmentation du nombre de consommateurs [4], [6], [10].

L'*attiéké* est aussi exporté en Europe, en Amérique et en Asie par le biais de la diaspora noire africaine où il serait prisé et acheté à fort prix, [11], [12], [13]. La production et la commercialisation de l'*attiéké* constituent une source importante de revenus pour les acteurs de la filière manioc. Le commerce d'*attiéké* génère environ 20 à 70 milliards de francs CFA par an [4], [14] et procure aux femmes, actrices principales, une indépendance financière leur permettant de se prendre aisément en charge.

La microflore du ferment utilisé dans la préparation de l'*attiéké* est dominée par les espèces de *Bacillus* spp, qui contribuent à la détoxification du manioc, au ramollissement de la pâte de manioc au cours de la fermentation et à l'amélioration du goût et de la texture de l'*attiéké* [7], [15], [16]. Cependant, en tenant compte de certaines propriétés de la bactérie, de la non-conformité de quelques opérations de traitement de la denrée et des caractéristiques de l'environnement de production, l'*attiéké* peut être considéré comme un réservoir de microorganismes pathogènes pour l'homme, y compris les espèces du groupe *Bacillus cereus*. En effet, certains clones de *B. cereus* connus pour être particulièrement virulents, peuvent résister à la cuisson à la vapeur de la semoule, par leurs spores thermorésistantes et se retrouver dans le produit fini. De plus, l'*attiéké* se vend à l'état frais, prêt à consommer, dans un emballage ne garantissant pas une sécurité microbiologique. Le produit est conditionné soit en petites portions emballées dans des sachets plastiques non alimentaires, soit dans des récipients (cuvettes) tapissés de film plastique ou dans des paniers en raphia recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées localement "feuilles d'*attiéké*" [6], [14]. De plus, les mauvaises conditions de stockage et les fréquentes manipulations post-cuissons au cours de la commercialisation peuvent favoriser la contamination de l'*attiéké* à un niveau de charges dépassant les limites de salubrité acceptables.

Un autre facteur, favorisant une rapide dégradation, un difficile contrôle de la qualité et par conséquent le risque d'insécurité pour le consommateur, est le caractère informel des activités de la chaîne de production de l'*attiéké* [6], [17]. Ainsi, la production et la commercialisation de l'*attiéké* se font-elles essentiellement dans le secteur informel et par des petits producteurs. Cette situation est amplifiée par les conditions climatiques variées, avec la chaleur et l'humidité ambiante qui ne favorisent pas parfois la conservation adéquate du produit [18]. La conséquence, est le risque élevé de contamination microbienne, tel que rapportés par [13] et [19], qui ont révélé la présence de coliformes totaux et fécaux, de *Staphylococcus aureus* et de flore fongique de type *Fusarium* spp, dans l'*attiéké* vendu à Abidjan. À ce jour, les données d'exposition à *Bacillus cereus* des consommateurs d'*attiéké* en Côte d'Ivoire ne sont pas disponibles. Dans ce contexte, cette étude a pour objectif de contribuer à la réduction du risque de consommation d'*attiéké* contaminé par *Bacillus cereus* à des doses supérieures aux limites acceptables.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 SITES D'ÉTUDE

L'étude est de type transversal et a été réalisée sur des sites du circuit de production, de distribution et de commercialisation de l'*attiéké*, dans la ville d'Abidjan. Abidjan est la capitale économique de la Côte d'Ivoire et situé au bord de la lagune Ebrié, au sud de la Côte d'Ivoire (**figure 1**). La justification du choix de cette ville est que c'est l'une des zones d'origine, de forte production et consommation de l'*attiéké*. La production quotidienne artisanale d'*attiéké* fraîchement préparé atteint plus de 100 tonnes pour la filière artisanale [10]. Dans le cadre de cette étude, une enquête de prospection a été effectuée en Janvier 2010 à Abidjan, dans les dix communes de la ville. L'enquête a permis de sélectionner cinq communes en fonction de l'importance des circuits de production et de commercialisation d'*attiéké* qu'elles abritent. Il s'agissait de Yopougon, Abobo, Treichville, Marcory et Attécoubé. Dans ces communes, quatre sites de production artisanale de l'*attiéké* ont été sélectionnés. Ce sont Avocatier dans la commune d'Abobo, Anoumambo dans la commune de Marcory, Abobodoumé dans la commune d'Attécoubé et Azito dans la commune de Yopougon. Sur chaque site de production, quatre productrices d'*attiéké* ont été choisies. Au total, 16 productrices d'*attiéké* ont été incluses dans l'étude sur la base de leur consentement. Trois marchés de distribution et de vente en gros et demi-gros de l'*attiéké*, notamment le marché de Siporex à Yopougon, le marché d'Abobo gare à Abobo et le marché de la gare lagunaire à Treichville ont été sélectionnés (**figure 1**). Enfin, cinq quartiers ont été choisis au hasard pour le prélèvement d'échantillons d'*attiéké* vendu au détail aux abords des rues et devant les "maquis". Il s'agissait d'Avocatier et d'Aboboté à Abobo, d'Abobodoumé à Attécoubé, d'Anoumambo à Marcory et de Niangon sud à gauche à Yopougon (gare d'Azito).

### 2.2 DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES DU CIRCUIT DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION DE L'ATTIEKE

L'identification du circuit de production, de distribution et de vente de l'*attiéké* à Abidjan s'est faite à travers une enquête de prospection sur le terrain. L'enquête a consisté en une observation directe des sites et circuits de production, distribution et de vente de l'*attiéké*, pour identifier les pratiques à risques et évaluer le niveau de salubrité. L'opération a été réalisée à l'aide d'une grille d'observations préalablement élaborée.

### 2.3 COLLECTION DES ÉCHANTILLONS D'ATTIÉKÉ

Au total, 16 échantillons de 500 g d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons de 500 g d'*attiéké* en vente conditionnés dans un sachet plastique non alimentaire (**figure 2**), de masse variant de 174 à 1368 g, ont été collectés sur les différents marchés ou dans les quartiers proches des zones de production et transportés au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire et analysés dans l'heure. Les échantillons d'*attiéké* prélevés sur les marchés étaient constitués de 153 échantillons d'*attiéké* en vente un à deux jours après production et de 153 échantillons d'*attiéké* de trois à cinq jours de vente.

### 2.4 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION PRESOMPTIVE DE *BACILLUS CEREUS*

Un échantillon d'analyse de 10 g d'*attiéké* a été introduit dans 90 mL d'eau peptonée 0,1 % (Oxoid LTD, Angleterre) dans un sachet Stomacher et le mélange a été broyé pendant 1 min au Stomacher (Colworth 400, Angleterre). À partir de la suspension obtenue, des dilutions décimales successives ont été effectuées selon la norme NF V 08-010 [20]. Pour le dénombrement de spores du groupe *B. cereus*, 15 mL de la suspension ont été prélevés dans un tube et chauffés sous agitation, dans un bain-marie (Precistern, Selecta, Lyon, France) pendant 10 min à 80 °C. À partir de la suspension mère, des dilutions décimales et de la suspension ayant fait l'objet du traitement thermique, une culture a été effectuée sur gélose Mossel (Merck, Allemagne) pour le dénombrement présomptif de cellules végétatives et des spores de *B. cereus* et selon la norme NF EN ISO 7932 [21]. L'estimation de la charge moyenne en *Bacillus cereus* des échantillons a été réalisée en se servant des données du dénombrement et par calcul selon la norme ISO 7218 [22].

### 2.5 IDENTIFICATION PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE

#### 2.5.1 EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE

Au total, 90 isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont été utilisés. L'ADN génomique a été extrait par lyse thermique selon la méthode décrite par [23] avec une légère modification. Selon la taille des colonies sur la gélose PCA (Merck, Allemagne), 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées et triturées dans 0,2 mL de tampon Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl à pH

8, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS et 200 µg/mL de protéinase K) dans les microtubes de 1,5 mL (Eppendorf, France). Le mélange a été mixé puis incubé à 55 °C pendant 3 heures dans un bain-marie sous agitation (Thermomixer, Eppendorf). Après l'inactivation thermique de la protéinase K (Applichem, Germany) à 95 °C pendant 10 min, les tubes ont été refroidis à 4 °C sur de la glace pendant 5 min puis centrifugés à 20'000 g à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN a été recueilli dans un cryotube stérile, conservé à -20 °C et a été utilisé comme matrice d'ADN pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

### **2.5.2 PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL ET AMPLIFICATION DES GENES**

Le mélange réactionnel a été préparé comme décrit précédemment par [24], et [25] avec une légère modification. Le mélange réactionnel de 25 µL était composé d'eau Milli-Q stérile, de 2 % de Tween 20 (Sigma, Suisse), de 12,5 µL de PCR Master Mix 2X (Fermentas, Suisse), de 1 µM de chaque amorce (Microsynth, Balgach, Suisse) et de 1 µL de la matrice d'ADN. Les PCRs multiplex ont été réalisées avec un mélange réactionnel de 30 µL constitué de 15 µL de PCR Master Mix 2X, de 5 µL de matrice d'ADN et des autres réactifs susmentionnés. Un témoin négatif contenant 1 µL d'eau Milli-Q stérile à la place de matrice d'ADN et l'ADN des souches de référence utilisées pour le contrôle positif ont été inclus dans chaque réaction PCR.

### **2.5.3 AMPLIFICATION DES GENES 16S ADNr, MOTB ET GYRB**

L'amplification du gène 16S ADNr des isolats étudiés a été effectuée à l'aide du couple d'amorces bak4 et bak11 (**tableau 1**) pour confirmer l'absence de composés inhibiteurs de la PCR. Elle a été réalisée selon la méthode décrite par [26].

La détermination du groupe *Bacillus cereus* s'est effectuée par amplification d'un fragment spécifique du gène flagellaire *motB*, caractéristique du groupe. L'amplification du gène *motB* s'est effectuée à l'aide du couple d'amorces BCfomp1 et BCRomp1 selon la méthode décrite par [25].

L'ADN de chaque échantillon positif à l'amplification de la région spécifique de gène *motB* a été utilisé pour distinguer *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. mycooides* par PCR multiplex selon la méthode décrite par [27]. Tous les programmes d'amplification et la séquence nucléotidique des amorces utilisées sont décrits dans le **tableau 1**. Toutes les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur de type T3000 Thermocycler, Block type standard 3a, (Biometra, Allemagne).

Les produits d'amplification des gènes 16S ADNr et *motB* ont été révélés sur un gel d'agarose de 1,5 % pendant 1 h 30 min à 90 V tandis que ceux du gène *gyrB* ont été révélés sur un gel d'agarose de 2,5% pendant 25 min à 100 V. Un volume de 5 µL d'un marqueur de poids moléculaire (TriDye™, 100 pb DNA Ladder, Biolabs) a été inclus dans tous les gels pour estimer la taille des bandes d'ADN. Les gels ont été colorés dans un tampon TAE 1X contenant 2,5 mg/L d'une solution de bromure d'éthidium puis lavés à l'eau distillée, visualisés par illumination sur une plaque UV d'un dispositif d'éclairage et photographiés (Molecular Imager Gel Doc™ XR+, Bio-Rad).

## **2.6 GESTION DU RISQUE DE CONSOMMATION D'ATTIEKE CONTAMINE PAR BACILLUS CEREUS PAR RECHAUFFAGE HYDROTHERMIQUE**

### **2.6.1 DETERMINATION DE LA TEMPERATURE DE RECHAUFFAGE DE L'ATTIEKE**

La température de réchauffage de l'attiéké a été déterminée par le réchauffage à la vapeur d'eau de 150 g, de 300 g et de 450 g d'attiéké dans un couscoussier sur une cuisinière à gaz pendant 20 min. Le dispositif utilisé était constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. La température de l'attiéké réchauffé au cœur du couscoussier a été déterminée, par intervalle de 5 min, à l'aide d'un thermomètre à alcool (Total IMM, VWR, Paris, France). La température maximale atteinte a été utilisée comme température de réchauffage de l'attiéké pour déterminer le taux de survivants du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique. Dans cette étude, le pH a été considéré comme constant et égal au pH moyen de l'attiéké.

### **2.6.2 ÉTUDE DE LA SURVIE DES SPORES DU GROUPE BACILLUS CEREUS AU RECHAUFFAGE DE L'ATTIEKE**

La distribution du groupe *B. cereus* dans un échantillon d'attiéké a été considérée comme homogène. Ainsi, pour déterminer la courbe de survie ou la cinétique de destruction microbienne, 5 échantillons d'attiéké de 600 g chacun et contaminés par les spores du groupe *B. cereus* à des charges de 4,2 log (UFC/g) ont été utilisés. Chaque échantillon a été réparti en quatre portions de 150 g d'attiéké chacune. Chaque portion a été réchauffée à la vapeur d'eau à 90 °C

(température maximale de réchauffage sus déterminée), dans un couscoussier sur une cuisinière à gaz pendant 20 min. À des intervalles de 5 min, une portion de 10 g d'*attiéké* réchauffé a été prélevée du couscoussier puis broyée dans 90 mL d'eau peptonée 0,1 %. Après broyage au Stomacher, une série de dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  a été réalisée. Un volume d'un mL de la solution mère et de chaque dilution décimale a été ensemencé pour le dénombrement des spores survivantes du groupe *B. cereus* sur gélose Mossel (Merck, Allemagne). Les boîtes ensemencées en double ont été incubées à 30 °C pendant 72 h. Le temps de régénération a été noté et le taux de survivants ou le taux de survie a été calculé comme étant le nombre d'unité formant colonie (UFC) survivant au réchauffage hydrothermique au temps  $t$  rapporté au nombre initial de bactérie au temps  $t_0$ .

La cinétique de destruction microbienne ou la courbe  $\log N$  (UFC/g) a été tracée en fonction du temps de réchauffage en minute. Le temps de réduction décimale (D-valeur) ou le temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) la concentration initiale en bactéries du groupe *B. cereus* à la température létale constante de 90 °C a été calculée à partir de l'inverse de la pente négative de chaque essai, en utilisant la partie linéaire de la courbe des survivants, en  $\log$  (UFC)/g en fonction du temps en minutes, tracée sur une échelle semi-logarithmique. Ainsi, l'équation de [28] a été utilisée pour déterminer la valeur de D (Formule 1).

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad \text{Formule 1 [28]}$$

Avec  $t$  le temps de réchauffage hydrothermique,  $N$  le nombre de bactérie du groupe *B. cereus* au temps  $t$ ,  $N_0$  la concentration initiale en groupe *B. cereus* et  $D$  le temps de réduction décimale (D-valeur) ou le temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) la concentration initiale en spore du groupe *B. cereus* à la température létale constante de 90 °C.

Le temps de génération ou temps de dédoublement de la population du groupe *B. cereus*, après le réchauffage, a été déduit de la formule de [29] en tenant compte du principe de scissiparité des bactéries. Ainsi, le temps de génération a été calculé à partir de la formule 2 suivante :

$$d = \frac{t \times \log(2)}{\log N_t - \log N_0} \quad \text{Formule 2}$$

Avec  $d$  le temps de génération ou temps de dédoublement de la population,  $t$  le temps d'incubation,  $N_0$  est la concentration initiale en spore du groupe *B. cereus*,  $N_t$  le nombre de spores du groupe *B. cereus* au temps  $t$ .

## 2.7 ANALYSE STATISTIQUE

Les données ont été saisies avec le logiciel de traitement de données IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, SPSS Inc, Chicago, USA) et transférés sur Excel. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT 2014.1. Les méthodes statistiques descriptives (Fréquence, moyenne, écart-type) ont été utilisées pour les variables quantitatives. Les moyennes géométriques ont été utilisées pour le calcul des dénombrements. Les dénombrements ont été transformés en logarithme à base 10 ( $\log_{10}$ ), dans le but de normaliser les distributions. *B. cereus* étant reconnu comme un pathogène du groupe de risque 2, la formulation de l'interprétation des dénombrements a été basée sur celle d'un plan à 3 classes avec  $m = 1,7 \log$  (UFC/g),  $M = 2,7 \log$  (UFC/g) et Dose infectieuse =  $5 \log$  (UFC/g) [2], [30], [31].

## 3 RÉSULTATS

### 3.1 CARACTERISTIQUES DES CIRCUITS DE PRODUCTION, DE DISTRIBUTION ET DE VENTE DE L'ATTIEKE

L'*attiéké* est vendu sur les marchés informels à Abidjan et sa commercialisation se fait suivant deux principales voies (figure 3). D'une part et en dehors de rares productrices qui écouaient leur produit sur les marchés de gros et demi-gros, l'*attiéké* produit à Abidjan et Banlieues est essentiellement vendu sur les marchés des quartiers directement aux détaillants (Voie 1). D'autre part, l'*attiéké* produit dans les localités de l'intérieur du pays est convoyé dans les marchés de gros ou demi-gros de Siporex (Yopougon), d'Abobo gare et de Ciné cool (Abobo) et de la gare lagunaire à Treichville (Voie 2).

L'*attiéké* était conditionné dans des paniers de fortune en raphia, tapissés soit de film plastique recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées "feuilles d'*attiéké*". L'autre mode de conditionnement était caractérisé par de l'*attiéké* emballé dans des sacs ou sachets plastiques non alimentaires de 25 à 50 kg (bal d'*attiéké*). Le transport de l'*attiéké* se faisait par des cars ou minicars de transport en commun. L'activité de production, de distribution et de vente de l'*attiéké* à Abidjan était exercée par les femmes. Dans les grands marchés, les femmes étaient le plus souvent regroupées en association. La vente d'*attiéké* se faisait en gros, en demi-gros ou au détail. Cette voie (voie 2) de distribution et de vente informelle d'*attiéké* véhicule environ 60 à 70 % de l'*attiéké* consommé par les Abidjanais.

Les deux voies de distribution et de vente informelle d'*attiéké* fournissaient 85 à 95 % de l'*attiéké* consommé à Abidjan. L'*attiéké* issu des deux voies était ensuite vendu au détail sous forme de boules, emballé dans des sachets plastiques ou en vrac dans les paniers originels de livraison. Les sites de vente sont constitués des marchés des communes d'Abidjan, les abords des routes, les restaurants et les "maquis". Il existait également un mode de vente qui se faisait de « porte à porte », c'est-à-dire d'un domicile (maison) à l'autre.

### 3.2 ÉTAT SANITAIRE DES SITES DE PRODUCTION DE L'ATTIEKE

Les sites d'Azito et d'Avocatier disposaient d'un espace pour la production de l'*attiéké*. Seul le site d'Azito, disposait d'une aire aménagée, salubre où les femmes étaient regroupées en coopérative pour la production d'*attiéké*. Les trois autres sites de production d'*attiéké* manquaient de dispositifs sanitaires, de gestion des déchets solides et liquides, les aires d'éviscération et de parages collectives étaient mal entretenues.

### 3.3 CONDITIONS DE PRODUCTION ET DE VENTE DE L'ATTIEKE

Les ustensiles utilisés dans les différentes opérations de production d'*attiéké* étaient en caoutchouc dur (87,5 %) et en aluminium (12,5 %) égratignés par leur usage abusif et le manque de soins adéquats. Les semoules de manioc étaient séchées au soleil à même le sol sur des sachets plastiques ou dans des vans disposés sur des pneus usagés, sauf à Avocatier où le séchage était effectué sur des claies en hauteur. Les vans utilisés pour le séchage et le vannage des semoules de manioc étaient en raphia et badigeonnés d'une pâte obtenue par le mélange de la bouse de bovin et de la pâte de manioc. La cuisson d'*attiéké* se faisait à l'aide du bois de chauffage dans un couscoussier constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. La cuisson était constatée de façon visuelle, au goût et/ou au parfum.

Au cours de la vente, l'*attiéké* était fréquemment manipulé. Dans les restaurants et les "maquis", le service de l'*attiéké* se faisait à la main. Dans les marchés de gros et de demi-gros, les vendeuses ont rapporté que l'*attiéké* non vendu, après une semaine, était séché au soleil et stocké dans des sacs. L'*attiéké* était réchauffé à la vapeur d'eau et vendu à nouveau, surtout lorsqu'il n'y avait pas de nouvel approvisionnement. Chez les détaillants, l'*attiéké* non vendu 2 à 4 jours après production, était réchauffé à la vapeur d'eau, puis revendu.

### 3.4 PREVALENCE DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* DANS L'ATTIEKE

Au total, 43,8 % (7/16) de l'*attiéké* fraîchement préparé contre 25,2 % (77/306) de l'*attiéké* en vente étaient contaminés par le groupe *B. cereus* (tableau 2). L'*attiéké* fraîchement préparé contenait essentiellement un mélange de formes végétatives et de spores (71,4 %) de *B. cereus*. Seulement, 28,6 % d'échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé analysés ne contenaient que des formes végétatives. Aucun échantillon ne contenait uniquement que des spores. Le nombre d'échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé contenant le groupe *B. cereus* était fortement corrélé à l'état sanitaire du site de production ( $p = 0,031 < 0,05$  ;  $V = 0,745$  ;  $ddl = 3$ ) et significativement lié à la durée de cuisson de l'*attiéké* par site de production au seuil de 5% ( $Rho$  de Spearman = -1 ;  $p = 0,0001$ ). À Avocatier où la durée de cuisson était la plus élevée ( $40,5 \pm 5,1$  min), l'*attiéké* fraîchement préparé ne contenait pas le groupe *B. cereus*. Par contre, à Azito, Abobodoumé et Anoumambo où la durée de cuisson de l'*attiéké* était respectivement de 37,5 min, 33,3 min et 30,5 min, les échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé contaminés par *B. cereus* étaient plus nombreux. La proportion de ces échantillons à Azito, Abobodoumé et Anoumambo était respectivement de 25 %, 50 % et 100 %.

L'*attiéké* en vente 1 à 2 jours après la production contenait soit des formes végétatives (72,7 %), soit des spores (27,3 %), mais un mélange des deux formes n'a été mis en évidence. Par contre, le nombre d'échantillons d'*attiéké* en vente 3 à 5 jours après production, contenant un mélange de formes végétatives et de spores, augmentait aux dépens des échantillons ne contenant que des spores.

### 3.5 CHARGE MOYENNE ET QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'ATTIEKE

Les charges moyennes en formes végétatives et en spores du groupe *B. cereus* dans l'*attiéké* fraîchement préparé étaient respectivement de  $2,5 \pm 0,4$  log (UFC/g) et de  $2,4 \pm 0,4$  log (UFC/g). Dans l'*attiéké* en vente, la charge moyenne en forme végétative était de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) alors qu'elle était de  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g) en spores de *B. cereus*. Au cours de la vente de l'*attiéké*, les charges en formes végétatives de *B. cereus* augmentaient de  $2,1 \pm 0,8$  log (UFC/g) à  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g), tandis que celles en spores diminuaient de  $2,2 \pm 0,9$  log (UFC/g) pour atteindre des valeurs de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) au cinquième jour de vente.

Selon les normes [2], [30], [31], la majorité (56,3 %) des échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé était de qualité microbiologique satisfaisante tandis que 18,8 % étaient de qualité microbiologique acceptable et ne représente pas un risque pour le consommateur. Cependant, 25,0 % de ces échantillons étaient de qualité microbiologique insatisfaisante, avec un risque de toxi-infection relativement faible pour le consommateur car leurs charges en groupe *B. cereus* étaient supérieures à 2,7 log (UFC/g), mais en deçà de la dose infectieuse [5 log (UFC/g)].

La qualité microbiologique de l'*attiéké* en vente se dégradait au cours de la vente. La proportion d'échantillons d'*attiéké* de qualité microbiologique satisfaisante était de 74,8 % dont 51,1 % et 48,9 % pour l'*attiéké* en vente respectivement 1 à 2 jours et 3 à 5 jours après production (tableau 3). Les échantillons de qualité microbiologique insatisfaisante et présentant un risque élevé pour la santé humaine [charge > 5 log (UFC/g)] ont été retrouvés uniquement dans l'*attiéké* en vente 3 à 5 jours après la production.

### 3.6 ESPECES DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* IDENTIFIEES

Parmi les 90 isolats présomptifs du groupe *B. cereus*, 84 (93,3 %) ont été confirmés positifs par amplification par PCR d'un fragment de 575 pb du gène flagellaire *motB*. Tous les isolats ont été identifiés dont 56 % de *B. thuringiensis* et 44 % *B. cereus sensu stricto*.

### 3.7 GESTION DU RISQUE DE CONSOMMATION DE L'ATTIEKE CONTAMINE PAR *BACILLUS CEREUS*

La température maximale atteinte par l'*attiéké* au cours du réchauffage a été de 90 °C. Cette température a été atteinte en moyenne entre 10 et 15 min de réchauffage et a varié en fonction de la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier (figure 4).

La courbe de survie ou de destruction thermique à 90 °C avait une forme concave orientée vers le bas (figure 5). L'expression de la cinétique de survie des spores du groupe *B. cereus* était de forme non log linéaire avec une phase d'adaptation moyenne d'une durée de 5 minutes, suivie d'une phase de destruction massive à partir de la cinquième minute jusqu'à la fin du réchauffage. Le taux de mortalité qui était de 2,1 % les cinq premières minutes de réchauffage hydrothermique, a augmenté rapidement pour atteindre un taux de mortalité maximum de 56,1 % à la vingtième minute. La charge moyenne des survivants était alors de  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g).

Le temps de réduction décimale (D) des bactéries du groupe *B. cereus* au cours du réchauffage de l'*attiéké* a été de  $8,5 \pm 1,9$  min. Il a été calculé à partir de l'analyse de la régression parcellaire des meilleurs ajustements de la partie linéaire de la courbe de survie. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de la courbe de tendance du temps de réduction décimale des spores du groupe *B. cereus* dans l'*attiéké* soumis au réchauffage hydrothermique a été de 0,67 (figure 5).

La courbe de régénération des bactéries du groupe *B. cereus* après 15 min de réchauffage de l'*attiéké* à 90 °C avait une allure sigmoïde (figure 6). La croissance du groupe *B. cereus* après le réchauffage a montré un temps de latence moyen de 18 heures à partir d'une charge initiale de 4,2 log (UFC/g) d'*attiéké*, permettant de déduire que le délai limite maximal de consommation sans risque de l'*attiéké* réchauffé était de 18 h. La phase de latence était suivie d'une phase de croissance exponentielle variant entre 18 et 36 h de culture, caractérisée par un taux de croissance maximale de 2,042 germes/h [0,083 – 4,1 germes/h] et d'un temps de génération de 17 h. La croissance du groupe *B. cereus* s'est ralentie après 36 h de culture, aboutissant à une phase stationnaire qui a commencé lorsque la population microbienne a atteint une concentration maximale de 2,4 log (UFC/g) d'*attiéké* avec un taux de germination de 0,063 germes/h. Cette charge en *B. cereus* correspondait à des doses non toxiques.

## 4 DISCUSSION

La production et la commercialisation de l'*attiéké* à Abidjan et banlieues se font dans un système traditionnel à deux voies qui s'imbriquent au niveau de la commercialisation. Le mauvais conditionnement de l'*attiéké* au cours du transport par

car ou minicar est susceptible de favoriser sa contamination au cours de la vente sur les marchés à Abidjan. Cette étude a révélé que 75 % des sites de production de l'attiéké étaient dans un état d'insalubrité important, sans assainissement adéquat, ni de dispositifs sanitaires et de gestion des déchets solides et liquides. La précarité des sites de production de l'attiéké est due d'une part, au fait que la plupart des productrices sont des femmes à faibles moyens financiers et exercent cette activité pour subvenir aux besoins de leur famille. Par conséquent, elles consacrent moins de ressources financières à l'entretien des sites. D'autre part, parce que les productrices vivent dans des cours communes et la promiscuité ne leur permet pas d'entretenir véritablement l'espace réservé à la production de l'attiéké [9]. Cette précarité des sites de production d'attiéké a été précédemment rapportée par [9] dans une étude sur l'évaluation des connaissances, des attitudes et des pratiques des manipulateurs dans les unités de production de l'attiéké en relation avec l'hygiène et la sécurité sanitaire des aliments en Côte d'Ivoire. Par ailleurs, il a été également rapporté que l'attiéké produit dans les conditions d'hygiène précaire ou dans les conditions insalubres est susceptible d'être contaminé par les bactéries pathogènes [32].

L'étude a permis de constater l'utilisation récurrente d'ustensiles en caoutchouc (87,5%) et en aluminium (12,5%) avec des surfaces égratignées. Cette situation représente un risque de ré-contamination de l'attiéké car les égratignures pourraient constituer un nid de microorganismes en générale et du groupe *Bacillus cereus* en particulier, capable de former des biofilms sur des surfaces inertes [33]. Le mauvais état des ustensiles utilisées par les productrices d'attiéké, associé à la précarité sanitaire des sites de production et du manque de dispositifs de gestion des déchets solides et liquides, augmente le risque de contamination de l'attiéké par les germes pathogènes et par le groupe *B. cereus* sur les sites de production de l'attiéké.

Les résultats de l'analyse microbiologique de l'attiéké fraîchement préparé ont montré la présence dans 43,8 % des échantillons, de formes végétatives (28,6 %) et de spores (71,4 %) du groupe *B. cereus*. Un tel constat traduit que le couple temps/température de cuisson est insuffisant pour détruire toutes les formes végétatives et les spores du groupe *B. cereus* dans l'attiéké fraîchement préparé. Plusieurs études ont aussi rapportées la présence des cellules végétatives et des spores du groupe *B. cereus* dans une large variété de produits alimentaires [34], [35], [36]. La capacité d'adhésion aux surfaces solides et de résistance des spores de *B. cereus* leur permet de persister dans l'environnement agroalimentaire et de contaminer la matière première et le produit [37].

Le niveau de contamination de l'attiéké fraîchement préparé est significativement lié à l'état sanitaire du site de production ( $p > 0,05$ ). Ainsi, l'attiéké provenant des sites d'Anoumambo et d'Abobodoumé qui ne disposaient pas d'espace aménagé pour la production de l'attiéké et qui présentaient un état d'insalubrité importante, sont plus contaminés que l'attiéké provenant des sites d'Azito et d'Avocatier. En revanche, aucun échantillon d'attiéké fraîchement préparé et provenant du site d'Avocatier, n'a été contaminé. De plus, sur le site d'Avocatier, la semoule de manioc était séchée sur des claies en hauteur ; ce qui évite sa contamination par la poussière, réservoir de spores de *B. cereus*. Ces résultats confirment ceux rapportés par [9] et démontrent que les mauvaises pratiques dans les unités de production et l'hygiène précaire sont la cause de la contamination de l'attiéké par le groupe *B. cereus* sur les sites de production.

L'attiéké était vendu sur les marchés généralement conditionné dans des sachets plastiques non alimentaires, dont la qualité n'est pas garantie. C'est une pratique qui peut avoir pour conséquence de favoriser la contamination de l'attiéké au cours de la vente. Il a été rapporté que les emballages, l'air et l'eau sont considérés comme d'éventuelles sources de contamination et de ré-contamination par le groupe *B. cereus* après pasteurisation [38], [39].

La qualité microbiologique de l'attiéké se détériore au cours du temps passé à la vente. En effet, selon les résultats obtenus, après 3 jours de vente, 28,2 % de l'attiéké a été contaminé par le groupe *B. cereus* avec une charge moyenne de  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g) de formes végétatives et de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) de spores. La contamination de l'attiéké par cette espèce était prévisible, car le groupe *B. cereus* est ubiquitaire du sol, de l'environnement et par conséquent, présent le plus souvent dans la majorité des produits alimentaires. De plus, la multiplication des souches dans l'attiéké peut être favorisée par sa teneur en eau (45 - 60 %), sa teneur en amidon (42,3 - 71,6 %) [6], [13] et la température (25 – 30 °C) de stockage et des lieux de vente. Cette température correspond à la température optimale de développement du groupe *B. cereus* [40]. Par ailleurs, l'augmentation de charge en *B. cereus* au cours de la vente peut également s'expliquer par le fait qu'après au moins une journée d'activité, l'attiéké proposé sur le marché est généralement régénéré par un réchauffage dont les paramètres ne sont pas toujours maîtrisés par les vendeurs. Dans ce cas, le réchauffage constitue un facteur activant la germination des spores résiduelles dans le produit. Il en résulte une multiplication des espèces bactériennes et par conséquent, une augmentation de charges en *B. cereus* de l'attiéké au cours de la commercialisation. Cette situation est amplifiée par les mauvaises conditions de transport de l'attiéké telles que l'utilisation des paniers de fortune en raphia et des sachets plastiques non alimentaires.

Cependant, les résultats obtenus dans cette étude, en termes de niveau (ou degré) de contamination, contrastent avec ceux de [19]. En effet, ces auteurs étudiant la microflore post-cuisson de l'*attiéké* commercial produit au sud de la Côte d'Ivoire, ont relevé un nombre plus élevé de spores de *B. cereus*, atteignant  $4,5 \pm 2 \log$  (UFC/g) d'*attiéké*. Cette discordance de résultats au niveau des charges en *B. cereus* avait été précédemment observée par [41], qui a indiqué que la concentration des souches dans la matrice alimentaire et leur diversité, varient le plus souvent d'un produit à un autre.

Dans le cadre de cette étude et conformément aux normes [2], [30], [31], la majorité (74,8 %) des échantillons d'*attiéké* en vente sur les marchés sont de qualité microbiologique satisfaisante. Dans leur étude sur la prévalence et la concentration de *B. cereus* dans les produits alimentaires prêts à consommer et vendus au détail en Australie, [42] ont montré que 98 % des échantillons testés étaient de qualité microbiologique satisfaisante. Ces résultats suggèrent que le groupe *B. cereus* est rarement responsable de l'insécurité sanitaire des produits alimentaires prêts à l'emploi.

Les résultats obtenus montrent cependant que le quart des échantillons d'*attiéké* analysé, présentait des charges en *B. cereus* dépassant les limites acceptables, avec un risque élevé pour la santé humaine des consommateurs pour seulement 1,3 % de ces échantillons. En effet, selon [30] et [31], le risque sanitaire est modéré pour le consommateur pour des charges en *B. cereus* n'excédant pas le seuil de 5 log (UFC/g) d'aliment et devient élevé au-delà de cette valeur. Cependant, des épidémies associées à des aliments contenant des charges en *B. cereus* de 3 log (UFC/g) ont été signalées [43], [44]. Par conséquent, les faibles concentrations en groupe *B. cereus* de l'*attiéké* ne traduisent pas nécessairement un risque réduit pour le consommateur. Le caractère épidémiogène du groupe *B. cereus* à faible dose peut être lié au mécanisme de virulence s'exprimant entre autre, par l'excrétion d'une toxine thermolabile et préformée dans l'aliment [43], [44]. En effet, après plusieurs jours de vente, l'*attiéké* est généralement réchauffé pour être à nouveau vendu. La toxine peut être sécrétée dans l'aliment avant sa consommation. Ainsi, en raison de la grande stabilité de la toxine émétique, les bactéries du groupe *B. cereus* pourraient être tuées par le réchauffage de l'*attiéké* avant consommation, alors que la toxine émétique est toujours intacte. Il est donc probable que les échantillons d'*attiéké* examinés posent un problème de santé publique même si des cas avérés n'ont pas été constatés dans cette étude. Cependant, comme l'*attiéké* joue un rôle important dans la nutrition de nombreuses populations en Côte d'Ivoire, en Afrique et en Europe et procure des économies pour les acteurs de la filière manioc, des mesures doivent être prises pour améliorer sa qualité afin de préserver les consommateurs et ces bénéficiaires.

Le modèle de gestion du risque de contamination par *B. cereus* utilisé dans cette étude, a été la réduction de la charge bactérienne par le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké*. Le dispositif utilisé pour le réchauffage de l'*attiéké* de plus de 3 jours après la production est simple, peu coûteux pour les ménagères et les vendeurs et disponible dans plusieurs foyers. L'étude a permis d'évaluer scientifiquement l'efficacité de cette technique de traitement traditionnelle de l'*attiéké*, en termes de garantie de la sécurité sanitaire, relativement au groupe *B. cereus*. En effet, le suivi de la destruction des contaminants en fonction de la température et du temps de réchauffage de l'*attiéké*, comportait deux phases. La première, caractérisée par une variation de température passant de celle de l'*attiéké* (température de l'environnement, 25 °C) à 90 °C, n'induit qu'une faible réduction (0,1 log UFC/g) de la flore. Cette situation peut être expliquée en considérant la conjonction de plusieurs facteurs. Une évolution de température appliquée entre 25 et 90 °C dans un temps réduit, ne peut être destructrice de façon sensible, ni de la flore végétative, ni des spores du groupe *B. cereus*. Le temps d'évolution vers la température d'équilibre peut être lié à l'intensité de la source de chaleur, à la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier (capacité), à la structure de la matière en termes de conductivité de la chaleur à destination des souches cibles [45], [46]. Il en résulte que cette première phase présente peu d'intérêt dans la réduction du risque de contamination relativement à *B. cereus*. La deuxième phase, isotherme, s'est poursuivie jusqu'à la fin de la durée de réchauffage et a induit une réduction de la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. La vapeur d'eau, apportée par la chaleur au cours du réchauffage, augmente la teneur en eau résiduelle de l'*attiéké* jusqu'à une teneur d'équilibre correspondant au regorgement d'eau des interstices. Par conséquent, tout apport de chaleur n'influence plus la variation de la température qui se stabilise à 90 °C après un temps moyen de réchauffage hydrothermique de 15 min. Selon [45], la température de la vapeur d'eau dans le matériau, la durée du réchauffage et la teneur en eau du produit sont les paramètres qui contrôlent le réchauffage hydrothermique. L'épaisseur de la couche d'*attiéké* donc la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier influence quant à elle l'homogénéité du réchauffage hydrothermique. Il se crée un gradient de température d'autant plus significatif que l'épaisseur de la couche du produit est importante, mais qui disparaît pour des temps de réchauffage hydrothermique plus longs [46].

Le profil de destruction des germes à 90 °C n'a pas été linéaire au cours des premières minutes du réchauffage. La cinétique de destruction thermique obtenue, avec une forme concave orientée vers le bas et un épaulement, résulte d'une part d'une activation de la population microbienne avant leur destruction. D'autre part, la présence d'épaulement s'explique notamment par l'agrégation et l'hétérogénéité de résistance ou à la diversité de réponse des spores à un réchauffage thermique ou hydrothermique [47], [48] illustrée par la valeur du coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,67$ ). Pour ce type de cinétique, la destruction commence lentement puis s'accélère au cours du réchauffage hydrothermique. Ceci s'explique par

le fait que pour permettre leur germination, certaines spores nécessitent une activation qui peut être engendrée par un choc physique, tel que le choc thermique. La température de réchauffage hydrothermique a un effet sur la germination du genre *Bacillus*. Ainsi, le pourcentage de spores germées diminue lorsque la température augmente. Les spores s'affaiblissent et se fragilisent lorsque des températures et des durées importantes leur sont appliquées. Travaillant sur l'activation des spores de *Bacillus megaterium*, [49] ont observé une meilleure capacité d'activation à certaines températures. Cette capacité d'activation des spores est optimale entre 62 et 78 °C avec un taux de germination maximal obtenu entre 64 et 68 °C. Cependant, ces auteurs ont enregistré une diminution du taux de germination et une augmentation du temps de latence à la germination lorsque la température était supérieure à 68 °C. Nos résultats concordent avec ces différentes observations lorsque l'*attiéké* a été réchauffé à 90 °C avec un temps de latence de 18 h et pourraient s'expliquer par un phénomène de rupture de liaisons au sein de la paroi de la spore, rupture obtenue grâce à l'énergie fournie par le réchauffage hydrothermique. Les cibles de ce phénomène de rupture seraient des enzymes lytiques impliquées dans le processus de dégradation du peptidoglycane qui conduit à la réhydratation et par conséquent à la germination de la spore [50], [51]. La germination ou non de la spore est aussi influencé par la composition de la matrice alimentaire. En effet, l'amidon, constituant majoritaire de l'*attiéké*, gélatinisé sous l'effet de la chaleur, retarde ou diminue la germination de la spore [52].

Par ailleurs, les spores de *B. cereus* n'ont pas montré un fort potentiel de croissance dans l'*attiéké* après le réchauffage hydrothermique à 90 °C pendant plus de 15 min. La population de *B. cereus* n'a pas excédé la concentration seuil de  $10^5$  UFC/g fixée dans les normes, ni celle de  $10^3$  UFC/g rencontrée dans certaines épidémies, avec un temps de latence moyen de 18 h. Le réchauffage hydrothermique réduit la charge de l'*attiéké* en *B. cereus* mais aussi élimine la flore de contamination responsable de gastro-entérites. Le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé a été de 18 h.

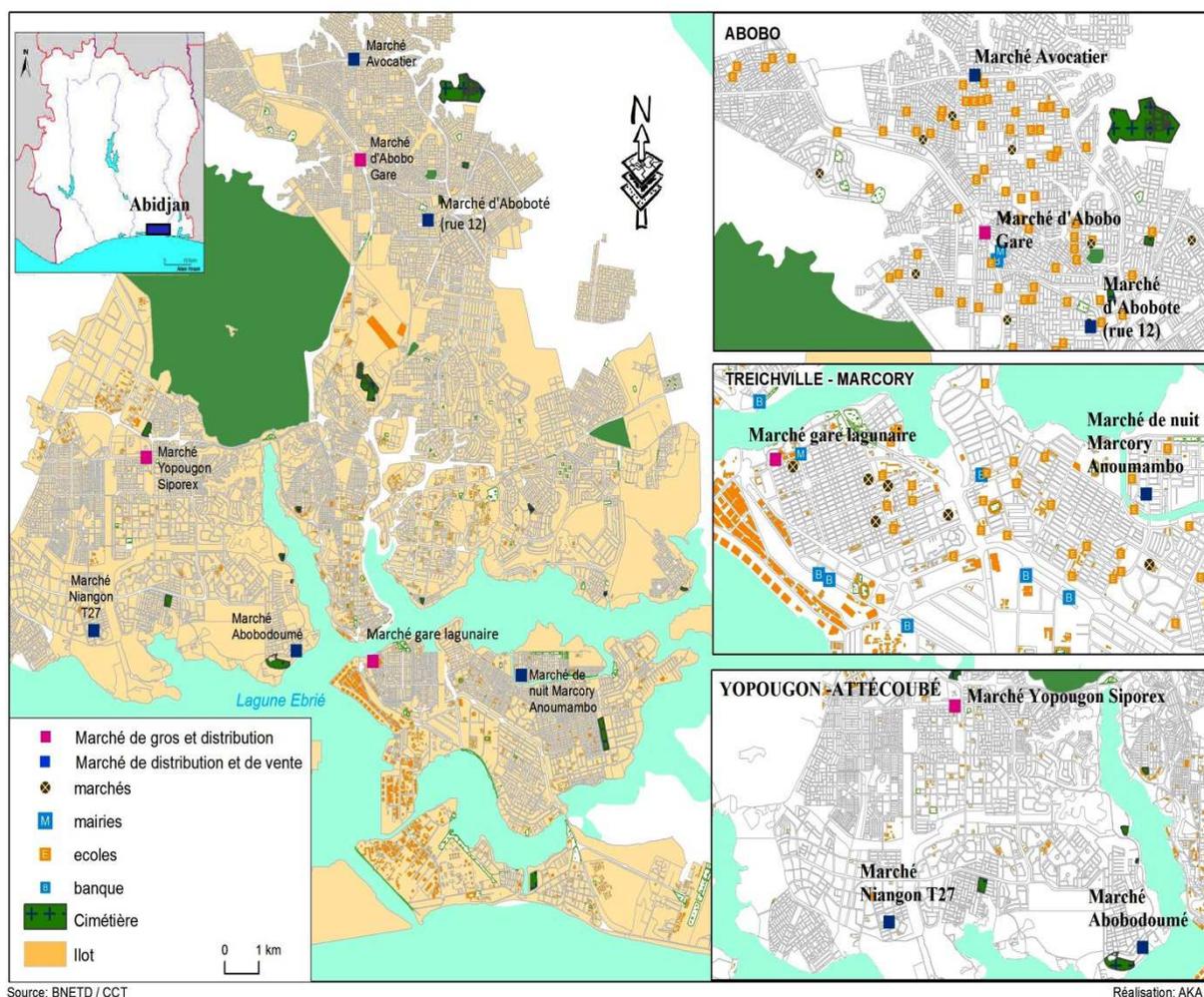


Figure 1 : Carte d'Abidjan avec matérialisation les marchés de gros et demi-gros et les marchés informels de distribution et de vente d'*attiéké*



*Figure 2 : Échantillons d'attiéké conditionné en sachet plastique pour la vente au détail*

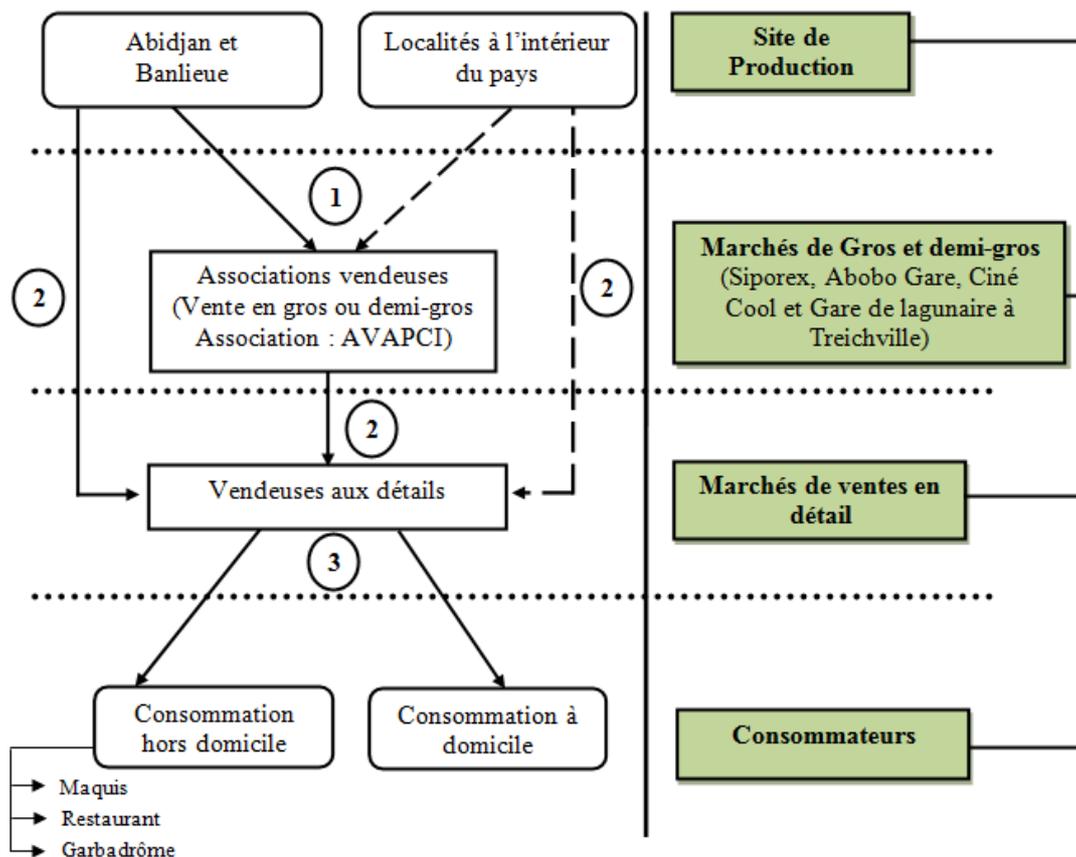


Figure 3 : Chaîne de production à la consommation d'attiéké à Abidjan

(1) Transport sur les marchés de gros et demi gros, (2) Transport sur les marchés de ventes en détail, (3) Lieux de consommation.

—> Voie 1  
 - -> Voie 2

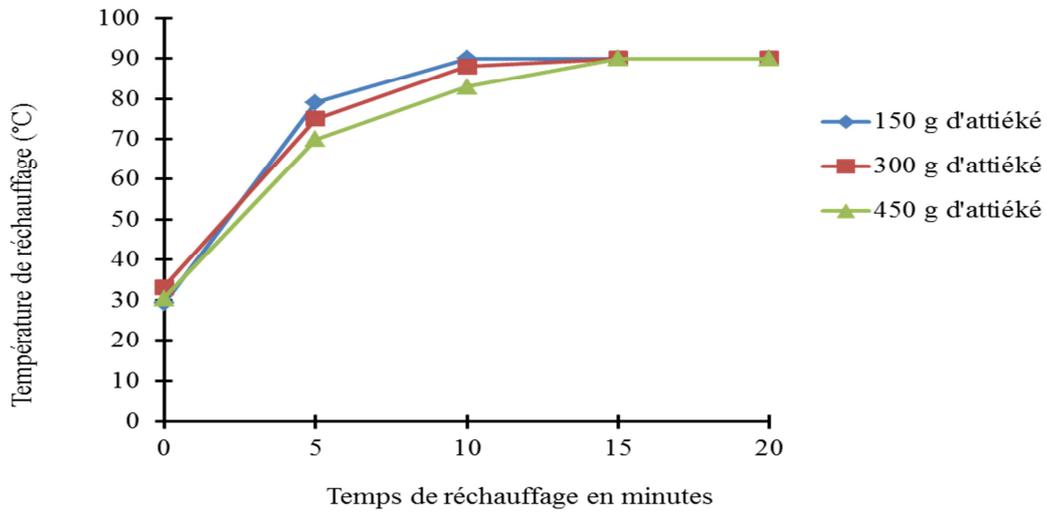


Figure 4 : Variation de la température en fonction du temps au cours du réchauffage de l'attiéké

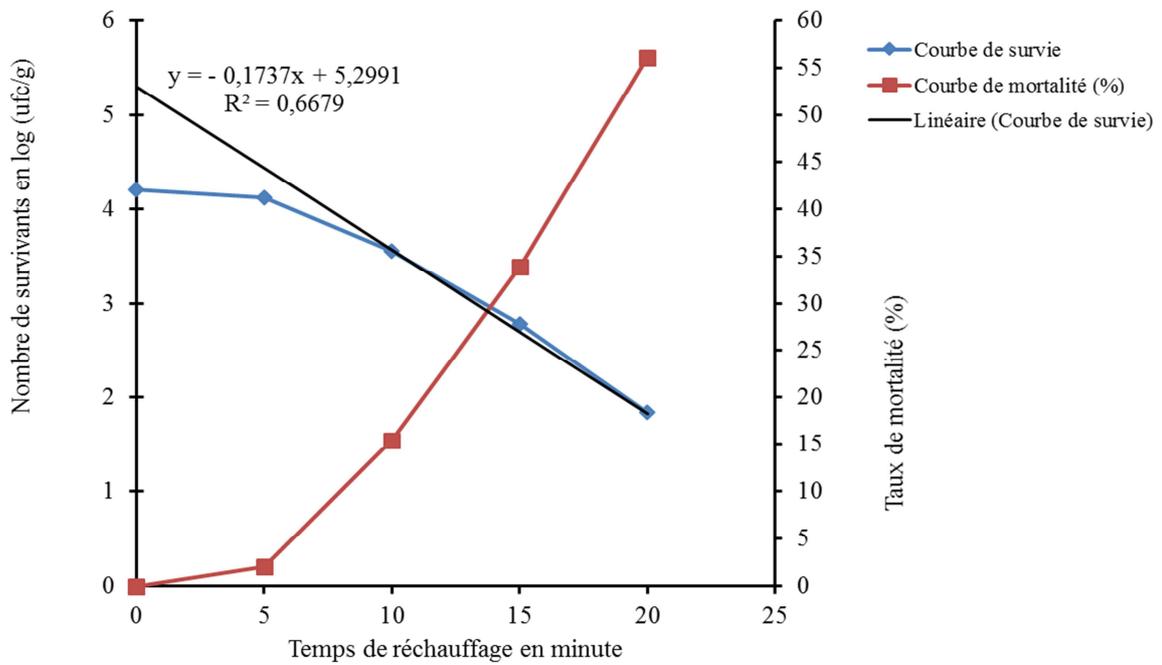


Figure 5 : Courbe de survie des bactéries du groupe *Bacillus cereus* au cours du réchauffage à 90° C de 150 g d'attiéké

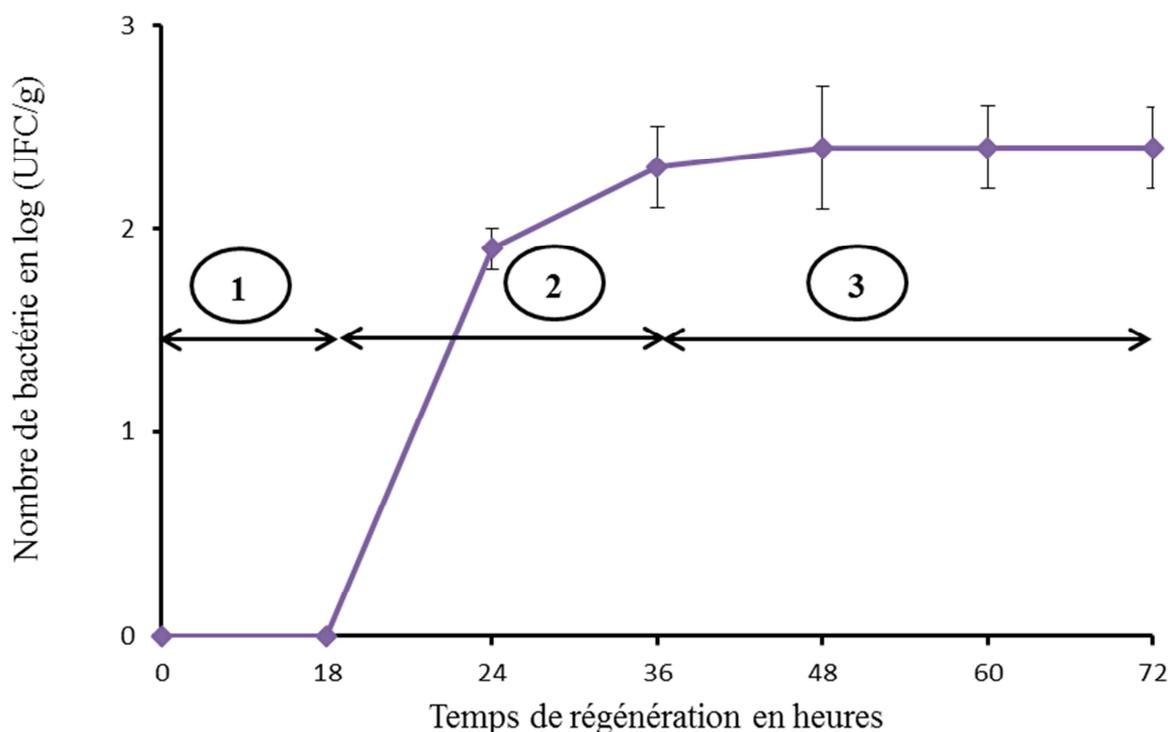


Figure 6 : Courbe de régénération du groupe *Bacillus cereus* dans l'attiéké après 15 minutes de réchauffage à 90 °C

(1) phase de latence, (2) phase de croissance exponentielle, (3) phase stationnaire

Tableau 1 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'identification des espèces de *Bacillus cereus* et leur programme d'amplification

Gènes cibles	Amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille des amplicons (pb)	Température hybridation (°C)	Références
16S rADN des eubactéries	bak4	AGGAGGTGATCCARCCGCA	95°C, 3 min	~1500	60	[25]
	bak11w	AGTTTGATCMTGGCTCAG	40 x [95°C, 15 s ; 60°C, 30 s ; 72°C, 120 s] 72°C, 7 min			
<i>motB</i>	BCFomp 1	ATCGCCTCGTTGGATGACGA	94°C, 5 min	575	54,5	[24]
	BCRomp 1	CTGCATATCCTACCGCAGCTA	30 x [94°C, 30 s ; 54,5°C, 60 s ; 72°C, 60 s] 72°C, 7 min			
<i>gyrB</i> de <i>B. anthracis</i>	BASH-2F	GGTAGATTAGCAGATTGCTCTT CAAAAGA		253	63	[26]
	BASH-2R	ACGAGCTTTCTCAATATCAAAA TCTCCGC				
<i>gyrB</i> de <i>B. cereus sensu stricto</i>	BCJH-F	TCATGAAGAGCCTGTGTACG	94°C, 5 min 30 x [94°C, 30 s ; 63°C, 30 s ; 72°C, 30 s]	475	63	[26]
	BCJH-1R	CGACGTGTCAATTCACGCGC				
<i>gyrB</i> de <i>B. mycoides</i>	BMSH-F	TTTTAAGACTGCTCTAACACGT GTAAT	72°C, 5 min	604	63	[26]
	BMSH-R	TTCAATAGCAAAATCCCACCA AT				
<i>gyrB</i> of <i>B. thuringiensis</i>	BTJH-1F	GCTTACCAGGGAAATTGGCAG		299	63	[26]
	BTJH-R	ATCAACGTCGGCGTCGG				

Tableau 2 : Prévalence en bactéries du groupe *Bacillus cereus* de l'attiéké en vente

Produits	Nombre d'échantillons (%) d'attiéké contaminés			
	Formes végétaives uniquement	Spores uniquement	Mélange formes végétaives et Spores	Total
Attiéké fraîchement préparé	2 (28,6)	0 (0)	5 (71,4)	7 (43,8)
Attiéké en vente	<b>62 (80,5)</b>	<b>11 (14,3)</b>	<b>4 (5,2)</b>	<b>77 (25,2)</b>
1 - 2 jours	24 (72,7)	9 (27,3)	0 (0,0)	33 (20,0)
3 - 5 jours	38 (86,4)	2 (4,5)	4 (9,1)	44 (28,2)

Tableau 3 : Qualité microbiologique de l'attiéké en vente

Qualité microbiologique	Nombre (%) d'échantillon d'attiéké		
	1-2 jours	3-5 jours	Total
Satisfaisante	117 (51,1)*	112 (48,9)	229 (74,8)
Acceptable	25 (43,9)	32 (56,1)	57 (18,6)
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection	8 (50)	8 (50)	16 (5,2)
Insatisfaisante avec risque de toxi-infection élevé	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (1,3)

\* Les valeurs et les nombres entre parenthèses représentent respectivement le nombre d'échantillons et les pourcentages.

- Qualité microbiologique satisfaisante :  $N \leq 1,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique acceptable :  $1,7 \log$  (UFC/g)  $< N \leq 2,7 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque pour la santé humaine :  $2,7 \log$  (UFC/g)  $< N < 5 \log$  (UFC/g) ;
- Qualité microbiologique insatisfaisante avec risque élevé pour la santé humaine :  $N \geq 5 \log$  (UFC/g).

## 5 CONCLUSION

Au niveau de la chaîne alimentaire de l'attiéké consommé à Abidjan, l'étude a montré une non-conformité de quelques caractéristiques, ainsi que des pratiques à risque d'insécurité sanitaire. L'attiéké consommé à Abidjan est contaminé par *B. thuringiensis* et *B. cereus sensu stricto*. La qualité microbiologique du produit se dégrade de plus en plus, au cours de la vente. L'attiéké de plus de 2 à 3 jours après la production, peut être régénéré par réchauffage, basé sur un réchauffage hydrothermique de 90 °C pendant au moins 15 minutes, qui réduit la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [de 4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. Le délai limite de consommation du produit ainsi traité est de 18 h. L'étude est une première en Côte d'Ivoire, du point de vu de l'évaluation de l'efficacité et de l'optimisation du réchauffage hydrothermique de l'attiéké, une pratique traditionnelle courante, simple et peu couteuse pour les acteurs de la filière, mais utilisée de façon empirique et non maîtrisée. Les données résultant de cette étude contribuent à la préservation de la santé du consommateur, par la réduction du risque de consommation de l'attiéké contaminé par *Bacillus cereus* à des doses toxiques.

## REMERCIEMENTS

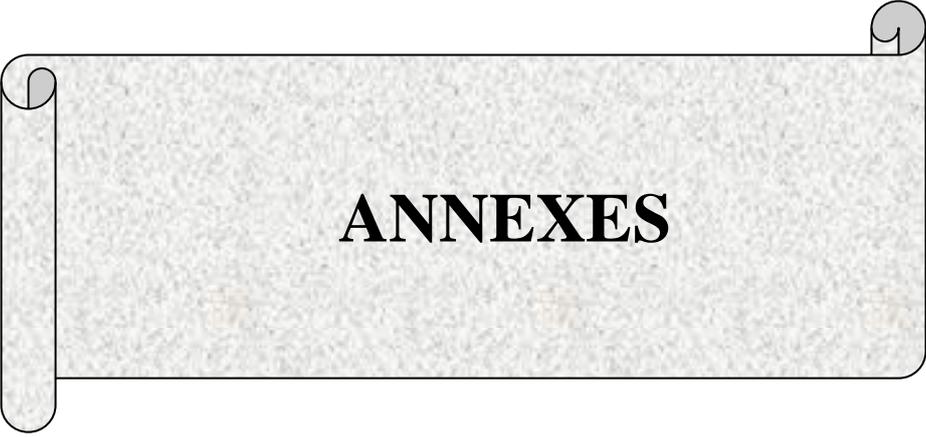
Cette étude a été financée par le Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (PASRES) (Projet CSRS/PASRES N°27). Nous remercions les productrices et vendeuses d'attiéké à Abidjan regroupées au sein de l'Association des Vendeuses d'attiéké et de Poissons de Côte d'Ivoire (AVAPCI).

## REFERENCES

- [1] F. Aboua, E. Konan, A. Kossa, F. Agro, and A. Kamenan, "Évolution des teneurs d'acide cyanhydrique et l'acide oxalique au cours de la transformation du manioc en attiéké". *Agronomie Africaine*, vol 81, pp. 117-122, 1989.
- [2] NI 484, "attiéké - Spécification, Côte d'Ivoire Normalisation, Norme ivoirienne," 1<sup>ère</sup> Édition, 5 p, 2013.
- [3] N.T. Djéni, K.F. N'guessan, A.T. Dadié, and K. M. Djè, "Impact of different levels of a traditional starter on the fermentation of cassava dough for Attiéké production," *Food*, vol 2, pp. 145-151, 2008.
- [4] CNRA, "Manioc et Attiéké : du nouveau." Bulletin d'information et de liaison du CNRA, *CNRA Info* N° 8, 8 p, 2003.
- [5] J.B. Assanvo, N.G. Agbo, N.E.N. Behi, and Z. Farah, "Enquêtes de consommation et de production d'attiéké réalisées à Abidjan, Dabou et à Jacqueville". Rapport. Université de Cocody, Côte d'Ivoire, Laboratoire de Biochimie et Science des Aliments (LBSA)/ Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS)/Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich (ETHZ), Abidjan-Côte d'Ivoire. 25p, 2000.
- [6] M. Sotomey, E.-A.D. Ategbro, E. C. Mitchipke, M.-L. Gutierrez, and M. C. Nago, "Innovation et diffusion des produits alimentaires en Afrique: l'attiéké au Bénin. Alimentation. Savoir-faire et Innovation en Agroalimentaire en Afrique de l'Ouest", CIRAD, 97 p, 2001.
- [7] J. B. Assanvo, G. N. Agbo, Y. E. N. Behi, P. Coulin, and Z. Farah, "Microflora of traditional starter made from cassava for "Attiéké" production in Dabou (Côte d'Ivoire)", *Food Control*, vol 17, pp. 37-41, 2006.
- [8] N.G. Amani and A. Kamenan, "Potentialités nutritionnelles et technologie traditionnelle de transformation des denrées amylacées en Côte d'Ivoire," 2<sup>ème</sup> Atelier international. Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles, 23-28 Novembre 2003, Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 383-392, 2003.
- [9] N.T. Djéni, K.A. Kouamé, Y. Traoré, K.R. Nevry, and K.M. Djè, "Assessment of knowledge, attitudes and practices of food handlers in Attiéké production units in relation to food hygiene and safety in Côte d'Ivoire in 2012", *Food and Nutrition Sciences*, vol 5, pp. 896-904, 2014.
- [10] F. Aboua, A. Kossa, K. Konan, K. Mosso, S. Angbo, and A. Kamenan, "Analyse de quelques constituants du Manioc au cours de la préparation de l'attiéké," In: Foua B.K. and Philomène B.J.R., Eds., La post-récolte en Afrique : Séminaire International Abidjan, Montmagny QC Marquis Publishers, Côte d'Ivoire, pp. 217-221, 1990.
- [11] B.Y. Kouassi, A. Traoré, and G. Sirpé, "Transformation et consommation des denrées alimentaires en Afrique de l'ouest centrale: Burkina Faso, Côte d'Ivoire et Ghana," KARTHALA Editions, 180 p, 2008.
- [12] A.C. Kacou, "Optimisation des conditions d'application d'une méthode de conservation longue durée de la pâte de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en vue d'améliorer la qualité alimentaire de l'attiéké et du placali," Thèse de doctorat, Université de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire), 2000.
- [13] N.T. Djéni, K. F. N'Guessan, D. M. Toka, K. A. Kouamé, and K. M. Dje, "Quality of attiéké (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte d'Ivoire," *Food Research International*, vol 44, p. 410-416, 2011.
- [14] G. Atta, "Promotion de l'attiéké, 20 milliards de FCFA des revenus annuels pour les producteurs et les commerçants," Fraternité matin jeudi 31 juillet, 2008.
- [15] W. K. Amo-a-wua, and M. Jakobsen, "The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava," *Journal of Applied Bacteriology*, vol 79, pp. 250-256, 1996.
- [16] P. Coulin, Z. Farah, J. B. Assanvo, J. Spillmann, and Z. Puhan, "Characterisation of the microflora of the fermented cassava product attiéké during traditional small scale preparation," *International Journal of Food Microbiology*, vol 2, pp. 131-136, 2006.
- [17] M.O. Sanni, "Critical control points in commercial production of high quality gari. Proceedings of the fourth triennial symposium of the international society for tropical root crops," Africa Branch, Kinshasa, Zaire, 5-8 December 1989, pp. 217-222, 1992.
- [18] B. Faye and G. Loiseau, "Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité" In : Hanak E., Boutrif E., Fabre P., Pineiro M., 2002. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO, 11-13 déc. 2000, Montpellier, France, Cirad, Cédérom, 2002.
- [19] A.K. Kouamé, T. N. Djéni, F. K. N'Guessan, and K. M. Djè, "Postprocessing microflora of commercial attiéké (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire," *Letters in Applied Microbiology*, vol 56, pp. 44-50, 2013.
- [20] AFNOR "Norme NF V 08-010. In: Microbiologie des aliments - Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen". Analyse microbiologique recueil de normes françaises. 6<sup>ème</sup> Ed. Paris, pp. 67-75, 1996.
- [21] ISO 7932, "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*-Colony count technique at 30°C," 2004.
- [22] ISO 7218, "Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations," Third edition, 66 p, 2007.

- [23] D. Goldenberger, I. Perschil, M. Ritzler, M. Altwegg M, "A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification," *PCR Methods and Applications*, vol 4, pp. 368-370, 1995.
- [24] G. Zhou, H. Liu, J. He, Y. Yuan, and Z. Yuan, "the occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol 121. Pp. 195-200, 2008.
- [25] K. Oliwa-Stasiak, C.I. Molnar, K. Arshak, M. Bartoszcze, and C.C. Adley, "Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species," *Journal of Applied Microbiology*, vol 108, pp. 266-273, 2010.
- [26] S.M. Schwenninger, U. Von Ah, B. Niederer, M. Teuber, and L. Meile, "Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains," *Journal of Food Protection*, vol 68, pp. 111-119, 2005.
- [27] S.H. Park, H.J. Kim, J.H. Kim, T.W. Kim, and H.Y. Kim, "Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol 17, pp. 1177-1182, 2007.
- [28] L.I. Katzin, L.A. Sandholzer, M.E. Stron, "Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization," *Journal of Bacteriology*, vol 45, pp. 256-272, 1943.
- [29] M. Sanaa, "Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques," *Épidémiologie et santé animale*, vol 41, pp. 169-177, 2002.
- [30] Anonyme 1, "Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires - Lignes directrices pour l'interprétation," Ministère de la santé, Direction de la santé, Service de la sécurité alimentaire. Luxembourg, Belgique, fiche FC/LZ/PH, F-054 Rev02, pp 49, 2011.
- [31] Anonyme 2, "Règlement (CE) n° 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires," 2007.
- [32] P.S. Kunwar, M. Dinesh, S. Sarita, R. Dalwani, "Impact Assessment of Treated/Untreated Wastewater Toxicants Discharged by Sewage Treatment Plants on Health, Agricultural and Environmental Quality in the Wastewater Disposal Area", *Chemosphere*, Vol 55, pp 227-255, 2004.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.050>; Consulté le 03/04/2015.
- [33] C. Ankolekar, R.G. Labbé, "Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 76, pp 982-984, 2010.
- [34] M. Valero, L.A. Hernández-Herrero, P.S. Fernández, M.C. Salmerón, "Characterization of *Bacillus cereus* from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests," *Food Microbiology*, Vol 19, pp 491-499, 2002.
- [35] H. Rosenquist, L. Smidt, R.S. Anderson, B.G. Jensen, A. Wilcks, "Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food," *FEMS Microbiology Letters*, Vol 250, pp 129-136, 2005.
- [36] M.F. Fangio, S.I. Roura, R. Fritz, "Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods," *Journal of Food Science*, Vol 75, pp M218-M221, 2010.
- [37] A. Andersson, U. Ronner, P.E. Granum, "what problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?" *International Journal of Food Microbiology*, Vol 28, pp 145-155. 1995.
- [38] A. Eneroth, A. Christiansson, J. Brendehaug G. Molin, "Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora," *International Dairy Journal*, Vol 8, pp 829-834, 1998.
- [39] T.S.M. Pirttijarvi, M.A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, "Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes," *International Journal of Food Microbiology*, Vol 60, pp 231-239, 2000.
- [40] M.H. Guinebrethiere, F.L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx, P. De Vos, "Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group". *Environmental Microbiology*, Vol 10, pp 851-65, 2008.
- [41] M. Ziane, N. Desriac, P. Le Chevalier, O. Couvert, B. Moussa-Boudjemaa, I. Leguérinel, "Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous," *Food Control*, Vol 45, pp 16-21, 2014.
- [42] S. Eglezos, B. Huang, G.A. Dykes, N. Fegan, "The Prevalence and Concentration of *Bacillus cereus* in Retail Food Products in Brisbane, Australia," *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol 7, pp 867-870, 2010.
- [43] EFSA, "Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp.in foodstuffs," *The EFSA Journal*, Vol 175, pp 1-48, 2005.
- [44] L.P.S. Arnesen, A. Fagerlund, P.E. Granum, "from soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins," *FEMS Microbiology Reviews*, Vol 32, pp 579-606, 2008.
- [45] S.A. Bahrani, "Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couplées chaleur-masse," PhD thèse, Université de La Rochelle, France. <NNT : 2012LAROS366>. pp 217, 2012.
- [46] I. Zarguili, Z. Maache-Rezzoug, C. Loisel, J.-L. Doublet, "Influence of DIC hydrothermal process conditions on the gelatinization properties of standard maize starch," *Journal of Food Engineering*, Vol 77, pp 454 – 461, 2006.

- [47] O. Cerf, "A Review Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores," *Journal of Applied Microbiology*, Vol 42, pp 1-19, 1977.
- [48] O. Couvert, "Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques". Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, France, Soutenue le 2 Avril 2002, 192 pp.
- [49] H.S. Levinson, M. Hyatt, "Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores," *Journal of Bacteriology*, Vol 101, pp 58-64, 1970.
- [50] S. Makino, N. Ito, T. Inoue, S. Miyata, R. Moriyama, "A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination," *Microbiology*, Vol 140, pp 1403-1410, 1994.
- [51] R. Leuschner, P. Lillford, "Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*," *Letters in Applied Microbiology*, Vol 29, pp 228- 232, 1999.
- [52] I., Gonzalez, M. Lopez, M. Mazas, J. Gonzalez, A. Bernardo, "Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in the recovery medium," *Journal of Food Safety*, Vol 17: pp 1-12, 2007.



**ANNEXES**

## Annexe 1 : Fiche d'enquête éleveurs

FICHE D'ENQUETE ELEVEUR			
Exploitation de :			
Nom:			
N° de téléphone:			
Ville:			
Commune:			
Enquête réalisée le:			
<b>1- Caractéristiques de l'exploitation</b>			
<b>1• 1</b>	<b>Atelier lait</b>		
	• Nombre de vaches laitière	/.../.../	
	• Litrage livrée par jour	/.../.../.../	
	• Type de logement		
	aire paillée- aire d'exercice non couverte	1- <input type="checkbox"/>	
	aire paillée- aire d'exercice couverte	2- <input type="checkbox"/>	
	• type de traite		
	traditionnelle	1- <input type="checkbox"/>	
	moderne	2- <input type="checkbox"/>	
	• stockage des déjections		
	fosse	1- <input type="checkbox"/>	
	fumière	2- <input type="checkbox"/>	
	système particulier à préciser .....	3- <input type="checkbox"/>	
	aucun	4- <input type="checkbox"/>	
<b>1• 2</b>	<b>Autres ateliers</b>		
		sur l'exploitation	ds le voisinage
	• Production de veaux sevrés	/.../	/.../
	• Engraissement de taurillons	/.../	/.../
	• Production de porcs	/.../	/.../
	• Production de volailles	/.../	/.../
	• Chèvres	/.../	/.../
	• Moutons	/.../	/.../
	• Autres:.....	/.../	/.../
<b>2- Etat sanitaire du troupeau au cours des 12 derniers mois</b>			
	• Répartition des vélages:		
	vélages étalées sur l'année	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	si non, sur quelle période: /1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12/		
		Depuis 2 mois	depuis 1 an
	• VL traitées pour mammites cliniques	/.../	/.../
	• Chute de production laitières importante (non dues à des causes alimentaires)	/.../	/.../
	• Diarrhées des vaches laitières	/.../	/.../
	• Vaches mortes ou reformées pour maladie	/.../	/.../
	• Diarrhée de veaux	/.../	/.../
	• Veaux morts	/.../	/.../
	• Avortements	/.../	/.../
	• Vélages avant terme	/.../	/.../
	• Cas de suspicion d'infection pathogène	/.../	/.../
	• Autres maladies (affections respiratoire..)	/.../	/.../
	Lesquelles :.....		
	Préciser le nombre d'animaux concernés.....		
	• Y a t-il eu des analyses de laboratoire ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
	si oui, date (s):.....		

3- Utilisation d'Antibiotiques-Programme de prophylaxie		
3,1	Utilisez-vous des antibiotiques pour soigner les vaches laitières lorsqu'elles sont malades? Si oui, lesquels .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
3,2	L'antibiotique a-t-il été prescrit par un vétérinaire ou un agent de la santé?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
3,3	Combien de jours avez-vous attendu après administration de l'antibiotique pour commencer la traite des vaches? .....	
3,4	Votre ferme est-elle inclus ou bien suit un programme de vaccination? Si oui, lesquels .....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
4- Alimentation des animaux		
4• 1	Nature des principaux fourrages consommés par la vache laitière (taries ou en production) au cours des 2 derniers mois.	
	• pâturage/herbe fauchée	vaches taries/ vache en production
	• Foin	vaches taries/ vache en production
	• Ensilage d'herbe	vaches taries/ vache en production
	• Ensilage de maïs	vaches taries/ vache en production
	• Autres (préciser) :.....	vaches taries/ vache en production
4• 2	Les aliments consommés par les vaches laitières au cours des 2 demers mois	
	4-2-1 Origine	
	• Achetés dans le commerce	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Fabriqué à la ferme	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• autre	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	4-2-2 Nature des aliments distribués au cours des 2 derniers mois	
	• tourteaux, à préciser :.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Céréales, à préciser :.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Pulpes, à préciser :.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	4-2-3 Conditions de stockage des aliments	
	• lieu accessible aux oiseaux	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• lieu accessible aux rongeurs	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Présence d'autres risques de contamination pendant le stockage, Préciser:.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	4-2-4 Le mode de distribution	
	• il entraîne un risque de souillure par les bouses	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	4-3 Qualité de l'eau	
	• Origine de l'eau 1- <input type="checkbox"/> réseau	2- <input type="checkbox"/> puit 3- <input type="checkbox"/> autre
	si forage:	
	- la contamination est-elle possible par des déjections diverses ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	- Nature des déjections : Boues de stations d'épuration	1- <input type="checkbox"/>
	Fosses septiques	2- <input type="checkbox"/>
	Autres, à préciser.....	3- <input type="checkbox"/>
	- l'eau est-elle désinfectée sur l'exploitation ?	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Mode de distribution pour les VL en lactation	
	-abreuvoir à palette	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	-abreuvoir à boule	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	-bac	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	-autres	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Propreté des abreuvoirs des VL en lactation	1- <input type="checkbox"/> acceptable 2- <input type="checkbox"/> mauvaise
	• Matériau des abreuvoirs des VL en lactation	
	-ciment	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	-plastique/tôle	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	-autre (préciser) :.....	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	• Fréquence de nettoyage (VL en lactation)	
	Plus fréquemment	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	tous les 15 jours	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	tous les mois	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	moins fréquemment que tous les mois	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non
	aucun	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non

<b>5 Conditions d'hygiène dans l'exploitation</b>		
<b>5• 1 Logement des animaux</b>		
5• 1• 1 Environnement		
• Proximité d'une décharge ou d'une déchetterie ?	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Présence de chiens	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Présence de rongeurs	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Présence d'oiseau	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Bonne séparation physique entre les espèces (volaille, porcs)	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
<b>5-2 l'hygiène de la traite</b>		
<b>5-2-1 Hygiène et organisation générale</b>		
• Trayeurs		
- nombre de trayeurs présents en permanence	/.../	
- alternance de trayeurs	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
lavage des mains du trayeur d'une vache à l'autre	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Avant de commencer la traite :		
- la tenue du trayeur est propre	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
- le trayeur se lave les mains	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
<b>5-2-2 Préparation des trayons avant la traite</b>		
• Absence de préparation	1- <input type="checkbox"/>	
• Préparation à sec par massage des mamelles avec ou sans chiffon	2- <input type="checkbox"/>	
• Préparation des mamelles par le veau	3- <input type="checkbox"/>	
• Utilisation de douchettes	4- <input type="checkbox"/>	
- seuls les trayons sont mouillés	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
- essuyage individualisé (un papier par animal par ex.)	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
<b>5-2-3 Elimination des premiers jets</b>		
• Elimination systématique, sur tous les animaux des premiers jets	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Si oui, est-ce :		
- sur le sol ?	1- <input type="checkbox"/>	
- dans la main ?	2- <input type="checkbox"/>	
- dans un récipient ?	3- <input type="checkbox"/>	
<b>5-2-4 Désinfection des trayons après la traite</b>		
• Systématiquement (toutes les vaches, toute l'année)	1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
<b>5-2-5 Conditions de traite</b>		
• La traite se déroule dans des conditions calmes	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Chute de faisceaux /1/2/3/4/5/6/7/8/9/10/11/12/13/14/15/	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Les faisceaux qui chutent pendant la traite sont nettoyés	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
Correctement au jet	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Bouses pendant la traite :	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
<b>5-2-6 Etat du matériel après la traite</b>		
• Aspect correct (bien lavé et en bon état) pour :		
- le seau	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
- la caoutchouterie	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
- la calebasse	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
<b>4-2-7 Filtration du lait</b>		
• Présence d'un système de filtration du lait	1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• si oui, type de filtre :		
- en fibre, changé après chaque traite	1- <input type="checkbox"/>	
- métallique	2- <input type="checkbox"/>	

<b>6- Devenir du lait après la traite</b>			
<b>6•1 Lait apres la traite</b>			
• Traitement du lait recueilli			
filtration :.....		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
pasteurisation:.....		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
ajout d'éléments:.....		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Materiel de conditionnement			
Seau plastique		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
Bouteille en plastique		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
Autres:.....		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Refroidissement immediat			
		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Vente immediate			
		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Atelier de vente			
		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Environnement de vente:.....			
		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Stockage du lait destinee a la vente			
-dans une glaciere		1- <input type="checkbox"/>	
-sur une table		2- <input type="checkbox"/>	
-sur le sol		3- <input type="checkbox"/>	
-autres:.....		4- <input type="checkbox"/>	
• Température ambiante			
		/...../°C	
• Atelier de transformation dans la zone			
		1- <input type="checkbox"/> oui 2- <input type="checkbox"/> non	
• Produits laitiers dérivés :			

## Annexe 2 : Fiche d'enquête vendeur

FICHE D'ENQUETE VENDEUR			
Site : .....	Enquête réalisée le : .....		
Nom du vendeur : .....	Enquêteur : .....		
• Provenance du lait cru : .....			
• Transport du lait au lieu de vente : .....			
• Conditionnement lors du transport au lieu de vente : .....			
• Lieu de vente : .....			
• Environnement .....			
• Vêtements du vendeur	1- <input type="checkbox"/> propre	2- <input type="checkbox"/> sale	
• Traitement du lait avant la vente			
aucun		1- <input type="checkbox"/>	
ajout d'eau		2- <input type="checkbox"/>	
ajout de lait en poudre		3- <input type="checkbox"/>	
ajout de conservateurs		4- <input type="checkbox"/>	
autres:.....		5- <input type="checkbox"/>	
• Conditionnement de vente :			
Pots plastiques		1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
sachets		1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
autres:.....			
• Utilisation d'un système de refroidissement lors de la vente :			
		1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
• Température ambiante			
		/...../°C	
• Heures de vente : .....			
• Litrage prélevé chez l'éleveur			
		/...../ L	
• Litrage vendu par jour			
		/...../ L	
• Traitement du lait à la mi-journée			
• Vente de la totalité du lait			
		1- <input type="checkbox"/> oui	2- <input type="checkbox"/> non
si non, que font-ils du reste?.....			
• Qui sont les acheteurs .....			
• Devenir du lait après l'achat			
	1- <input type="checkbox"/> vente	2- <input type="checkbox"/> transformation	3- <input type="checkbox"/> consommation
	4- <input type="checkbox"/> sacrifice	5- <input type="checkbox"/> autres:.....	
• Opinion des acheteurs sur la qualité du lait			
	1- <input type="checkbox"/> bonne	2- <input type="checkbox"/> mauvaise	3- <input type="checkbox"/> acceptable

---

**Annexe 3: Procédure du *focus group***
**Enquête participative et entretien sur l'organisation de la filière lait, l'hygiène et la qualité du lait cru artisanal produit à Abidjan**
**1. Problématique et déroulement**

L'entretien des acteurs de la filière laitière à l'hygiène du lait s'est fait au travers une démarche participative basée sur l'organisation et sur l'évaluation de la perception qu'ils ont de l'hygiène et de la qualité du lait cru ainsi que sur l'identification des sources de contamination potentielle à travers la description de leurs pratiques.

La démarche participative utilisée est inspirée de la méthode PHAST (Participatory Hygiene and Sanitation Transformation) en français Participation à la transformation de l'hygiène et de l'assainissement. C'est une méthode pour promouvoir l'hygiène de l'eau, rédigée par le PNUD/Banque Mondiale et l'OMS pour un programme d'assainissement de l'eau en 1993 dans 4 pays d'Afrique (Botswana, Kenya, Zimbabwe, Ouganda).

Les animations sont prévues sur une journée avec des séances de travail d'une durée maximale de 3 heures de façon à maintenir la concentration des participants.

Les groupes seront de tailles réduites autant que possible (une douzaine de participants) de façon à permettre à chacun de s'exprimer.

**1.1. Première étape : l'identification du problème**
**1.1.1. Identifier les différentes étapes de la production du lait à la vente de lait et des produits laitiers**

Les participants doivent :

1. Énumérer chacune des étapes qui vont s'écouler jusqu'à l'ultime étape qui est la vente du lait cru.
2. Dire pour chacune des étapes, le matériel utilisé et l'organisation nécessaire (qui, quand, comment, ...).

**1.1.2. Poser le problème de l'hygiène du lait**

Les participants doivent :

1. Définir au préalable ce qu'ils entendent par « bon lait ». S'il s'agit de la qualité nutritionnelle (gras...), organoleptique (couleur/goût), d'un lait qui ne rend pas malade, d'un lait qui caille vite ou lentement, d'un lait qui se conserve longtemps, etc.
2. Donner les différents facteurs qui vont influencer la qualité du lait au cours des différentes étapes de la production à la vente du lait.

Noter les thèmes qui ne seront pas abordés par les participants de façon à les interroger plus tard sur ces thèmes et comprendre pourquoi ils ont été omis et les sensibiliser ensuite sur le sujet.

**1.2. Deuxième étape : Analyse du problème**

Les participants doivent :

1. Constituer trois piles avec les problèmes énuméré précédemment, une pile avec les bonnes pratiques qui vont garantir un lait sain, une avec celles qui sont acceptables, et une avec celles qui sont mauvaises.

- Discuter autour des choix

2. Expliquer pour chacune des problèmes énumérés des 3 piles, les contraintes qui peuvent leur empêcher de mettre en œuvre ces pratiques et les raisons qui les conduisent à avoir recours à de mauvaises pratiques.
3. Choisir parmi les pratiques, celles qu'ils jugent incontournables pour avoir un lait sain.
  - Discuter autour des choix
4. Hiérarchiser les pratiques retenues.

### **1.3. Troisième étape : planification des actions à entreprendre**

Pour chaque pratique nouvelle (ou améliorée) les participants doivent déterminer les moyens humains, financiers et matériels nécessaires, ainsi que leur participation et celle qu'ils attendent de l'extérieur pour la mise en œuvre.

### **1.4. Quatrième étape : restitution**

La restitution du travail se fait à la fin de la discussion en présence des deux groupes réunis.

---

**Annexe 4 : Fiche de discussion focus group****Procédure de consentement**

Avant le démarrage des réunions du focus group, le consentement des participants est donné à l'avance.

*Bonjour à tous. Merci d'être venu. Nous vous remercions d'avoir accepté de participer à cet entretien sur l'hygiène et la qualité du lait cru produit localement. Votre opinion est très précieuse pour nous afin d'avoir des informations intéressantes pour l'organisation de la filière laitière.*

Le but de cette étude, est de savoir comment la filière laitière locale est organisée, les conditions de travail, les problèmes rencontrés ainsi que les attentes des acteurs vis-à-vis des autorités politiques. Nous voulons aussi connaître les différentes étapes de la chaîne de production du lait de la ferme au consommateur ; et identifier les sources de contamination potentielle à travers la description de vos différentes pratiques et de votre perception de l'hygiène du lait.

Les informations obtenues seront analysées et des solutions seront proposées aux problèmes que vous rencontrés dans le but d'améliorer la qualité du lait et par-delà augmenter vos revenus.

- Les informations que vous nous donnez sont confidentielles, et vos noms n'y seront pas associés.
- Nous souhaiterions enregistrer la conversation pour être sûr de ne rien oublier de vos préoccupations, et les bandes seront détruites.
- Vous pouvez parler librement et sans tabous, et refuser de répondre à toute question si vous jugez cela nécessaire.
- Nous vous demandons de respecter la confidentialité des informations qui seront recueillies ici et de respecter l'opinion des autres participants.
- Si vous ne comprenez quelque chose à notre démarche, vous pouvez poser des questions ou nous contacter après l'étude.

**Introduction****1- Bienvenue**

Présentation de chaque membre du groupe (organisateur) ainsi que de l'animateur.

- Qui sommes-nous ?
- Ce qui sera fait avec les informations recueillies
- Pourquoi nous sollicitons votre participation ?
- Nous vous présentons nos excuses pour votre temps de travail que nous utilisons

**2- Explication du processus**

Qui a déjà participé à un focus groupe (réunion de ce type) ?

Expliquez que ces groupes de discussion sont de plus en plus utilisés dans le domaine de la recherche en santé publique et en sociologie pour comprendre et connaître les besoins et problèmes des populations à la base.

*Focus groups*

- Nous voulons apprendre de vous (ce qui est positif comme négatif)
- Nous n'essayons pas d'obtenir un consensus dans les réponses, mais nous voulons rassembler toutes les informations.

- Dans ce projet, nous faisons des questionnaires et des groupes de discussion pour obtenir des informations plus intéressantes.

### Logistique

- Le focus group durera deux heures
- Sentez-vous libre de vous déplacer

### 3- Règles

Établissons quelques règles pour être efficace dans la discussion.

- Tout le monde devrait participer
- Pas de conversations latérales
- Les informations fournies sont confidentielles
- Fermez les téléphones portables
- Amusez-vous

### 4- Allumer le dictaphone

### 5- Avez-vous des questions avant que nous ne commençons ?

### 6- Introduction

- Tour de table : présentation des participants ; nom, ethnique, âge, activité dans la filière laitière.

### Questions :

#### I- Relations entre les producteurs

- 1- Quelles sont vos principales activités ? Qu'est-ce que vous faisiez avant ?
2. Quelles relations existent entre vous les producteurs ? (Le type de structure, Fonctionnement, Conditions de travail)
3. Connaissez-vous d'autres laiteries artisanales ? Si Oui : Quelles sont vos relations ?
4. Connaissez-vous les laiteries modernes ? Si Oui : Lesquelles ? Quelles sont vos relations ?
5. Quelles sont vos appréciations sur les produits des laiteries ?
6. Êtes-vous en contact avec des structures et /ou des organisations ? (encadrement, finances, législation, contrôle, coopérative ...)
7. En quelle année avez-vous démarré votre activité ?
8. À qui appartient l'exploitation, le point de vente ? (affaire familiale ou privée)

#### II. Production et commercialisation

1. Identifier les différentes étapes de la production du lait à la vente de lait et des produits laitiers.
2. Quels types de lait produisez-vous ?  
Pour chaque produit (*préciser les informations du tableau suivant*) :

Type de produit	Quantité journalière produite	Quantité Hebdomadaire produite	Quantité mensuelle produite	Quantité consommée par le ménage	Quantité journalière vendue	Quantité restante
	Minimum : Maximum :					
	Minimum : Maximum :					

3. Quelles matières premières utilisez-vous?
4. Quel type d'eau utilisez-vous et comment cette eau est-elle traitée?
5. Où vendez-vous vos produits ? Pourquoi ? A qui les vendez-vous?
6. Quelles sont vos relations avec les clients ?
7. Quelles sont les différentes quantités vendues ? Pourquoi ?
8. Quels sont vos différents prix de vente ? Pourquoi ?
9. Y a-t-il des méventes ? Si Oui : A quels moments ? Pourquoi ?
10. Que faites-vous du lait non vendu ?
11. Tenez-vous une comptabilité de votre activité ?

### **III. Hygiène du lait**

1. Consommez-vous le lait ? Pourquoi ?

2. Mode de consommation

\* Les participants doivent dire comment ils consomment le lait cru, sans traitement, chauffé, fermenté ou réfrigéré. Si le lait est consommé fermenté, quel ferment est utilisé. S'agit-il d'une fermentation spontanée, ajout de yaourt industriel ou un ferment traditionnel.

\* Ils doivent aussi définir la fréquence de consommation (quantité par jour ou par semaine).

3. Poser le problème de l'hygiène du lait

4. Qu'est-ce que le bon lait ?

\*Les participants doivent dire ce qu'ils entendent par « bon lait ». S'il s'agit de la qualité nutritionnelle (gras...), organoleptique (couleur/goût), d'un lait accepté par la laiterie, d'un lait qui caille vite ou lentement, d'un lait qui se conserve longtemps, ou un lait qui rend malade.

5. Avez-vous déjà été malades en consommant le lait ou un membre de votre famille ?

Si oui, quels ont été les symptômes ?

Symptômes	Délai d'apparition des symptômes	Durée et/ou nombre de fois (j/s/m)	Intensité (échelle de 1 à 3*)	Traitement	Hôpital
Fièvre/ Corps chaud					
Toux avec sang					
Toux sans sang					
Difficulté respiratoire					
Vomissements					
Anorexie / Manque d'appétit					
Éruption cutanée					
Diarrhée (3 selles liquides or plus en 24h)					
Diarrhée sanguinolente					
Constipation					
Douleur abdominale					
Frissons					
Perte de poids					
Convulsion					
Douleurs au cou					
Fréquent maux de dos					
Bœuf consommé ces deux dernières semaines					
Produit laitier					
Chèvre					
Porcs					
Volaille					
Abats					
Provenance du produit laitier incriminé					

\*Échelle de l'intensité de la maladie : (1-3) : moins grave ; (4-8): moyennement grave ; (9-10) : grave, hospitalisation.

5. Pourquoi est-on malade en consommant le lait ?

6. Qu'est-ce qu'un lait contaminé (pas bon pour la santé)? Que contient-il ?

7. Comment ces contaminants (débris, bois, résidus d'antibiotiques, sable, pathogènes...) arrivent dans le produit (lait) ?

8. Comment les éliminer avant et après la traite ?

9. Comment obtient-on le lait sain ?

10. Qu'elles sont les mesures prises pour l'obtenir ?

11. Mettez-vous en pratique ces mesures ? Si non pourquoi ?

12. À quoi s'exposent les consommateurs de lait cru contaminés ?

13. Comment est conservé le lait ?

**Annexe 5: Protocole de prélèvement des échantillons de lait****Protocole de prélèvement des échantillons**

Disposer d'une blouse propre  
Nettoyer et désinfecter régulièrement les glacières contenant les prélèvements (eau javellisée) après chaque utilisation.  
Prévoir des sacs Poubelle pour récupérer les déchets (gants à usage unique, papier essuie-mains...) à l'issue des prélèvements.  
Tous les prélèvements doivent être réalisés avec des gants.  
Les gants seront changés chaque fois qu'on réalisera un prélèvement en vue d'une analyse différente.  
Les étiquettes d'identification des échantillons sont à coller sur les flacons AVANT ou juste après le prélèvement s'il n'était pas déjà étiqueté.

**I. CODAGE DES ECHANTILLONS**

Les prélèvements seront désignés par des lettres correspondantes au substrat prélevé et par le numéro d'exploitation, ainsi que par le numéro du jour de réalisation.

**▪ Lait : L**

- lait de quartiers : **LQ**
- lait de vente : **LV**
- lait de tank : **LT**

**▪ EAU: E**

- Eau des lavettes : **EL**
- Eau de traite : **ET**
- Eau de rinçage des ustensiles de traite : **ER**

**▪ Environnement : EN**

- Air : **ENA**
- Mamelle : **EM**

**▪ Mains trayeur : M****II. PRELEVEMENTS****1. L'eau**

Prélever 5 L d'eau pour la précision des analyses, mais si la quantité de matière organique en suspension est trop importante et risque de rendre la filtration impossible, ne prélever que 125 mL et respecter la chaîne de froid.

**1.1. L'eau de traite**

Bien agiter l'eau dans la barrique ou les abreuvoirs. Prélever (on peut tremper le flacon dans l'eau) 125 ou 180 mL d'eau utilisée lors de la traite (porter des gants de fouille si le bac est profond) et le conserver directement dans la glacière contenant de la glace.

**1.2. L'eau des lavettes (jus des lavettes sales)**

- Prélever 100 ou 180 mL de l'eau issue du lavage des ustensiles de traite avant la traite.
- Utiliser des flacons stériles, de l'eau distillée stérile et porter des gants.

## **2. L'environnement**

### **2.1. Prélèvements d'environnement par écouvillonnage**

- Ouvrir un pot stérile et le poser sur le sol dans les endroits susceptibles d'être souillé par les fèces, par les effluents d'élevage ou par des déchets pendant 15 min.
- Verser de l'eau tamponnée 0.1 % dans le pot, bien refermer et secouer doucement pour bien répartir l'eau tamponnée 0.1 %.

### **2.2. Prélèvement par écouvillonnage sur les mamelles**

- Frotter l'écouvillon sur l'ensemble de la mamelle et mettre l'écouvillon dans un pot stérile et la garder au frais jusqu'au laboratoire.

## **3. Le lait cru à la vente**

- Le lait contenu dans la bouteille plastique du vendeur (sélectionné) doit être mélangé par retournement de la bouteille avant le prélèvement.
- De la bouteille du vendeur, 150 mL de lait doit être versés directement dans le flacon à cape rouge stérile (flacon préalablement étiqueté).
- Porter des gants et ne toucher ni l'intérieur du pot ni la face interne de la cape rouge.

## **4. Laits de quartiers**

- À main nue
- Après préparation de la mamelle par l'éleveur et élimination des premiers jets
- Désinfecter les trayons à l'alcool 70°
- Ouvrir le flacon stérile en tenant le bouchon dans la même main.
- Prélever 150 mL en commençant par le quartier le plus proche
- Bien identifier les flacons : n° de l'animal.

## **5. Mains du trayeur**

- Écouvillonnage des mains des trayeurs avant chaque traite.

Les échantillons de laits et les échantillons environnementaux sont acheminés au laboratoire à + 4 °C dans des glacières différentes.

**Annexe 6:** Protocole de laboratoire pour le dénombrement et l'isolement de *Bacillus cereus* dans le lait et dans l'*attiéké*

**Protocole de laboratoire pour le dénombrement et l'isolement de  
*Bacillus cereus* dans le lait et dans l'*attiéké***

**I- LAIT**

Les échantillons sont transportés au laboratoire dans une glacière contenant des morceaux de glace de sorte à obtenir une température d'environ 4° C dans les 2 heures qui suivent le prélèvement.

**1- Recherche de résidus d'antibiotiques : test de yaourt**

C'est un test qualitatif qui permet de déterminer la présence ou l'absence de résidus d'antibiotiques utilisés dans le traitement des infections chez les animaux en lactation. Ce test met en évidence l'éventuelle présence d'un antibiotique par inhibition d'une souche de *Streptococcus thermophilus* (ferment lactique) qui ne produira pas d'acide dans l'échantillon et ne fera pas coaguler le lait et l'indicateur de pH ne changera pas de couleur.

**• Procédés**

- 1 - Préparation des témoins
  - témoins négatifs constitué de 10 mL de lait négatif (lait en poudre reconstituée avec une poudre testée négative).
  - témoins positifs sont constitués de 2 tubes dont l'un contient 10 mL de lait négatif et 0,5µg/mL d'oxytétracycline et l'autre 10 mL de lait négatif et 0,04UI/mL de pénicilline G.
- 2 - Mettre 10 mL de lait de quartiers dans un tube et pasteuriser pendant 5 min dans le bain-marie de 80-90°C et refroidir à 45°C.
- 3- Ajouter aux tubes témoins positifs et au tube contenant le lait de quartiers 1 mL de ferment (yaourt nature Dodone).
- 4- Ajout de 2 gouttes d'indicateur coloré (solution de bromocrésol pourpre (dissoudre 1g dans 300 mL d'eau) dans tous 4 les tubes.
- 5- incuber pendant 3h dans une étuve à 45°C et procéder à l'interprétation.

**• Résultat**

Les échantillons qui montrent une acidification (virage de l'indicateur du bleu au jaune) et coagulation ne contiennent pas d'antibiotiques. Les autres (couleur bleu et lait liquide) sont positif donc présence d'antibiotiques.

**2- Test a la résazurine**

C'est une variante du test de réduction au bleu de méthylène avec une appréciation de la qualité basée sur la couleur produite après une période d'incubation. La durée du test varie de 1 à 3 heures avec une lecture en 3 étapes (après 1, 2, 3 heures d'incubation).

Le réactif est préparé avec 1 comprimé de résazurine dans 50 mL d'eau distillée stérile. Un millilitre de réactif de résazurine est ajouté à 10 mL de lait cru et incubé à 37°C pendant 1 heure.

**• Résultat**

La couleur obtenue est fonction de la charge bactérienne du lait.

Grade	Couleur	Qualité
<b>I</b>	Bleu à Bleu mauve	Bon
<b>II</b>	Rose	Moyen
<b>III</b>	Blanc ou clair	Mauvais

### 3. Mesure de la densité du lait de vente.

Cette mesure permettra de déceler le lait falsifié par mouillage (ajout d'eau, eau salée, lait de mélange).

- **Procédé**

Peser 10 mL de lait de vente ( $m_l$ ) et 10 mL d'eau ( $m_e$ ). La densité ( $d$ ) du lait est calculée avec la formule suivante :

$$d = m_l / m_e$$

- **Résultat**

La densité du lait de vache non modifié est comprise entre 1,028 et 1,033. Un lait mouillé ou contenant une quantité de graisse élevée présente des valeurs densimétriques inférieures à 1,028. Le lait écrémé a des valeurs élevées entre 1,033 à 1,037.

### 4-Analyse bactériologique

#### Isolement de *Bacillus cereus*

- Manipulation des unités d'échantillonnage

Les unités d'échantillonnage sont gardées au réfrigérateur (0 - 5°C) jusqu'au moment de l'analyse. Ce qui empêche la croissance ou la mort des bactéries présentes dans l'unité d'échantillonnage. Les unités d'échantillonnage sont analysées aussitôt que possible après leur arrivée au laboratoire.

- Préparation de l'analyse

Avoir sous la main du bouillon stérile d'enrichissement à l'eau peptonée 0.1 %. Nettoyer la surface de travail avec un désinfectant.

- Préparation de l'échantillon

Pour obtenir une unité d'analyse représentative, agiter le substrat jusqu'à homogénéité.

- Méthode d'enrichissement

Ajouter 10 mL de substrat bien homogénéisé ou 10 g de l'échantillon à analyser (l'unité d'analyse) à 90 mL d'eau peptonée 0,1 % dans un bocal stérile. Bien mélanger au vortex ou en agitant la bouteille 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant 7 secondes environ.

Effectuer des dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  en ajoutant à chaque fois 1 mL de la dilution inférieure dans 9 mL d'eau peptonée tamponnée.

Incuber à 37° C pendant 30 min.

## II- ATTIÉKÉ

### 1- Échantillons d'attiéké à analyser

Le dénombrement et la recherche de *Bacillus cereus* sont effectués sur les échantillons de l'Environnement (**E**), de Racine Fraîche de manioc (**RF**), de Ferment (**F**), Huile de palme décolorée (**HP**), de Pâte de racine de manioc Broyée (**PB**) (ferment, racine fraîche de manioc, huile de palme décolorée, eau), Pâte Fermentées (**PF**), Pâte Pressée (**PP**), Grains Séchés (**GS**), *attiéké* fraîchement préparé (**AC**) et l'*attiéké* vendu sur les différents marchés ou dans les quartiers proches des zones de préparations (**AT**), Eau utilisée pour le lavage des cossettes (**EC**), environnement (**EAA**).

Sites :

- Abobodoumé : **AB**
- Azito : **AZ**
- Abobo BC : **BC**
- Anoumambo : **MA**
- Siporex : **SIP**
- Abobo gare : **ABG**

Exemples :

Pâte fermentée de manioc prélevée chez la productrice n° 1 d'Abobodoumé : **ABPF1**

## 2- Prélèvements

Prélever au cours de la préparation de l'*attiéké* les échantillons sus-dessus mentionnés de façon aseptique dans un sac Stomacher. Les échantillons sont transportés sauf l'*attiéké* vendu sur les marchés, au laboratoire dans une glacière contenant de la glace à une température avoisinant 4°C.

Il ne faut pas oublier de prendre la température ambiante ainsi que celle des différents produits sauf celle de l'*attiéké* qui sera prise au laboratoire.

## 3- Manipulation au laboratoire

### 3-1- Mesure de la température de l'*attiéké*

Une fois au laboratoire, la température de l'*attiéké* est prise.

Avant tout, peser l'échantillon d'*attiéké* pour déterminer sa masse.

### 3-2- Détermination du pH

Broyer au Stomacher 10 g de produit dans 90 mL d'eau distillée stérile. Déterminer à l'aide d'un pH-mètre le pH de la suspension obtenue et noter.

### 3-3- Dénombrement et isolement de *Bacillus cereus*

#### 3-3-1 Préparation pour l'analyse

Préparer un diluant à l'eau peptonée stérile à 0,1 %.

Nettoyer la surface de travail au moyen d'eau de javel à 1,2° Chl.

#### 3-3-2 Préparation de l'échantillon

Constituer l'unité d'analyse en prélevant des portions à différents endroits de l'unité d'échantillonnage.

Préparer une dilution 1:10 du substrat à analyser en ajoutant de façon aseptique 10 g de l'unité d'analyse à 90 mL de diluant à l'eau peptonée 0,1 %. Broyer les échantillons solides au Stomacher. Mélanger la bouteille de dilution 25 fois en suivant un arc de 30 cm pendant 7 secondes environ.

Prélever dans un premier tube à essai 10 mL de la dilution 1 :10 de chaque unité d'analyse puis préparer les dilutions décimales successives dans l'eau peptonée 0,1 % jusqu'à  $10^{-3}$  de façon requise en utilisant une pipette stérile distincte pour chaque transfert.

Pour la recherche de spores de *Bacillus cereus*, prélever dans un second tube à essai stérile 20 mL de la dilution  $10^{-1}$  (en utilisant de l'eau peptonée à 0,1 %). Prélever également 20 mL de la dilution  $10^{-1}$  dans un autre tube et placer un thermomètre dans ce dernier tube (Tube témoin).

Placer les tubes dans un bain-marie à 85°C et les agiter par intermittence jusqu'à ce que le thermomètre du tube témoin indique 85°C. Maintenir cette température pendant 20 mn.

Utiliser de l'eau peptonée 0,1 % pour préparer les autres dilutions requises à partir de la dilution  $10^{-1}$  chauffée. (Les dilutions suggérées sont  $10^{-1}$  et  $10^{-2}$ ). Utiliser une pipette stérile distincte pour chaque transfert.

Avant d'effectuer les transferts, agiter toutes les dilutions afin d'assurer une distribution uniforme des microorganismes présents.

**NB :** Les dilutions décimales sont effectuées en ajoutant à chaque fois 1 mL de dilution inférieure dans 9 mL d'eau peptonée 0,1 %.

#### 3-3-3 Culture sur gélose sélective

Étaler 0,1 mL de chaque dilution à la surface d'une boîte pré-coulée de gélose Mossel à l'aide d'un étaleur stérile. Incuber les boîtes à 30°C pendant 18 à 24 heures. Pour la recherche de spores de *Bacillus cereus*, incuber à 37°C pendant 48 heures.

#### 3-3-4 Numération des colonies

Examiner et compter le plus tôt possible après le temps d'incubation les colonies caractéristiques de *Bacillus cereus*.

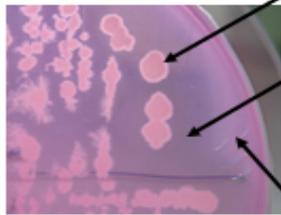
Choisir si possible les boîtes de gélose qui contiennent moins de 150 colonies, y compris les colonies en formation (même très petites). Sinon, choisir celles dont le nombre se rapproche le plus de 150 colonies.

Compter les colonies au moyen d'un compteur approprié et d'un registre de contrôle. Si des boîtes présentent une croissance confluyente, on calcule la numération totale d'une boîte en multipliant le dénombrement de la zone représentative par la réciproque de la fraction de la boîte dénombrée. Par exemple, 30 colonies dénombrées sur  $\frac{1}{4}$  de la surface de la boîte donnent un dénombrement total de  $30 \times 4 = 120$  colonies.

Sur ce milieu, les colonies caractéristiques des bactéries du groupe *B. cereus* sont rugueuses, sèches, roses (mannitol -), entourées d'un halo de précipitation de couleur rose et d'une zone transparente indiquant la production d'une lécithinase.

#### Lecture de la gélose de Mossel

n° pair



Colonie rose → pas d'utilisation du mannitol par les *Bacillus* → MANNITOL -

Présence d'un halo clair autour de la culture → les protéines du jaune d'oeuf ont été hydrolysées par les protéases des *Bacillus*.

Présence d'un halo opaque autour de la culture → les lécithines ont été hydrolysées par la lécithinase des *Bacillus*.

Suspicion de *Bacillus cereus*

Identification de l'espèce: *Bacillus* présentant divers enzymes ( $\alpha$ -amylase, lécithinase, protéases), glc+, xylose-, arabinose -, culture caractéristique sur Mossel → *Bacillus cereus*.

Encercler les colonies présumées et laisser les boîtes 24 heures supplémentaires à température ambiante pour permettre la détection de toutes les colonies de *Bacillus cereus*.

#### 4- Identification biochimique ou confirmation

Si les colonies semblent bien isolées sur les géloses sélectives (gélose Mossel), procéder à l'identification biochimique.

Si les colonies suspectes ne sont pas bien isolées, procéder à la purification des colonies caractéristiques. Pour cela, ensemencé en stries, sur des boîtes de gélose Mossel un minimum de 5 colonies suspectes provenant de chaque gélose présumée positive pour purification. Incuber les géloses à 37°C pendant  $24 \pm 2$  h.

Repiquer les colonies pures sur gélose TSA et incuber à 37°C pendant 24 heures pour l'identification biochimique.

Faire le test de la catalase

Déterminer la morphologie (bacille ou cocci) par observation microscopie d'un frottis (x 100) et le type de Gram par le test au KOH.

Faire les tests de la fermentation du glucose avec le milieu Kligler-Hajna, l'utilisation du mannitol et la mobilité avec le milieu mannitol mobilité nitrate, l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

##### ✓ Test de la catalase

Une goutte d'eau oxygénée sera placée sur une lame et un peu de culture pure prélevé sur une colonie en milieu solide y sera déposé : un dégagement gazeux sous forme de mousse ou de bulles traduit une catalase positive alors que son absence correspond à une catalase négative.

##### ✓ Identification de la morphologie

Pour déterminer la morphologie des isolats, une portion d'une colonie bactérienne bien pure sera étalée sur une lame avec deux gouttes d'eau distillée stérile. L'étalement sera observé au microscope (X10, X40 et X100) pour observer si la bactérie est un bacille ou une cocci.

### ✓ Test à la KOH

Le type de gram sera déterminé par le test au KOH (**Powers, 1995**). Ce test se base sur le fait que la paroi des bactéries Gram négatif est lysée par le KOH, alors que celle des bactéries Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui formera une substance visqueuse au contact du KOH.

Les cultures à examiner ne doivent pas être âgées de plus de 48 heures. Il sera prélevé avec une effilure de pipette Pasteur une portion d'une colonie bactérienne qui sera placée dans deux gouttes d'une solution de KOH à 3 % sur une lame propre. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH durant 15 à 30 secondes, l'effilure de la pipette sera retirée lentement du liquide. Lorsque la bactérie est Gram négatif (KOH positif), il se formera un filament visqueux, bien visible. Pour une bactérie Gram positif (KOH négatif), il ne se formera pas de filament visqueux.

### ✓ Tests biochimiques complémentaires

- Le milieu Kligler-Hajna pour la mise en évidence de la fermentation du glucose en anaérobiose. Le virage du milieu au jaune indique une réaction positive (glucose +)

- Le milieu mannitol-mobilité pour l'utilisation du mannitol et la mobilité. Le virage de l'indicateur de pH indique mannitol + et le développement des colonies dans tout le tube en dehors de la piqûre centrale indique que l'isolat est mobile.

- Citrate de Simmons pour la mise en évidence de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone. Le développement de colonies sur la piqûre centrale indique une réaction positive (catalase +)

L'ensemencement du culot se fera d'abord par piqûre centrale avec une pipette Pasteur ouverte puis la surface inclinée par des stries serrées avec une pipette Pasteur cassée. Les tubes seront incubés à 30° C pendant 18-24 heures.

- Mettre en évidence l'hydrolyse des lécithines sur gélose à l'œuf coulée en boîte de Pétri. La gélose à l'œuf est une gélose préparée avec une gélose TSA additionnée de 10 % de jaune d'œuf. Ensemencer par une strie centrale à partir d'une suspension bactérienne de moins de 48 h. Présence d'un halo clair autour de la culture indique que les lécithines ont été hydrolysées par la lécithinase des *Bacillus*.

*Les bactéries du groupe B. cereus sont des bacilles Gram positif souvent groupées en chaînette, lécithinase positif, catalase positif, généralement mobile grâce à une ciliature péritriche (sauf B. anthracis qui est immobile), mannitol négatif et citrate positif.*

Après l'identification présomptive des isolats, le dénombrement moyen a été calculé selon la norme **ISO 7218 (2007)** (formule 7).

Après l'identification présomptive des isolats, le dénombrement moyen a été calculé selon les **formules 1 et 2 (ISO 7218, 2007)**.

$$C = \frac{b}{A} \times N_p$$

**Formule 1**

Où *C* est le nombre de colonies par boîtes retenues après identification biochimique, *b* est le nombre de colonies confirmées du groupe *B. cereus*, *A* est le nombre total de colonies présumées du groupe *B. cereus* testé, *N<sub>p</sub>* est le nombre de colonies comptées présumées du groupe *B. cereus* en UFC/g ou UFC/mL.

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0,1 \times n_2) \times d}$$

Formule 2

Où  $n_1$  est le nombre de boîtes de la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.  $n_2$  est le nombre de boîtes de la dilution qui précède la toute première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.  $d$  est le taux de dilution de la première dilution à laquelle les colonies ont pu être comptées.  $N$  est le dénombrement moyen du groupe *B. cereus* en UFC/g ou UFC/mL.  $\sum C$  est la somme des colonies dans toutes les boîtes retenues après identification biochimique.

Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont été conservés à -20 °C et -80 °C en double dans du lait écrémé stérile contenant 0,2 % d'extrait de levure et 30 % de glycérol (Saidi *et al.*, 2002).

## 5. Conservation des isolats

### 5-1- Conservation à courte durée

Gélose de conservation courte ou longue durée

Formule :

Extrait de Viande	5g
Peptone	10g
NaCl	5g
Agar	10g
Eau distillée ou déminéralisée	1L

Chauffer en agitant jusqu'à l'ébullition pour obtenir une dissolution complète, répartir à raison de 3 mL dans les tubes 9,5-10 x 95mm à vis (ou 1 mL dans les cryotubes de type Nunc de 1,5 à 2 mL). Stériliser pendant 15 min à 121°C. Solidifier en culot

Ensemencer par piqûres centrales à l'aide d'un fil de platine, bien chargé d'une culture prélevée sur un milieu solide (gélose nutritive, gélose Trypto-caséine-soja, PCA, MH, gélose blanche) ;

Incuber une nuit à 30°C. Viser à fond la capsule métallique pour éviter la dessiccation ;

Conserver à l'abri de la lumière, entre 10 et 20°C en évitant si possible les variations de température.

**NB :** Ce procédé peut être aussi utilisé pour le transport des isolats et pour des conservations à longue durée à 80°C.

### 5. 2- Conservation à longue durée

À partir des cultures jeunes de 18-48 h dans un bouillon BCC, les spores sont récupérées par centrifugation à 4000 t/min pendant 5 min. Une fois le surnageant, éliminé, le milieu de conservation sera ajouté sur le culot. Le milieu de conservation contient du lait écrémé stérile, 0,2 % d'extrait de levure et 30 % de glycérol. Les cultures seront conservées en suspension dense et en tubes Eppendorf (ou Nunc selon la disponibilité) à -20°C. Les suspensions concentrées résistent mieux à la congélation. En cas de besoin, les cultures seront repiquées dans le lait écrémé stérile à 0,5 % d'extrait de levure, avant utilisation (Saidi *et al.*, 2002).

**Annexe 7 : Identification moléculaire, recherche de gènes de virulence et antibiogramme des souches de *Bacillus cereus* isolées à Abidjan (Côte d'Ivoire)**

**Protocole de laboratoire**  
**Identification moléculaire, recherche de gènes de virulence et antibiogramme des souches de *Bacillus cereus* isolées à Abidjan (Côte d'Ivoire)**

**Étudiant :** YOBOUET Bassa Antoine <sup>1, 2, 3</sup>

**Directeur de Thèse:** Pr. DJE Koffi Marcellin <sup>1</sup>

**Co-directeur :** Pr. Dr. BASSIROU Bonfoh <sup>2</sup>

**Encadreur-superviseur :** Dr. Dadié Adjéhi <sup>1</sup>

**Encadreur-tutorat :** Pr. Dr. MEILE Leo <sup>3</sup>

<sup>1</sup>- Université d'Abobo-Adjamé, UFR des Sciences et Technologie des Aliments / Laboratoire de biotechnologie et de microbiologie alimentaire, 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire.

<sup>2</sup>- Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, Département Environnement et Santé, Groupe de Recherche Nutrition, Qualité et Analyse des Risques (NQAR), 01 BP 1303 Abidjan 01.

<sup>3</sup>- Laboratory of Food Biotechnology / Institute of Food, Nutrition and Health (IFNH), ETH Zürich, Suisse, Schmelzbergstrasse 7, CH-8092 Zurich.

### **1- Obtention des souches de *Bacillus cereus***

Les souches de *Bacillus cereus* conservées à – 80 °C seront revivifiées dans 10 ml d'eau peptonée 0,1 % pendant une nuit à 30°C. Le bouillon obtenu sera utilisé pour ensemercer une boîte de gélose Mossel (MYP) préalablement coulée, puis incubé à 30° C pendant 18-24 heures.

Sur le milieu Mossel, les colonies caractéristiques de *Bacillus cereus* sont rugueuses, sèches, rose-violettes, entourées d'une zone transparente et d'un halo de précipitation de la même couleur dû au jaune d'œuf.

Si les colonies caractéristiques sont bien isolées et pures on procédera à quelques tests de confirmation (catalase, KOH et morphologie). Sinon une colonie bien isolée sera purifiée par un ensemencement en stries, sur une gélose plate count agar (PCA) et incubée à 37° C pendant 18-24h.

- Faire le test de la catalase
- Type de Gram par le test au KOH (**Power, 1995**)

Le test au KOH se base sur le fait que la paroi des bactéries Gram négatif est lysée par le KOH, alors que celle des bactéries Gram positif n'est pas détruite. Chez les bactéries Gram négatif, la lyse de la paroi libère l'ADN qui formera une substance visqueuse au contact du KOH.

Les cultures à examiner ne doivent pas être âgées de plus de 48 heures. Il est prélevé avec une effilure de pipette Pasteur une portion d'une colonie bactérienne qui est placée dans deux gouttes d'une solution de KOH à 3 % sur une lame propre. Après avoir homogénéisé la culture dans le KOH durant 15 à 30 secondes, l'effilure de la pipette est retirée lentement du liquide. **Lorsque la bactérie est Gram négatif (KOH positif), il se forme un filament visqueux, bien visible. Pour une bactérie Gram positif (KOH négatif), il ne se forme pas de filament visqueux.**

- Morphologie

Pour vérifier la morphologie de la bactérie, une portion d'une colonie bactérienne bien pure sera étalée sur une lame avec deux gouttes d'eau distillée stérile. L'étalement sera observé au microscope (X10, X40 et X100) pour observer si la bactérie est un bacille ou une cocci.

Les souches de *Bacillus cereus* seront conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$  et à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans du BCC après une incubation d'une nuit à  $30^{\circ}\text{C}$  et additionnées de 15 % de glycérol (v/v).

## 2- Réaction de polymérisation en chaîne

### 2-1- Extraction de l'ADN

L'ADN sera extrait comme décrit précédemment par **Bassa et al. (2010)** et **Kastner (2008)** avec une légère modification. La veille de l'extraction, la souche bactérienne sera cultivée sur gélose PCA et incubée à  $30^{\circ}\text{C}$  pendant 18-24 heures. Deux à 6 colonies bien isolées seront prélevées et triturées dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon Tris-EDTA (50 mM Tris-bases pH 8, 1 mM EDTA 0,5 % SDS et 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de protéinase K) dans les microtubes de 1,5 ml (tube Eppendorf). Le mélange sera vortexé 30 secondes afin d'obtenir une suspension homogène. Le mélange sera incubé à  **$55^{\circ}\text{C}$  pendant 3 heures**. La protéinase K sera inactivée par **chauffage du mélange à  $95^{\circ}\text{C}$  pendant 10 minutes**. Les spores seront lysées par la protéinase K. Le SDS va solubiliser les phospholipides et les protéines membranaires. Le lysat sera centrifugé à 12 000 g pendant 10 minutes. Le surnageant qui contient l'ADN total (chromosomique et plasmidique) sera récupéré dans un nouveau microtube.

### 2-2- Évaluation de la qualité et de la quantité de l'ADN extraite

#### 2-2-1- Évaluation de la quantité

La quantité d'ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) extraite sera déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre (Nano-Drop ND-1000 Spectrophotometer). Cet appareil mesure la DO à 260 nm puis détermine la quantité d'ADN ( $\text{ng}/\mu\text{l}$ ) en multipliant la valeur de l'absorbance par 50 (standard pris comme facteur de dilution).

#### 2-2-2- Évaluation de la qualité

La qualité de l'ADN sera d'abord vérifiée par une autre mesure la DO prise à 280 nm permettra d'évaluer également la quantité de protéine contenue dans la suspension d'ADN. Ainsi, le rapport entre ces deux mesures ( $\text{DO}_{260}/\text{DO}_{280}$ ) constitue un moyen évaluatif numérique permettant d'apprécier la qualité ou la pureté de l'extrait d'ADN. En effet, l'extrait d'ADN sera qualifié de meilleur ou pur si ce rapport est compris entre 1,8 et 2. L'extrait sera dilué pour obtenir une concentration voisine de 100  $\text{ng}/\mu\text{l}$  puis conservé à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Une seconde vérification de la qualité de l'ADN s'effectuera par amplification et migration du gène *16S rADN* caractéristique des Eubactéries.

### 2-3- Amplification moléculaire

Le mélange réactionnel ainsi que la réaction PCR doivent être, en fonction de chaque technique moléculaire, adaptés au gène à amplifier.

#### 2-3-1- Préparation du mélange réactionnel (mix)

Le mélange réactionnel sera préparé comme décrit précédemment par **Zhou et al. (2008)** et ; **K. Oliwa-Stasiak al. (2010)** avec une légère modification. Le mélange réactionnel de 25  $\mu\text{l}$  (30  $\mu\text{l}$  pour une PCR triplex) sera composé d'eau Milli-Q stérile, de 2 % de tween 20, de 12,5  $\mu\text{l}$  (15  $\mu\text{l}$  pour une PCR triplex) de PCR master mix 2X (4mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,4 mM de chaque dNTPs, 0,05 mM Taq polymérase), de 0,25  $\mu\text{l}$  (0,3  $\mu\text{l}$  pour une PCR triplex) de chaque amorce (100  $\mu\text{M}$ ), et de 1  $\mu\text{l}$  (5  $\mu\text{l}$  pour une PCR triplex) de la matrice d'ADN.

L'ordre des réactifs comme ci-dessus énumérés sera rigoureusement respecté.

**NB :** Pour plusieurs échantillons, des calculs seront effectués pour la préparation du mélange réactionnel en prévoyant 4 volumes supplémentaires d'un tube (un volume pour le témoin positif, 1 autre pour le témoin négatif et 2 volumes pour les pertes lors de l'aliquotage).

Le « prémix » ainsi préparé est reparti dans les microtubes de 0,2 ml, préalablement identifiés. Dans le témoin négatif l'ADN est remplacé par de l'eau milli-Q stérile.

#### 2-3-2- Amplification du gène *16S rADN*

La séquence nucléotidique de l'amorce pour l'amplification du gène *16S rADN* est consignée dans le tableau IX.

**Tableau I** : Préparation du prémix pour l'amplification du gène *16S rADN* (Schwenninger et al., 2005)

	Volume de réactif pour 1 échantillon (µl)
<b>Eau Milli Q stérile</b>	10,48
<b>Tween 20 (2 %)</b>	0,52
<b>PCR Master Mix 2X</b>	12,50
<b>Amorce bak 4 100 µM</b>	0,25
<b>Amorce bak 11w 100 µM</b>	0,25
<b>ADN (100 ng/µl)</b>	1
<b>Total</b>	25

L'amplification du gène *16S rADN* s'effectuera selon le procédé décrit par **Miescher Schwenninger et al., (2005)** dans un thermocycleur (T3000 Thermocycler, Block type standard 3a, Biometra). Le programme comprendra une dénaturation initiale de 3 minutes à 95°C et une phase cyclique répétée 40 fois. Chaque cycle d'amplification sera constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 95°C, d'une étape de fixation (hybridation) des amorces de 30 secondes à 60°C et d'une étape d'élongation de 2 minutes à 72°C. La réaction sera terminée par une élongation finale de 7 minutes à 72°C. Les échantillons seront conservés à +4° C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur (tableau XIII).

À la fin de l'amplification, un volume de 10 µl de chaque amplicon sera révélé par électrophorèse (migration horizontale) à 90 V pendant 1 H 30 min sur gel d'agarose 1,5 % dans un tampon 1X TAE pH 8,0 (0,89 mol.l<sup>-1</sup> de Tris-base, 20 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 0,89 mol.l<sup>-1</sup> Acide acétique). Le gel sera coloré dans un tampon supplémenté de BET (0,5 µg/ml) puis lavé à l'eau et la révélation sera faite par illumination du gel sur une plaque UV d'un dispositif d'éclairage par transillumination avant la réalisation d'une photo (Molecular Imager Gel Doc<sup>TM</sup> XR+, BioRad).

La taille des amplicons sera estimée par comparaison avec les bandes d'un marqueur de masse moléculaire (TriDye<sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder, BioLabs).

#### 2-4- Identification moléculaire

##### 2-4-1- Détermination du groupe *Bacillus cereus* : Amplification du gène *motB*

La séquence nucléotidique de l'amorce pour l'amplification du gène *motB* est consignée dans le tableau XIII.

**Tableau II** : Préparation du prémix pour l'amplification du gène *motB* (Oliwa-Stasiak *al.*, (2010))

		Volume de réactif pour 1 échantillon ( $\mu\text{l}$ )
Eau Milli Q stérile		10,48
Tween 20 (2 %)		0,52
PCR Master Mix 2X		12,50
Amorce BCFomp1	100 $\mu\text{M}$	0,25
Amorce BCRomp1	100 $\mu\text{M}$	0,25
ADN (100 ng/ $\mu\text{l}$ )		1
<b>Total</b>		25

Le programme d'amplification du gène *motB* comprendra une dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C et une phase cyclique répétée 30 fois. Chaque cycle d'amplification sera constitué d'une étape de dénaturation de 30 secondes à 94°C, d'une étape de fixation (hybridation) des amorces d'une minute à 54,5°C et d'une étape d'élongation d'une minutes à 72°C. La réaction sera terminée par une élongation finale de 5 minutes à 72°C. Les échantillons seront conservés à +4° C jusqu'à l'arrêt du thermocycleur (tableau XIII).

À la fin de l'amplification, un volume de 5  $\mu\text{l}$  de chaque amplicon sera révélé par électrophorèse (migration horizontale) à 90 V pendant 1 H 30 min sur gel d'agarose 1,5 % dans un tampon 0,5X TAE pH 8,0 (0,89 mol.l<sup>-1</sup> de Tris-base, 20 mmol.l<sup>-1</sup> EDTA, 0,89 mol.l<sup>-1</sup> Acide Acétique) comme décrit plus haut.

### 3- Recherche des gènes de virulence.

La séquence nucléotidique de l'amorce pour l'amplification des gènes *hblA*, *hblC*, *hblD*, *nheA*, *nheB*, *nheC*, *Ces*, *CytK*, *CytK1*, *CytK2* et *bceT* est consignée dans le tableau XIII.

#### 3- 1- Préparation du prémix

Le mix sera préparé comme décrit plus haut

**Tableau III** : Préparation du prémix pour l'amplification des gènes *hblA*, *nheA* et *bceT* par PCR multiplex (Zhou *et al.*, (2008) ; Guinebretiere *et al.*, (2002) ; J. Minnaard *et al.*, (2007))

		Volume de réactif pour 1 échantillon ( $\mu\text{l}$ )
Eau Milli Q stérile		7,58
Tween 20 (2 %)		0,63
PCR Master Mix 2X		15
Amorce HBA F	100 $\mu\text{M}$	0,30
Amorce HBA R	100 $\mu\text{M}$	0,30
Amorce NHA F	100 $\mu\text{M}$	0,30
Amorce NHA R	100 $\mu\text{M}$	0,30
Amorce ET F	100 $\mu\text{M}$	0,30
Amorce ET R	100 $\mu\text{M}$	0,30
ADN (100 ng/ $\mu\text{l}$ )		5
<b>Total</b>		30

**Tableau IV** : Préparation du prémix pour l'amplification des gènes *hblC* et *hblD* par PCR multiplex (Zhou et al., (2008) ; Guinebretiere et al., (2002))

	<b>Volume de réactif pour 1 échantillon (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Eau Milli Q stérile</b>	9,98
<b>Tween 20 (2 %)</b>	0,52
<b>PCR Master Mix 2X</b>	12,50
<b>Amorce HBC F 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,25</b>
<b>Amorce HBC R 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,25</b>
<b>Amorce HBD F 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,25</b>
<b>Amorce HBD R 100 <math>\mu</math>M</b>	<b>0,25</b>
<b>ADN (100 ng/<math>\mu</math>l)</b>	1
<b>Total</b>	25

**Tableau V** : Préparation du prémix pour l'amplification des gènes *nheB* et *nheC* par PCR multiplex

(Zhou et al., (2008) ; Guinebretiere et al., (2002))

	<b>Volume de réactif pour 1 échantillon (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Eau Milli Q stérile</b>	9,98
<b>Tween 20 (2 %)</b>	0,52
<b>PCR Master Mix 2X</b>	12,50
<b>Amorce NHB F 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>Amorce NHB R 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>Amorce NHC F 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>Amorce NHC R 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>ADN (100 ng/<math>\mu</math>l)</b>	1
<b>Total</b>	25

**Tableau VI** : Préparation du prémix pour l'amplification du gène *Ces* (Zhou et al., (2008) ; Ehling-Schulz et al., (2005b))

	<b>Volume de réactif pour 1 échantillon (<math>\mu</math>l)</b>
<b>Eau Milli Q stérile</b>	10,48
<b>Tween 20 (2 %)</b>	0,52
<b>PCR Master Mix 2X</b>	12,50
<b>Amorce CES F1 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>Amorce CES R2 100 <math>\mu</math>M</b>	0,25
<b>ADN (100 ng/<math>\mu</math>l)</b>	1
<b>Total</b>	25

**Tableau VII** : Préparation du prémix pour l'amplification du gène *CytK* (Zhou et al., (2008) ; Guinebretiere et al., (2006))

	Volume de réactif pour 1 échantillon ( $\mu$ l)
Eau Milli Q stérile	10,48
Tween 20 (2 %)	0,52
PCR Master Mix 2X	12,50
Amorce CK F 100 $\mu$ M	0,25
Amorce CK R 100 $\mu$ M	1
ADN (100 ng/ $\mu$ l)	1
<b>Total</b>	<b>25</b>

**NB** : On procédera à la recherche des gènes *CytK-1* et *CytK-2* si et seulement si la souche héberge le gène *CytK*.

**Tableau VIII** : Préparation du prémix pour l'amplification des gènes *CytK-1* et *CytK-2* par PCR multiplex (Zhou et al., (2008) ; Guinebretiere et al., (2006))

	Volume de réactif pour 1 échantillon ( $\mu$ l)
Eau Milli Q stérile	9,98
Tween 20 (2 %)	0,52
PCR Master Mix 2X	12,50
Amorce CK1 F 100 $\mu$ M	0,25
Amorce CK1 R 100 $\mu$ M	0,25
Amorce CK2 F 100 $\mu$ M	0,25
Amorce CK2 R 100 $\mu$ M	0,25
ADN (100 ng/ $\mu$ l)	1
<b>Total</b>	<b>25</b>

### 3- 2- Amplification des gènes de virulence (voir Tableau IX)

Le programme d'amplification des différents gènes est consigné dans le tableau IX

Gènes	Code des amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille amplicon (pb)	Température hybridation (°C)	Sources
Eubactérie	bak4	AGGAGGTGATCCARCCGCA	95°C, 3 min	~1500	60	Schwenninger
<i>16S rADN</i>			40 x [95°C, 15 s; 60°C, 30 s; 72°C, 120 s]			et al., 2005
	bak11w	AGTTTGATCMTGGCTCAG	72°C, 7 min			
<i>motB</i>	BCFomp 1	ATCGCCTCGTTGGATGACGA	94°C, 5 min	575	54,5	Oliwa-Stasiak
			30 x [94°C, 30 s; 54,5°C, 60 s; 72°C, 60 s]			et al., (2010)
	BCRomp 1	CTGCATATCCTACCGCAGCTA	72°C, 7 min			
<i>gyrB</i>	BASH-2F	GGTAGATTAGCAGATTGCTCTTCAAAAGA	94°C, 5 min	253	63	Park et al., (2007)
<i>B. anthracis</i>	BASH-2R	ACGAGCTTTCTCAATATCAAAAATCTCCGC	30 x [94°C, 30 s; 63°C, 30 s; 72°C, 30 s]			
			72°C, 5 min			
<i>gyrB</i>	BTJH-1F	GCTTACCAGGGAAATTGGCAG		299		
<i>B. thuringiensis</i>	BTJH-R	ATCAACGTGGCGTCGG				
<i>gyrB</i>	BCJH-F	TCATGAAGAGCCTGTGTACG		475		
<i>B. cereus</i>	BCJH-1R	CGACGTGTCAATTCACGCGC				
<i>gyrB</i>	BMSH-F	TTTTAAGACTGCTCTAACACGTGTAAT		604		
<i>B. mycoides</i>	BMSH-R	TTCAATAGCAAAAATCCCCACCAAT				
<i>hbl A</i>	HBA F	AAGCAATGGAATACAATGGG	94°C, 2 min	1154	56	Guinebretiere
	HBA R	AGAATCTAAATCATGCCACTGC	35 x [94°C, 60 s; 56°C, 60 s; 72°C, 120 s]			
<i>nhe A</i>	NHA F	GTTAGGATCACAATCACCGC		755	56	et al., (2002)
	NHA R	ACGAATGTAATTTGAGTCGC	72°C, 5 min			
<i>bceT</i>	ETF	TTACATTACCAGGACGTGCTT		428	56	J. Minnaard et
	ETR	TGTTTGTGATTGTAATTCAGG				al., (2007)

Tableau IX (suite)

Gènes	Code des amorces	Séquence nucléotidique des amorces (5'-3')	Programme d'amplification	Taille amplicon (pb)	Température hybridation	Sources
<i>hbl C</i>	HBC F	GATACTCAATGTGGCAACTGC	35 x [94°C, 60 s; 58°C, 60 s; 72°C, 120 s] 72°C, 5 min	740	58	Guinebretiere et al., (2002)
	HBC R	TTGAGACTGCTCGTCTAGTTG				
<i>hbl D</i>	HBD F	ACCGGTAACACTATTTCATGC		829	58	
	HBD R	GAGTCCATATGCTTAGATGC				
<i>nhe B</i>	NHB F	TTTAGTAGTGGATCTGTACGC	94°C, 2 min	743	54	
	NHB R	-TTA ATG TTC GTT AAT CCT GC-	35 x [94°C, 60 s; 54°C, 60 s; 72°C, 120 s]			
<i>nhe C</i>	NHC F	-TGG ATT CCA AGA TGT AAC G-	72°C, 5 min	683	54	
	NHC R	-ATT ACG ACT TCT GCT TGT GC-				
<i>ces</i>	CES F1	-GGT GAC ACA TTA TCA TAT AAG GTG-	95°C, 15 min 5 x [95°C, 60 s; 53°C, 75 s; 72°C, 50 s]	1271	58	Ehling-Schulz et al., (2005b)
	CES R2	-GTA AGC GAA CCT GTC TGT AAC AAC A-	25 x [95°C, 60 s; 58°C, 75 s; 72°C, 50 s] 72°C, 5 min			
<i>cytK</i>	CKF	-ACA GAT ATC GG(G,T)CA AAA TGC-	94°C, 5 min 30 x [94°C, 15 s; 54°C, 30 s; 72°C, 30 s]	809	54	
	CKR	-TCC AAC CCA GTT(A,T)(GC) CAG TTC-	72°C, 7 min			
<i>cytK1</i>	CK1F	-CAA TTC CAG GGG CAA GTG TC-	94°C, 5 min	426	57	Guinebretiere et al., (2006)
	CK1R	-CCT CGT GCA TCT GTT TCA TGA G-	30 x [94°C, 15 s; 57°C, 30 s; 72°C, 30 s]			
<i>cytK2</i>	CK2F	-CAA TCC CTG GCG CTA GTG CA-	72°C, 7 min	585	57	
	CK2R	-GTG IAG CCT GGA CGA AGT TGG-				

#### 4- Antibiogramme

On procédera à la détermination du profil de résistance aux antibiotiques pour les souches qui hébergeront les gènes de virulence.

L'antibiogramme des souches sera réalisé sur gélose Mueller-Hinton (Bio-Rad) et selon la méthode classique de diffusion en gélose (**Bauer et al., 1966**).

##### 4-1- Préparation de l'inoculum bactérien

À partir d'une culture pure de 18 à 24 heures réalisée sur gélose TSA, une suspension équivalente au standard McFarland 0,5 sera préparée en émulsionnant 2 à 3 colonies prélevées à l'aide d'une pipette Pasteur stérile dans un tube de verre contenant 10 ml d'eau distillée stérile. Cette suspension obtenue constituera la solution mère et sera diluée au 1/1000<sup>ème</sup>. Pour la dilution, 3 tubes contenant chacune 9 ml d'eau distillée stérile seront utilisés. Après avoir aspiré et refoulé une fois, 1 ml de la solution mère sera prélevé à l'aide d'une autre pipette stérile et introduit aseptiquement dans un tube contenant 9 ml d'eau distillée stérile. Une dilution au 1/10<sup>ème</sup> est ainsi réalisée. Les mêmes opérations, effectuées en partant cette fois de la dilution au 1/10<sup>ème</sup> permettront d'obtenir une dilution au 1/100<sup>ème</sup>. Enfin en partant de la dilution au 1/100<sup>ème</sup>, une dilution finale au 1/1000<sup>ème</sup> sera obtenue.

##### 4-2- Ensemencement

La gélose MH préalablement coulée en boîte de Pétri (120 mm de diamètre) sera séchée 30 minutes à 37°C en les gardant entrouvertes pour faciliter l'évaporation complète de toute trace d'eau. L'ensemencement sera effectué par inondation avec l'inoculum dilué au 1/1000<sup>ème</sup>. L'inoculum sera déversé de façon à recouvrir complètement la surface de la gélose Mueller-Hinton, préalablement coulée dans une boîte de Pétri contenant de la gélose MH ayant une épaisseur de 4 mm. Des mouvements de rotation dans les deux axes imprimés par la main seront effectués avec la boîte de Pétri pour accélérer le recouvrement. L'excès de l'inoculum sera aspiré à l'aide d'une pipette Pasteur stérile après inclinaison de la boîte afin d'éliminer tout résidu d'inoculum. Les boîtes inoculées seront refermées et séchées à température ambiante sur la pailleasse pendant 15 minutes.

##### 4-3- Application des disques imprégnés d'antibiotiques et incubation

Les antibiotiques (Bio-Rad) testés sont consignés dans le tableau X. Les disques imprégnés d'antibiotique seront posés à l'aide d'une pince fine flambée pour sa stérilisation. Les disques seront appliqués à plat sans glissement en appuyant légèrement sur la surface de la gélose. Une distance minimale de 15 mm sépare un disque périphérique au bord de la boîte et deux disques sont éloignés au minimum de 30 mm de sorte que les zones d'inhibition ne se chevauchent pas. Les boîtes seront laissées à température ambiante pendant 30 minutes pour la pré-diffusion puis incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures, couvercle renversé afin d'éviter que l'eau de condensation ne tombe dans la boîte pour contaminer et/ou diluer les disques imprégnés d'antibiotique.

##### 4-4- Lecture et interprétation des résultats

La lecture consistera à la vérification de la pureté de la culture et à la mesure de chaque zone d'inhibition de l'antibiotique, y compris le diamètre de l'antibiotique, au moyen d'un pied à coulisse. Cette distance (en millimètre) sera ensuite reportée aux diamètres critiques afin que ces mesures soient traduites en Sensible, Intermédiaire ou Résistante vis à vis de l'antibiotique étudié. L'interprétation des résultats s'effectuera selon le tableau de référence établi par le communiqué 2010 du comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM).

**Tableau X** : Molécules d'antibiotiques, diamètres critiques et lecture interprétative pour l'antibiogramme des bactéries du groupe *Bacillus cereus*.

Familles	Antibiotiques	Charge du disque (µg)	Diamètres critiques	
			S	R
Pénicillines	Ampicilline	10	≥ 21	< 16
	Pénicilline	10 U	≥ 29	< 18
Céphalosporines	Céfépime	30	≥ 21	< 19
Phénicoles	Chloramphénicol	30	≥ 23	< 19
Fluoroquinolones	Ciprofloxacine	5	≥ 25	< 22
Lincosamides	Clindamycine	2	≥ 15	< 15
Macrolides	Érythromycine	15	≥ 22	< 17
Aminosides	Gentamicine	10	≥ 18	< 16
Carbapénèmes	Imipénème	10	≥ 24	< 17
Tétracyclines	Tétracycline	30	≥ 19	< 17
Sulfamides-triméthoprime	Triméthoprime-Sulfamétoazole	1,255 / 23,75	≥ 16	< 10
Glycopeptides	Vancomycine	30	≥ 17	nd

Source : CA-SFM, 2010 (<http://www.sfm.asso.fr/> consulté le 06/10/2010)

#### Souches de références utilisées

Gènes	Souches de référence
<i>16S rADN</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 20617 <sup>T</sup>
<i>motB</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 2046 <sup>T</sup>
	<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312
<i>ces</i>	
<i>hblA</i>	<i>Bacillus cereus</i> DSM 31 <sup>T</sup>
<i>hblC</i>	
<i>hblD</i>	
<i>nheA</i>	
<i>nheB</i>	
<i>nheC</i>	
<i>bceT</i>	
<i>cytK</i>	
<i>cytK-2</i>	
<i>cytK-1</i>	
<i>gyrB</i>	
	<i>Bacillus anthracis</i> ATCC 14578
	<i>Bacillus thuringiensis</i> DSM 2046 <sup>T</sup>
	<i>Bacillus cereus</i> DSM 4312

#### Références bibliographiques

1- Bassa, A., Dadié, A., Guessennd, N., Gbonon, V., Dako, E., Djè, M. et Dosso, M. (2010) Virulence factors and resistance profile of *Shigella* isolated during infectious diarrhea in Abidjan, Côte D'Ivoire. *J. Appl. Sci. Res.*, 6(6): 594-599.

- 
- 2- **Bauer, A.W., Kirby, WMM., Sherris, J.C., Turck, M. (1966)** Antibiotic susceptibility testing by standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.*, **45**: 493-496.
- 3- **Cavallo, J.D., Chardon, H., Chidiac, C., Courvalin, P., Dabernat, H., Drugeon, H., Dubreuil, L., Guery, B., Jarlier, V., Jehl, F., Lambert, T., Leclercq, R., Nicolas-Chanoine, M.H., Plesiat, P., Quentin, C., Rouveix B., Soussy, C. J., Varon, P. et Weber, P. (2010)** Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. 50 pages. <http://www.sfm.asso.fr/> consulté le 06/10/2010
- 4- **Cohen, N., Karib H., Ait Saïd, J., Lemee, L., Guenole, A. et Quilici, M. L. (2007)** Prévalence des vibrions potentiellement pathogènes dans les produits de la pêche commercialisés à Casablanca (Maroc). *Revue de Médecine Vétérinaire*, **158**, 11,562-568.
- 5- **Power, EM. (1995)** Efficacy of Ryu Nonstaining KOH Technique for Rapidly Determining Gram Reactions of Food-Borne and Waterborne Bacteria and Yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(10): 3756-3758.
- 6- **Ehling-Schulz, M., Vukov, N., Schulz, A., Shaheen, R., Andersson, M., Märtilbauer, E. et Scherer, S. (2005b)** Identification and Partial Characterization of the Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Responsible for Cereulide Production in Emetic *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**(1): 105–113
- 7- **Guinebretiere, MH., Broussolle, V. et Nguyen-The, C. (2002)** Enterotoxigenic Profiles of Food-Poisoning and Food-Borne *Bacillus cereus* Strains. *J. Clin. Microbiol.* **40** (8):3053–3056.
- 8- **Guinebretiere, MH. et Nguyen-The, C. (2003)** Sources of *Bacillus cereus* contamination in a pasteurized zucchini purée processing line, differentiated by two PCR-based methods. *FEMS Microbiol. Ecology* **43**: 207-215.
- 9- **Guinebretiere, MH., Fagerlund, A., Granum, PE. et Nguyen-The, C. (2006)** Rapid discrimination of cytK-1 and cytK-2 genes in *Bacillus cereus* strains by a novel duplex PCR system. *FEMS Microbiol. Lett.* **259**:74–80
- 10- **Schwenninger, SM., von Ah, U., Niederer, B., Teuber, M., et Meile L. (2005)** Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. *J. Food Prot.* **68** (1): 111-119.
- 11- **Minnaard, J., Delfederico, L., Vasseur, V., Hollmann, A., Rolny, I., Semorile L. et Perez P.F. (2007)** Virulence of *Bacillus cereus*: A multivariate analysis. *Inter. J. Food Microbiol.* **116**: 197-206.
- 12- **Kastner, S. (2008)** The inoculum of cassava product *attiéké*: Microbiological diversity, impact on product quality and safety, and development of a controlled fermentation process. Degree of Doctor of Sciences. Swiss Federal Institute of Technology Zürich. *Diss. ETH N° 18099*: p 35; 168 pages.
- 13- **Park, S-H., Kim, H-J., Kim, J-H., Kim, T-W. et Kim, H-Y. (2007)** Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR. *J. Microbiol. Biotechnol.* **17** (7), 1177–1182
- 14- **Oliwa-Stasiak, K., Molnar, C.I., Arshak, K., Bartoszcze, M. et Adley, C.C. (2010)** Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species. *J. Appl. Microbiol.* **108**: 266–273
- 16- **Zhou, G., Liu, H., He, J., Yuan, Y. et Yuan, Z. (2008)** The occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycoides* in Chinese pasteurized full fat milk. *Inter. J. Food Microbiol.* **121**: 195–200.

**Annexe 8:** Fiche d'enquête consommateurs de lait à Abidjan

Département Environnement et Santé (DESA) <b>Domaine de recherche : Analyse des risques</b> Centre Suisse de Recherches Scientifiques (CSRS) en Côte d'Ivoire 01 B.P 1303 ABIDJAN 01 Côte d'Ivoire Tél : 00 225 23 47 28 15/90 / Fax : 00 225 23 45 12 11 <a href="http://www.csrs.ch">http://www.csrs.ch</a>
--

**Fiche d'enquête sur l'utilisation, le traitement et la consommation du lait****cru**

Enquêteur : \_\_\_\_\_ Superviseur : \_\_\_\_\_

Date : \_\_\_\_\_ Numéro du questionnaire : \_\_\_\_\_

**I/ Généralités**

1/ Nom et Prénoms : \_\_\_\_\_

2/ Sexe: .....1 = H 2 = F Age: \_\_\_\_\_

3/ Profession : \_\_\_\_\_ Quartier : .....

4/ Situation matrimoniale : \...../

(1) Célibataire (2) Marié

Si marié, nombre de personne dans le ménage: \...../

**Composition du ménage**

(1) - moins de 15 ans \...../

(2) -15 à 18 ans \...../

(3) – plus de 18 ans \...../

5/ Ethnie : \...../

6/ Religion : \...../

(1) Chrétien (2) Musulman (3) Autres (à préciser) \...../

7/ Niveau d'instruction: \..... /

(1) Non instruit (2) Primaire (3) Secondaire (4) Supérieur (5) École coranique

**II/ Utilité du lait**

8/ Que faites-vous avec le lait que vous achetez ?

(1) Sacrifices  (2) Consommation  (3) Transformation  (4) Autres à préciser.....

9/ Si le lait est utilisé pour les sacrifices, que faites-vous du lait après les sacrifices ?

(1) Rejeté  (2) Consommé  (3) Autres à préciser .....

10/ Si le lait est consommé après les sacrifices, quels sont ceux qui le consomment ?

(1) Enfants  (2) Toute la famille  (3) Autres à préciser .....**III-/ Transformation du lait**

11/ Quel est le produit final que vous obtenez après la transformation ?

(1) Lait caillé  (2) Beurre  (3) Fromage  (4) Autres à préciser .....

12/ Que faites-vous avec les produits dérivés de la transformation du lait ?

(1) Consommés par la famille  (2) Vendus **IV/ Mode de consommation du lait (Traitement et consommation)**

13/ Comment consommez-vous le lait ?

(1) Directement sans chauffer  (6) Réfrigérer et consommer immédiatement (2) Réfrigérer et consommer plus tard  (7) Chauffer et consommer après refroidissement(3) Chauffer et consommer plus tard  (8) Bouillir et consommer après refroidissement(4) Bouillir et consommer plus tard  (9) Mélanger avec d'autres aliments

- (5) Bouillir puis conserver au réfrigérateur et consommer plus tard
- (10) Autres à préciser.....
- 14/ Qui sont ceux qui consomment le lait que vous achetez chez vous à la maison ?
- (1) Enfants  (2) Jeunes  (3) Vieillards  (4) Toute la famille
- 15 /Avez-vous un réfrigérateur ? (1) Oui (2) Non
- 15-1/ Si oui, pendant combien de temps conservez-vous le lait au réfrigérateur avant de consommer ?
- 15-1-1/ S'il n'est pas bouilli ? (1)2 jours  (2)3 jours  (3) Autres à préciser.....
- 15-2-2/ S'il est bouilli ? (1)2 jours  (2)3 jours  (3) Autres à préciser....
- 15-2/ Si non, pendant combien de temps conservez-vous le lait à la température ambiante ?  
.....
- 16/ Si le lait est bouilli, pendant combien de temps le faites-vous bouillir ?
- (1) 5 min  (2) 10 min  (3) 15 min
- (4) Jusqu' à ébullition  (5) Autres à préciser .....
- V/ Pathologies liées à la consommation du lait**
- V-1/ Quantité de lait acheté**
- 17/ Combien de fois achetez-vous le lait par semaine ?
- (1) 1 fois  (2) 2 fois  (3) 3 fois  (4) Autres à préciser .....
- 18/ Quelle quantité de lait achetez-vous par jour ?
- (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser .....
- 19/ Quelle quantité de lait consommée-vous par jour ?
- 19-1 vous (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  A s à préciser .....
- 19-2 Votre famille (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser .....
- 20/ Avez-vous déjà eu un malaise (une infection) après la consommation de lait ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21/ Si Oui, quels ont été les symptômes ?
- (1) Fièvre  (2) Vomissements  (3) Diarrhées  (4) Autres à préciser .....
- 22/ Quel a été le temps de survenu des troubles (symptômes) après l'ingestion du lait ?
- (1) 6 Heures  (2) 12 Heures  (3) 1 Jour
- (4) 2 jours  (5) 3 jours  (6) Autre à préciser : .....
- 23-2/ Intensité de la maladie. Choisir dans une échelle de 1 à 10  
/1 /2/3/4/5/6/7/8/9/10
- (1-3) : moins grave  (4-8) : moyennement grave
- (9-10) : très grave hospitalisation
- 23-3 /Avez-vous subi un traitement ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21-3-1/ Si oui lequel ? Durée .....
- 21-4/ Ce lait a-t-il subi un traitement avant sa consommation ?
- (1) Oui  (2) Non
- 21-5 / Si oui le quel ?
- (1) Chauffé  (2) bouilli  (3) fermenté
- 21-6/ Quelle quantité avez-vous bu ?
- (1) 0,25 L  (1) 0,5 L  (2) 1 L  (3) 1,5 L  Autres à préciser .....
- 21-7 / Où avez-vous achetez ce lait ? .....
- 21-8 / Chez qui ? .....
- 21-9/ Comment ce lait était –il conditionné ?
- (1) Sachet  (2) bouteille plastiques
- (3) petits pots  (4) Autres à préciser.....

**Annexe 9:** Fiche d'enquête sur la consommation d'*attiéké* à Abidjan

Département Environnement et Santé (DESA) <b>Domaine de recherche : Analyse des risques</b> Centre Suisse de Recherches Scientifiques (CSRS) en Côte d'Ivoire 01 B.P 1303 ABIDJAN 01 Côte d'Ivoire Tél : 00 225 23 47 28 15/90 / Fax : 00 225 23 45 12 11 <a href="http://www.csrs.ch">http://www.csrs.ch</a>
--

Enquêteur : \_\_\_\_\_ Date : \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_ Numéro du questionnaire : \_\_\_\_\_

**I/ Généralités**

1/ Nom et Prénoms : \_\_\_\_\_

2/ Sexe: .....1 = H 2 = F Age: \_\_\_\_\_

3/ Profession : ..... Quartier : .....

4/ Situation matrimoniale : \...../

(1) Célibataire (2) Marié

5/ Nombre de personnes dans le ménage: \...../

6/ Ethnie : \...../ Nationalité : \...../

**II/ Consommation de l'*attiéké***

7/ Connaissez-vous l'*attiéké* ? (0) non  (1) oui

8/ Consommez-vous l'*attiéké* ? (0) non  (1) oui

9/ Qui consomme l'*attiéké* chez-vous ?

(1) Jeunes  (2) Personnes âgées  (3) Enfants  (4) Femmes enceintes

10/ A quel moment de la journée consommez-vous l'*attiéké* ?

(1) Petit déjeuner  (2) Déjeuner  (3) Dîner  (4) Autres à préciser .....

11/ Combien de fois consommez-vous l'*attiéké* par :

10-1/ Jour

(1) 1 fois  (2) 2 fois  (3) 3 fois  (4) Autres à préciser .....

10-2/ Semaine

(1) 1 fois  (2) 2 fois  (3) 3 fois  (4) Autres à préciser .....

12/ Quelle quantité d'*attiéké* consommez-vous par consommation (de préférence exprimer en f. cfa)

(1) 100 F  (2) 150 F  (3) 200 F  (4) Autre à préciser : ...

13/ Avec quoi consommez-vous l'*attiéké* ?

(1) Poissons frit  (2) Poisson fumé  (3) Poulet braisé  (4) Soupe

(5) Autre s à préciser : .....

**III/ Variétés d'*attiéké* privilégié**

14/ Quelles variétés d'*attiéké* trouvez-vous sur le marché ?

(1) Agbodjama  (2) Ebrié  (3) Adjoukrou  (4) Alladjan  (5) *attiéké*

(6) Autres types à préciser : .....

15/ Quelle variété d'*attiéké* consommez-vous ou privilégiez-vous ? \...../ (noter une seule variété)

(1) Agbodjama  (2) Ebrié  (3) Adjoukrou  (4) Alladjan  (5) *attiéké*

**IV/ Durée de conservation et Mode de consommation de l'*attiéké***16/ Où consommez-vous l'*attiéké* ?

- (1) A domicile  (2) Chez un (des) ami(s)  (3) Au maquis  (4) Autre  
à préciser : .....

16/ Consommez-vous le même jour l'*attiéké* que vous achetez ? \...../

- (0) Non (1) Oui

16-1/ Si Non, pendant combien de temps le conservez-vous?

- (1) 1 jour  (2) 2 jours  (3) 3 jours  (4) Autres à préciser.....

16-2/ Où conservez-vous l'*attiéké* ? \...../

- (1) A l'air libre  (2) Au réfrigérateur  (3) Au congélateur

17/ L'*attiéké* est-il conservé en l'état ou avec une protection supplémentaire ? \...../

- (1) En l'état (aller à la question 18) (2) Avec une protection supplémentaire (Répondre à la question 17-1)

17-1/ Quel est l'emballage de la protection supplémentaire ? (Si l'enquêteur choisi 2 à la question 17)

- (1) Feuille *attiéké*  (2) Sachet plastique  (3) Autre à préciser : .....

18/ Comment traitez-vous l'*attiéké* conservé avant consommation ? \...../

- (1) Réchauffé à la vapeur d'eau (2) Réchauffé sans vapeur d'eau (3) Autre à préciser : .....

**V/ Pathologies liées à la consommation de l'*attiéké***19/ Avez-vous dérangé un malaise (une infection, trouble) après la consommation de l'*attiéké* ? (0) Non (1) Oui

(NB : Si l'enquêteur répond non à cette question, ne plus continuer)

20/ Si Oui, quels ont été les symptômes ?

- (1) Fièvre  (2) Vomissements  (3) Diarrhées  (4) Nausée  (5) Autres à préciser : .....

21/ Quel a été le temps de survenu des troubles (symptômes) après l'ingestion d'*attiéké* ?

- (1) 6 Heures  (2) 12 Heures  (3) 1 Jour   
(4) 2 jours  (5) 3 jours  (6) Autre à préciser : .....

22/ Intensité de la maladie. Choisir dans une échelle de 1 à 10. \...../

- (1) 1/2/3 : moins grave (2) 4/5/6 : moyennement grave  
(3) 7/8 : grave (4) 9/10 : très grave, hospitalisation

23/Avez-vous subi un traitement (thérapeutique)?

- (0) Non  (1) Oui

24/ Si oui lequel ? .....Durée .....

25/ Quelle quantité avez-vous consommé (f. cfa)?

- (1) 100 F  (2) 150 F  (3) 200 F  (4) Autre à préciser : .....

26/ Où avez-vous acheté cet *attiéké* ? .....27/ Avez-vous appris la manifestation des mêmes symptômes chez d'autres consommateurs d'*attiéké* de même origine ?

- (0) Non  (1) Oui

27/ Quelle est la variété d'*attiéké* que vous aviez consommée ce jour-là ?

- (1) Agbodjama  (2) Ebrié  (3) Adjoukrou  (4) Alladjan  (5) *attiéké*   
(6) Autres types à préciser : .....

28/ Après combien de jour de conservation avez-vous consommé cet *attiéké* ?

- (1) 1 jour  (2) 2 jours  (3) 3 jours  (4) Autres à préciser.....

29/ Comment avez-vous traité cet *attiéké* avant consommation ? \...../

- (1) Réchauffé à la vapeur d'eau (2) Réchauffé sans vapeur d'eau (3) Autre à préciser : .....

## RÉSUMÉ

En Côte d'Ivoire, le lait et l'*attiéké* jouent un rôle important dans la nutrition humaine, mais peuvent représenter un risque de toxi-infection pour le consommateur. L'objectif de cette étude était de contribuer à la réduction du risque de toxi-infection suite à la consommation de lait cru local et d'*attiéké* contaminés par le groupe *B. cereus*. A cet effet, les systèmes de production à la commercialisation du lait et de l'*attiéké* à Abidjan ont été étudiés. Le risque de toxi-infections lié à la consommation du lait et de l'*attiéké* a été évalué à l'aide d'un questionnaire avec respectivement 188 consommateurs de lait et 360 consommateurs d'*attiéké*. D'une part, 320 échantillons issus des fermes dont 150 échantillons de lait et d'autre part, 16 échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons d'*attiéké* en vente sur le marché, ont été collectés et analysés selon la norme EN ISO 7932 : 2004. Les isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont fait l'objet d'une identification par réaction de polymérisation en chaîne (PCR) et d'une caractérisation toxigénique et antibiotypique. Enfin, la résistance des spores du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* a été évaluée. Les résultats ont montré que le groupe *B. cereus* a été isolé dans 41,2 % de lait de vente avec une charge moyenne de  $2,9 \pm 1,0$  log (UFC/mL) et dans 25,2 % d'*attiéké* en vente avec une charge moyenne en cellules végétatives et en spores respectivement de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) et  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g). *B. thuringiensis* (41,9 %) et *B. cereus sensu stricto* (36,0 %) ont été les espèces identifiées. Les gènes de virulence majoritaires ont été *cytK-2* (80,8 %), *hblD* (72,1 %) et *nheC* (70,9 %). Les isolats ont été très résistants à la tétracycline (94,8 %), à la ciprofloxacine (94,8 %) et au chloramphénicol (94,2 %). La probabilité de consommer du lait et de l'*attiéké* contaminé par le groupe *B. cereus* a été respectivement de 21,6 % et 16,0 %. Au total, 12,6 % et 18,9 % des consommateurs ont rapporté une toxi-infection suite à la consommation respectivement de lait cru et d'*attiéké* non réchauffé et les symptômes les plus évoqués ont été la diarrhée et les douleurs abdominales. Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* à une température supérieure ou égale à 90 °C pendant au minimum 15 min a réduit la concentration en spores de *B. cereus* dans l'*attiéké*, de 4,2 à  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g) d'*attiéké* et le  $D_{90\text{ °C}}$  a été de  $8,5 \pm 1,9$  min pour des quantités d'*attiéké* variant de 150 à 450 g. La durée maximale de vente du lait à la température ambiante a été de 40 min alors que le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé à 90 °C a été de 18 h. En conclusion, le lait et l'*attiéké* vendus sur les marchés informels à Abidjan représentent un risque de toxi-infection pour le consommateur et les bactéries du groupe *B. cereus* sont l'une des causes possibles. Il est recommandé de chauffer le lait jusqu'à ébullition et de réchauffer l'*attiéké* à la vapeur d'eau pendant au moins 15 min à 90 °C avant toute consommation, si les bonnes pratiques d'hygiène ne peuvent pas garantir la sécurité de ces aliments.

**Mots clés :** Lait, *attiéké*, Groupe *Bacillus cereus*, toxi-infections, Risque, Abidjan

## ABSTRACT

In Côte d'Ivoire, although milk and *attiéké* play an important role in human nutrition, they could represent a poisoning risk to the consumer, due to poor hygiene throughout the production chain. This study aimed to contribute to the poisoning risk reduction linked to the consumption of local raw milk and *attiéké* contaminated with *B. cereus* group. For this, milk and *attiéké* production systems from farm to retail in Abidjan were studied. The risk of foodborne illness associated with the consumption of milk and *attiéké* was assessed using a questionnaire with 188 consumers of milk and 360 consumers of *attiéké*, respectively. On the one hand, 320 samples from the farms including 150 milk samples and on the other hand 16 samples of freshly prepared *attiéké* and 306 samples *attiéké* sold on the informal markets were collected and analyzed according to EN ISO 7932: 2004. The isolates were identified by polymerase chain reaction (PCR) and characterized by toxigenic and antibiotypic. In addition, the resistance of *B. cereus* group spores to hydrothermal warm up of *attiéké* was evaluated. The results showed that *B. cereus* group was found in 41.2% of milk of the samples taken from seller's pooled milk with a mean load of  $2.9 \pm 1.0$  log (CFU/mL). The prevalence of *B. cereus* group in *attiéké* samples taken from the informal markets was 25.2% and an average load of vegetative cells and spores were  $2.4 \pm 1.1$  log (CFU/g) and  $2.3 \pm 1.1$  log (CFU/g) respectively. *B. thuringiensis* (41.9%) and *B. cereus sensu stricto* (36.0%) were the isolated species. The majority virulence genes found were *cytK-2* (80.8%), *hblD* (72.1%) and *nheC* (70.9%). The isolates were highly resistant to tetracycline (94.8%), ciprofloxacin (94.8%) and chloramphenicol (94.2%). The probability of consuming milk and *attiéké* contaminated with *B. cereus* group is 21.6% and 16.0% respectively. In total 12.6% and 18.9% of consumers reported that they contracted a foodborne illness after unheated milk and *attiéké* consumption respectively and the most symptoms were diarrhea and abdominal pain. The hydrothermal warm up of *attiéké* with a temperature greater than or equal to 90°C for at least 15 minutes reduced the concentration of *B. cereus* spores from 4.2 in *attiéké* into  $1.8 \pm 1.0$  log (CFU/g) and  $D_{90\text{ °C}}$  was  $8.5 \pm 1.9$  min for the quantities of *attiéké* varying from 150 to 450 g. The maximum duration of the milk sale at ambient temperature is 40 min while, the consumption deadline of *attiéké* warmed up at 90°C was 18 hours. In conclusion, milk and *attiéké* produced and sold in informal markets in Abidjan represents a risk for consumers' health and *B. cereus* group species are one possible cause. It is recommended to heat the milk to boiling temperature and to warm up *attiéké* for at least 15 min at 90°C before consumption if clean milk and *attiéké* production cannot be assured.

**Keywords:** Milk, *Attiéké*, *Bacillus cereus* group, poisoning, Risk, Abidjan