

PROJET THÉMATIQUE :
« RÉALISATION D'UNE ÉTUDE
PERMETTANT DE FIXER UN DÉLAI
RÉALISTE ENTRE LA SAIGNÉE ET
L'ÉVISCÉRATION DANS LE CADRE
DU SUIVI DE L'ÉTUDE SUR LES
OPPORTUNITÉS DE
DÉVELOPPEMENT DE L'ABATTAGE À
LA FERME EN WALLONIE »

Rapport final de
convention

Le 30/06/2023

Contexte de l'étude

Du 15 novembre 2022 au 30 juin 2023, l'Université de Liège a été mandatée par la Région Wallonne pour la réalisation d'une étude permettant de fixer un délai réaliste entre la saignée et l'éviscération dans le cadre du suivi de l'étude sur les opportunités de développement de l'abattage à la ferme en Wallonie. Ce mandat a fait suite à une première étude menée par l'Université intitulée « Etude des opportunités de développement de l'abattage à la ferme en Wallonie », commanditée par les mêmes cabinets, soit les Ministres Tellier en charge du Bien-être animal et Borsus en charge de l'Agriculture.

Pour la présente convention, un budget de 46.000 € a été débloqué, destiné à couvrir les 6 mois d'étude initialement prévus. Un mois et demi supplémentaires ont, par la suite, été accordés en raison du temps nécessaire pour les expériences, mais sans budget supplémentaire.

Cette étude a été réalisée sous la supervision de deux promoteurs, professeurs à la Faculté de Médecine vétérinaire :

- Nicolas Korsak, Agrégé de Faculté, titulaire de la chaire d'Inspection des Denrées alimentaires au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)
- Marc Vandenneede, Chargé de cours, titulaire de la chaire d'Éthologie vétérinaire et Bien-Être des animaux au sein du Département de gestion vétérinaire des Ressources Animales de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)

Elle a été conduite par :

- Alexia Maldague (médecin vétérinaire), assistante au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)

Ont également participé à l'étude en qualité de référent.e.s :

- Georges Daube, Professeur ordinaire, titulaire de la chaire de Microbiologie des Denrées alimentaires au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)
- Antoine Clinquart, Professeur ordinaire, titulaire de la chaire de Technologie des Denrées alimentaires au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)
- Ludovic Martinelle, Attaché de recherche, directeur de la Ferme Pédagogique et Expérimentale de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)
- Coralie Lagamme, assistante au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)

L'équipe de recherche a également bénéficié de l'appui de consultant.e.s :

- Sylvie La Spina, docteure-ingénieure agronome qui a publié différents travaux suite à son expérience et ses recherches antérieures dans le cadre de missions sur les possibilités d'abattage à la ferme pour Nature et Progrès entre 2015 et 2019, et qui a participé à l'étude sur les opportunités de développement de l'abattage à la ferme en 2021-2022

- Frédéric Farnir dans le domaine statistique : Professeur ordinaire, titulaire de la chaire de Biostatistiques et bioinformatique au sein du Département de gestion vétérinaire des Ressources Animales de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)
- Bernard Taminau dans le domaine génomique : Professeur associé et assistant au sein du Département des Sciences des Denrées alimentaires de la Faculté de Médecine vétérinaire (ULiège)

En outre, l'équipe de recherche tient à remercier :

- Le personnel des abattoirs partenaires pour l'aide apportée à la réalisation des expériences *ex situ*
- Céline D'Alessandro et Patricia Simon, pour l'aide apportée à l'application du protocole en laboratoire
- Sébastien Crèveœur, Elisa Martinez et Raphaëlle Minutelli pour l'aide apportée à la formation en travaux de laboratoire
- Nadège Collienne pour son aide apportée lors des prélèvements à l'abattoir
- Pierre Vandevoorde et Benjamin Klein pour le prêt de matériel nécessaire au relevé des températures

Résumé

Depuis plusieurs années, on constate un intérêt croissant pour le bien-être animal en Europe. Les éleveurs et consommateurs sont de plus en plus nombreux à se préoccuper du stress pouvant toucher les animaux de production, notamment avant l'abattage. Dans cette optique, différents pays d'Europe s'intéressent à la possibilité de mise en place de solutions d'abattage à la ferme, notamment la Belgique. De mai 2021 à janvier 2022, l'Université de Liège a été mandatée par la Région Wallonne pour la réalisation d'une étude sur les opportunités de développement de l'abattage à la ferme en Wallonie. La mise à mort à la ferme de l'animal suivie de la prise en charge de sa dépouille par un abattoir agréé fait partie des possibilités qui ont été analysées. Certains obstacles entravant la mise en place de ce scénario en Belgique avaient alors été identifiés. Parmi ceux-ci, une exigence de l'Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire (AFSCA) qui précise que si l'animal n'est pas éviscéré sur place, seules 45 minutes peuvent s'écouler entre sa mise à mort à la ferme et son éviscération à l'abattoir. Considérant qu'en pratique, les parties prenantes (abattoirs et vétérinaires) ne souhaitent pas éviscérer les animaux à la ferme pour des questions pratiques et d'hygiène, cela ne laisse qu'un très faible intervalle de temps possible entre la mise à mort à la ferme et l'arrivée à l'abattoir agréé.

C'est en raison d'un manque de données scientifiques sur l'impact éventuel d'un allongement du délai saignée-éviscération sur les caractéristiques microbiologiques et organoleptiques des viandes, et d'une absence de délai précis défini au niveau européen, que l'AFSCA a établi un délai maximal court par principe de précaution (45 minutes). La présente étude a été commandée par la Région Wallonne dans l'objectif d'apporter des informations scientifiques préliminaires sur la qualité microbiologique des viandes issues de bovins dont la saignée et l'éviscération auraient été différées. Pour ce faire, des parois musculaires de bovins en contact avec les intestins ont été écouvillonnées aux temps T0, T1 (T0 + 45 min), T2 (T0 + 1h30), T3 (T0 + 2h15), T4 (T0 + 3h) et T5 (T0 + 3h45) par l'intermédiaire de deux protocoles distincts. Un protocole *ex situ* réalisé à l'abattoir à l'aide de flanchets et d'intestins isolés de bovins abattus, et un protocole *in situ* réalisé à la ferme expérimentale de l'ULiège en ayant laissé tous les organes en place après l'abattage. Les produits issus des prélèvements ont d'une part étéensemencés sur des milieux permettant la culture de la flore totale aérobie mésophile, des *Enterobacteriaceae* et d'*E. coli* et, d'autre part, ont été soumis à une PCR quantitative visant à évaluer le niveau de la flore totale bactérienne.

Les résultats des dénombrements ont montré qu'aucune des cinq carcasses écouvillonnées lors du protocole *in situ* ne dépassait les limites satisfaisantes en termes de critères microbiologiques imposées par l'AFSCA. Seul un demi-flanchet parmi les dix écouvillonnés lors du protocole *ex situ* a dépassé la limite d'acceptabilité, mais ces contaminations s'expliquent aisément par les nombreuses manipulations subies par les flanchets et les intestins (parfois percés) préalablement aux prélèvements. L'évolution du nombre de bactéries dénombrées avec le temps va à l'encontre de l'hypothèse d'un phénomène de translocation bactérienne depuis la lumière de l'intestin dans les quatre heures *post-mortem*. De fait, les échantillons dans les deux protocoles ont plutôt été soumis à des contaminations externes ponctuelles, plus importantes lors des premiers prélèvements, mais se stabilisant avec le temps et n'atteignant jamais un point de rupture à partir duquel on observerait une translocation bactérienne soudaine et continue. Cette observation a été également confirmée avec les résultats obtenus suite à la PCR quantitative.

Ces résultats viennent soutenir les données issues de quelques études, peu nombreuses, déjà publiées sur le sujet, et correspondent également aux résultats microbiologiques issus de viandes de bovins abattus à la ferme dans d'autres pays.

Table des matières

1) Introduction

1.1.	L'abattage à la ferme : définition et intérêt	9
1.2.	Possibilités pour la Wallonie.....	9
1.2.1.	L'abattage à la ferme avec UMA et abattoirs fixes en Belgique.....	10

2) Etat des lieux

2.1.	Mise à jour de la situation en Belgique et en Europe	13
2.2.	Résumé de la littérature et témoignages existants	15

3) Méthode

3.1.	Prélèvements sur le terrain.....	17
3.1.1.	Protocole <i>ex situ</i>	17
a)	Récupération des organes	18
3.1.2.	Protocole <i>in situ</i>	21
a)	Vaches abattues.....	21
b)	L'acte d'abattage.....	21
c)	Prélèvements et prise de températures.....	23
d)	Échantillonnage microbiologique d'air	25
3.2.	Ensemencements au laboratoire	25
3.3.	Dénombrements.....	27
3.4.	Traitement des résultats	28
3.4.1.	Comparaison aux critères microbiologiques établis par l'AFSCA	28
3.4.2.	Analyses statistiques	29
	Modèle statistique.....	29
3.5.	PCR quantitative.....	30
3.5.1.	Extraction d'ADN	30
3.5.2.	PCR en temps réel.....	31

4) Résultats

4.1.	Echantillons	33
4.1.1.	A l'abattoir B.....	33
4.1.2.	Vaches abattues à la FEPEX.....	34

4.2.	Températures.....	34
4.2.1.	Protocole <i>in situ</i>	34
a)	Température ambiante.....	34
b)	Température intra-musculaire.....	34
c)	Température intra-abdominale.....	35
4.2.2.	Protocole <i>ex situ</i>	36
a)	Température ambiante.....	36
b)	Température intra-musculaire	37
c)	Température intra-abdominale.....	37
4.3.	Dénombrements.....	38
4.3.1.	Protocole <i>in situ</i>	38
4.3.2.	Protocole <i>ex situ</i>	40
4.4.	Comparaisons aux critères microbiologiques	42
4.5.	Analyses statistiques	44
4.5.1.	Structures de corrélation	44
4.5.2.	Régressions	45
4.5.3.	Facteurs de classification.....	46
4.6.	PCR quantitative.....	48
5) Discussion		
5.1.	Les protocoles employés	51
5.2.	<i>Peut-on croire à un effet de translocation bactérienne s'amplifiant avec le temps ?</i>	51
5.3.	<i>Y a -t-il un effet de la température sur les contaminations ?</i>	52
5.4.	Limites de l'étude.....	53
6) Recommandations.....		
7) Conclusion.....		
8) Annexes.....		
9) Sources.....		

1) Introduction

1.1. L'abattage à la ferme : définition et intérêt

Au sens du Règlement (CE) n°1099/2009 sur la protection des animaux au moment de leur mise à mort¹, le terme « abattage » signifie « *la mise à mort d'animaux destinés à la consommation humaine* ». L'abattage à la ferme est donc une notion qui implique que les animaux soient mis à mort sur leur lieu de vie, sans nécessiter de transport préalable vers un abattoir. Les outils utilisés dans ce cadre peuvent ensuite prendre différentes formes suivant que tout le processus d'abattage et d'habillage se réalise à la ferme, ou seulement une partie.

L'abattage à la ferme permet de supprimer en tout ou en partie différentes sources de stress précédant l'abattage, telles qu'une partie des manipulations, le chargement/déchargement des bétailières, le transport, le mélange avec des animaux inconnus et les variations brusques de l'environnement. Ces sources de stress peuvent impacter la qualité de la viande², et entraîner de la frustration chez des éleveurs soucieux de leurs animaux, mais qui n'ont aucun contrôle sur cette étape³.

Le transport des animaux en particulier a fait dernièrement l'objet de considérations au niveau européen. La commission d'enquête du parlement mise en place en juin 2020, pour investiguer l'application pratique du Règlement (CE) n 1/2005 du Conseil du 22 décembre 2004 relatif à la protection des animaux pendant le transport et les opérations annexes⁴, a relevé de nombreux manquements et violations de ce règlement au sein des Etats-membres. Parmi leurs recommandations, les députés encouragent fortement à réduire au maximum le transport d'animaux vivants, et préconisent « *le transport de carcasses et de viande plutôt que les animaux en transit vers l'abattoir, dans la mesure du possible* ». ⁵

Avec l'évolution des mentalités en matière de bien-être animal et les modifications législatives qui l'accompagnent, un intérêt grandissant pour l'abattage à la ferme s'est rapidement développé et depuis quelques années, plusieurs pays l'envisagent concrètement. Certains comme l'Allemagne ou la Suisse le pratiquent déjà, tandis que d'autres prennent le temps d'étudier les considérations pratiques, logistiques et sanitaires avant de le mettre en place. On peut, dans ce dernier cas de figure, citer la France, le Grand-Duché du Luxembourg, les Pays-Bas et la Belgique. En Belgique, tant les gouvernements flamand et wallon ont exprimé leur intérêt pour cette pratique au travers de financements débloqués pour réaliser des études de faisabilité. La dernière en date commanditée par la Flandre s'est clôturée en mars 2023, tandis que celle de la Wallonie avait été publiée un an plus tôt.

1.2. Possibilités pour la Wallonie

Dans l'étude de faisabilité réalisée pour la Wallonie, différents scénarii avaient été analysés sur base de ce qui était légalement et techniquement réalisable au moment de l'étude. Les possibilités allaient d'une simple mise à mort (étourdissement et saignée) à l'entièreté des opérations d'abattage et d'habillage réalisées au sein du lieu d'élevage des animaux. Alors qu'à l'instar des abattages d'urgence réalisés actuellement, la première solution impliquait la collaboration des

abattoirs agréés existants pour réceptionner et prendre en charge la dépouille saignée arrivée de la ferme, la seconde impliquait le développement d'abattoirs dits mobiles (aménagés dans des camions et semi-remorques) complètement autonomes. Il était imaginé de stationner ces derniers directement à la ferme pour fournir un service à domicile, ou bien sur une « aire d'accueil » lui permettant de recevoir et de prendre en charge des dépouilles d'animaux mis à mort dans différentes fermes environnantes (scénario « mixte »).

Pour chaque cas de figure, il s'agissait d'envisager les aspects économiques, sanitaires, environnementaux, sociaux et relatifs au bien-être animal. Les coûts réels d'un service d'abattage à la ferme ont été chiffrés et les conditions de mise en place identifiées. Chaque possibilité était, à l'heure de la remise du rapport, confrontée à certains freins plus ou moins surmontables.

Des études de marché ainsi que des concertations avec des éleveurs wallons intéressés par l'abattage à la ferme ont mené à la conclusion que le développement d'abattoirs mobiles (pour ongulés domestiques) se déplaçant à chaque ferme était moins adapté à la Wallonie. De fait, le déplacement de ces abattoirs est chronophage (temps de transport et d'installation) et demande un minimum de 3 personnes déployées sur place. Pour ces raisons, un minimum d'animaux doit être abattu par ferme afin de rentabiliser l'activité sans facturer un prix d'abattage trop élevé. Or, une enquête réalisée auprès des éleveurs wallons intéressés au moment de l'étude avait révélé que la majorité de ces éleveurs présentaient des besoins d'abattage trop faibles pour justifier le déplacement d'un abattoir mobile. Hormis pour l'abattage de volailles qui peut s'avérer plus intéressant qu'en abattoir fixe, les abattoirs mobiles représentent un grand défi économique et logistique. Cela s'est illustré récemment (2022) avec la faillite du grand projet d'abattoir mobile que la société Bœuf Ethique avait lancé en 2021 en Bourgogne⁶, bien que les raisons réelles de cette faillite restent floues.

A l'inverse, la Wallonie est plutôt en faveur d'un scénario impliquant uniquement la mise à mort à la ferme en raison de son territoire relativement restreint, permettant aux éleveurs de se situer rarement à plus d'une heure d'un abattoir⁷. De plus, cette pratique s'apparente à ce qui est réalisé depuis plusieurs années avec les abattages d'urgence sur l'exploitation, illustrant la faisabilité technique. Cependant cette solution, contrairement à la précédente, ne permet pas de pallier à un important problème actuel qui est la diminution du nombre d'abattoirs, en particulier des petits abattoirs, en Belgique. Si cette pratique se mettait en place en Wallonie, il pourrait être intéressant, dans un second temps, d'envisager de la coupler avec des abattoirs mobiles situés sur une aire d'accueil temporaire en plus des abattoirs fixes déjà existants, afin d'augmenter l'offre dans les régions où l'on compte moins d'abattoirs fixes.

1.2.1. L'abattage à la ferme avec UMA¹ et abattoirs fixes en Belgique

Jusqu'à récemment, le Règlement européen (CE) n° 853/2004⁸ précisait que **seuls des animaux vivants** destinés à l'abattage pouvaient être introduits dans les abattoirs agréés (exception faite des animaux abattus d'urgence ainsi que du gibier d'élevage et sauvage).

Avec l'évolution des habitudes de consommation, dans un souci d'amélioration du bien-être des animaux et en accord avec la stratégie « De la ferme à la table »⁹ qui promeut un système alimentaire durable au travers d'une agriculture respectueuse de l'environnement et du bien-être animal¹⁰, la Commission a revu **ce règlement** en avril 2021. Après consultation du projet d'acte auprès des Etats-membres en octobre 2020, cette révision de l'annexe III a été publiée officiellement le 20/08/2021 dans le Journal officiel de l'Union européenne. Depuis lors : « *Jusqu'à trois animaux domestiques de l'espèce bovine, autres que des bisons, ou jusqu'à six animaux*

¹ Unité mobile d'abattage

domestiques de l'espèce porcine ou jusqu'à trois solipèdes domestiques peuvent être abattus à la même occasion dans l'exploitation d'origine, lorsque l'autorité compétente l'autorise ». Des discussions au niveau européen seraient actuellement en cours pour ouvrir cette pratique aux ovins également.¹¹

Le texte européen n'émet pas d'exigences strictes par rapport à l'abattage des animaux sur l'exploitation, laissant le soin aux Etats-membres d'apporter plus de précisions si nécessaire. En Belgique, l'**AFSCA** a publié officiellement fin septembre 2021 une circulaire intitulée "*Circulaire relative aux abattages d'ongulés domestiques sur les lieux d'élevage*". A l'heure actuelle, deux points majeurs constituent un frein sur la mise en place de l'abattage à la ferme avec UMA et abattoir fixe en Belgique.

Premièrement, la dépouille de l'animal abattu doit être transportée de manière hygiénique vers un abattoir à l'aide d'une *unité mobile d'abattage* (UMA) spécialement conçue à cette fin (Figure 1.1). Il s'agit là d'une remorque plus ou moins élaborée suivant les modèles développés, se limitant soit à un outil de transport, soit servant en plus d'outil de contention et de saignée de l'animal. L'Allemagne, notamment, compte plusieurs entreprises qui se sont spécialisées dans la vente de ces UMA.



Figure 1.1. Bovin transporté dans une UMA commercialisée par la société Innovative Schlachtsysteme en Allemagne
Crédit photo : SRF/Stefan Wüthrich. Source: <https://www.diegruene.ch/artikel/tierhaltung/tierkoerper-in-den-schlachthof-bringen-358811>

Le texte européen précise que l'unité mobile d'abattage doit « *faire partie d'un abattoir agréé par l'autorité compétente* ». Selon l'interprétation de l'AFSCA, cela signifie que les UMA doivent être reprises dans l'agrément d'un abattoir agréé et que son système d'autocontrôle doit couvrir le fonctionnement de l'UMA. Cette mesure décourage la majorité des abattoirs wallons à collaborer avec des éleveurs désireux d'abattre leurs animaux à la ferme. De fait, un problème provenant d'un abattage à la ferme risquerait de menacer toutes les activités de l'entreprise (ex : perte de la validation du système d'autocontrôle voire perte de l'agrément). Ces derniers, pourtant pour la plupart non opposés au principe d'abattage à la ferme, souhaiteraient un éclaircissement au niveau de l'interprétation européenne du texte, prônant davantage un fonctionnement équivalent à celui d'une activité agréée complémentaire à celle de l'abattoir mais indépendante des activités de celui-ci, à l'image des autorisations spéciales pour le transport à chaud des carcasses¹².

Un deuxième point critique concerne le temps maximum qui peut s'écouler entre saignée et éviscération. Si le règlement européen n'émet pas d'exigence particulière, outre le fait que les dépouilles doivent être réfrigérées si plus de deux heures s'écoulent entre le moment de l'abattage et l'heure d'arrivée à l'abattoir, l'AFSCA impose un délai plus contraignant. Elle précise en effet dans sa circulaire que si plus de 45 minutes risquent de s'écouler entre la saignée à la ferme et l'éviscération à l'abattoir, cette dernière doit être réalisée à la ferme. Cette possibilité a cependant été d'emblée rejetée car l'éviscération est une étape critique en ce qui concerne les risques de contamination microbiologique des carcasses¹³, et donc risquée si elle n'est pas réalisée dans d'excellentes conditions. L'éviscération (des bovins surtout) demande de l'espace et de la hauteur, le tout dans un environnement contrôlé que peuvent garantir les installations d'abattoirs, ce qui est rarement le cas pour les exploitations agricoles. De manière générale, les parties prenantes (abattoirs wallons, vétérinaires) ne sont pas à l'aise avec l'idée de réaliser l'éviscération à la ferme. Si l'éviscération à la ferme n'est pas souhaitable et que celle-ci doit se dérouler à l'abattoir, cela laisse néanmoins une marge de temps de transport autorisée très faible entre l'exploitation agricole et l'abattoir fixe. Après discussion des aspects pratiques avec différents exploitants d'abattoir, il s'est avéré qu'il faut en moyenne 5 à 10 minutes pour décharger de l'UMA la dépouille de l'animal abattu et l'intégrer à la chaîne d'abattage, et 10 à 25 minutes, à partir du moment où la dépouille est intégrée à la chaîne, avant d'atteindre l'étape d'éviscération sur la chaîne. Aux 45 minutes de délai accordées par l'AFSCA entre la saignée et l'éviscération, il faudrait donc déjà soustraire entre 15 et 35 minutes nécessaires pour la prise en charge à l'abattoir. Cela ne laisse donc qu'un très faible laps de temps possible pour le transport des animaux abattus.

A ce stade, l'AFSCA ne s'est pas montrée prête à modifier le délai initialement prévu, mais s'y est montrée ouverte à la condition que des preuves relatives à la qualité microbiologique de ces viandes soient apportées.

2) Etat des lieux

2.1. Mise à jour de la situation en Belgique et en Europe

La production de gaz dans les intestins susceptible de rendre l'éviscération hygiénique plus délicate, la contamination bactérienne et les impacts sur la qualité organoleptique des viandes constituent des craintes en cas d'éviscération différée¹⁴. A l'heure actuelle, on ignore précisément à partir de quel moment *post-mortem* ces signes de dégradation commencent à apparaître, d'autant qu'ils dépendent également de facteurs intrinsèques et extrinsèques tels que la température et l'humidité extérieure¹⁵. Ainsi, aucune exigence précise n'est émise à ce sujet dans les textes légaux. Ce manque de données a toujours généré un doute quant à l'existence ou non d'un risque à consommer des viandes dont le délai d'éviscération serait augmenté par rapport à la normale¹⁴. Cela s'est souvent avéré contraignant, notamment en cas de panne sur les chaînes d'abattage, lors desquelles les abattoirs sont parfois contraints de se voir refuser les carcasses par l'autorité sanitaire ou de devoir réaliser des analyses microbiologiques coûteuses pour s'assurer de leur conformité. Plus récemment, avec la révision du règlement (CE) n° 853/2004 autorisant l'abattage d'ongulés domestiques sur l'exploitation et causant en pratique un allongement inévitable du délai entre saignée (à la ferme) et éviscération (à l'abattoir), la question est revenue à l'ordre du jour. A l'heure actuelle, la Commission européenne préconise uniquement de réaliser l'éviscération « *sans retard indu* », laissant le soin aux Etats-membres de fixer un délai national précis s'ils le souhaitent.

Cette liberté suscite beaucoup de discussions et de doutes, si tant est qu'il est actuellement question de définir un délai précis au niveau européen afin d'uniformiser les pratiques. Cette proposition fait en effet suite à une enquête entre Etats-membres qui comptait 12 votes en faveur, 8 votes opposés et 3 votes incertains à l'intégration d'un délai maximal entre saignée et éviscération dans la réglementation européenne¹⁶. Dans l'attente de la concrétisation éventuelle de cette proposition, plusieurs pays ont déjà défini un délai national avec les moyens dont ils disposent.

D'après nos sources :

- Les autorités sanitaires françaises ne se sont pas encore prononcées et restent ouvertes aux discussions pour recevoir des témoignages et connaissances sur le sujet¹⁷, qui devraient alimenter une révision de leur réglementation nationale à l'automne 2023 ;
- La Suisse (hors UE), qui avait initialement imposé un délai de 45 minutes, a récemment réenvisagé cette condition pour l'augmenter à 90 minutes dans sa révision de l'Ordonnance du Département fédéral de l'intérieur concernant l'hygiène lors de l'abattage d'animaux¹⁸ ;
- En Allemagne, les autorités vétérinaires ne sont pas centralisées de sorte que chaque Land (16 au total) fixe ses exigences propres. Ceux-ci ne définissent jamais de délai précis entre saignée et étourdissement, mais établissent plutôt un temps de transport maximal entre exploitation et abattoir, qui varie entre une et deux heures¹⁹ en fonction des régions, facilitant ainsi la faisabilité de l'abattage à la ferme dans ce pays ;

¹⁴La « normale » représentant alors le temps moyen, sur la chaîne d'abattage, qui sépare la saignée de l'éviscération, soit approximativement 10-25 minutes.

- En Autriche, le ministère fédéral des affaires sociales, de la santé, des soins et de la protection des consommateurs a apporté des précisions nationales quant à l'interprétation du règlement européen, mais pas concernant le délai saignée-éviscération²⁰.

En comparaison, la situation en Belgique est beaucoup plus compliquée en raison du délai particulièrement court imposé par l'AFSCA. Par mesure de précaution, celui-ci a été fixé à 45 minutes entre saignée et éviscération, bien qu'on ignore sur quelles bases ce délai précis a été déterminé. D'après la FEBEV^{III}, l'AFSCA se serait basée sur des recommandations obsolètes qui avaient à l'époque été émises dans le guide de la fédération à l'attention des abattoirs. Depuis lors, le comité scientifique de l'AFSCA a été sollicité pour travailler sur diverses questions, dont celle de la sécurité sanitaire de la viande en cas d'éviscération retardée. Dans ses conclusions, on peut lire : « *Il n'existe dans la littérature aucune preuve que l'éviscération tardive présente un risque pour la qualité microbienne de la carcasse (...). Sur base de la littérature, aucun délai maximal ne peut être proposé entre la mise à mort des animaux et leur éviscération.* »²¹

Si le délai de 45 minutes n'est, à l'heure actuelle, renseigné que dans la circulaire relative aux abattages d'ongulés domestiques sur les lieux d'élevage, il est question de l'intégrer dans la prochaine révision générale de la « législation hygiène » prévue par l'AFSCA.

La présente étude tend à apporter des preuves récentes qu'un délai d'éviscération d'au moins 2 h post-saignée ne provoque pas de translocation bactérienne significative depuis le tube digestif vers les parois musculaires, avant que cet arrêté royal ne soit modifié, en se concentrant sur les aspects microbiologiques plus qu'organoleptiques. La Belgique possédant un territoire relativement restreint en comparaison d'autres pays d'Europe, un délai de 2 h permettrait facilement aux exploitations se situant jusqu'à 1h30 de transport vers un abattoir de bénéficier de l'abattage à la ferme. Dans l'enquête réalisée par l'équipe de recherche lors de la première phase de l'étude, les éleveurs intéressés par l'abattage à la ferme se situaient à une distance moyenne de 49 km de leur abattoir, distance pouvant facilement être parcourue dans le délai en question.

L'hypothèse préliminaire selon laquelle un délai saignée-éviscération d'au moins deux heures ne constitue pas de risque sanitaire se base sur deux types de sources (développées dans le point 2.2) :

- La première provient de la littérature scientifique. Une équipe de recherche en particulier s'est beaucoup intéressée à la question dans les années 70 (voir point 2.2). Peu d'études semblables ont été poursuivies depuis lors, mais davantage d'informations sont disponibles concernant la pratique de la chasse. En effet, il n'est pas rare que l'éviscération du gibier sur le terrain se réalise plus d'une heure après le tir, et plusieurs études se sont penchées sur les caractéristiques de ces viandes.
- La deuxième provient de témoignages de pays voisins (Allemagne principalement, pionnière de l'abattage à la ferme) récoltés lors de la première phase de l'étude de faisabilité de l'abattage à la ferme en Wallonie. Plusieurs expériences d'abattage à la ferme au sein de pays frontaliers ont fait l'objet de suivis microbiologiques intéressants qui n'ont, malheureusement, pas donné lieu à des publications scientifiques dans des journaux à comité de lecture. Ces données sont néanmoins disponibles publiquement et des discussions avec les différents auteurs ont permis d'apporter des précisions sur certains points (voir point 2.2).

^{III} Fédération Belge de la Viande

Il aurait pu être envisagé de se renseigner sur les résultats d'analyses microbiologiques de carcasses de bovins ayant été abattus d'urgence en Belgique. En effet, les exigences pour les animaux abattus dans ce cadre visent à ce qu'ils soient transportés à l'abattoir après leur mise à mort « *sans délai inutile* » et que les viandes soient soumises à des analyses de laboratoire. En pratique, il nous a été renseigné que les animaux abattus d'urgence n'étaient jamais ou très rarement éviscérés sur place, et que leur délai d'éviscération pouvait facilement atteindre deux heures. Ces cas précis et pas si rares (qui concernaient 2.428 bovins en Belgique en 2019²²) soutiennent certes la conclusion selon laquelle il est sûr de consommer ces viandes, mais pas la preuve nécessaire de l'absence de translocation bactérienne vers le muscle. En effet, les examens bactériologiques réalisés dans ce cas sont dits « en profondeur », c'est-à-dire qu'ils recherchent davantage la manifestation d'une maladie systémique qui renseignerait de l'état sanitaire de l'animal abattu, plutôt que des preuves d'une contamination musculaire superficielle.

2.2. Résumé de la littérature et témoignages existants

La translocation bactérienne est un phénomène lors duquel des bactéries vivantes ou leurs produits traversent la barrière intestinale²³. *In vivo*, ces dernières peuvent emprunter deux voies différentes pour rejoindre d'autres sites. Les bactéries, soit via les entérocytes (voie transcellulaire) soit via les jonctions serrées (voie paracellulaire), empruntent le système lymphatique ou plus rarement veineux pour rejoindre la circulation systémique à partir des ganglions lymphatiques mésentériques ou de la veine porte²³. En temps normal, des mécanismes de défense mécanique (épithélium muqueux), écologique (microbiote) et immunitaire (IgA et cellules immunitaires) empêchent des pathogènes de quitter le tractus gastro-intestinal, et ce même plusieurs heures après la mort²⁴. Ce phénomène de translocation a donc surtout été décrit dans des cas pathologiques impactant ces systèmes de défense, bien qu'il semble qu'il se produise aussi avec des bactéries commensales chez des animaux en bonne santé, sans conséquence délétère. Dans l'étude menée par Dahlinger et al.²⁵, des bactéries intestinales ont été retrouvées dans les ganglions lymphatiques mésentériques de plus de 50 % des chiennes saines ponctionnées, les chercheurs apparentant cela à un événement physiologique normal illustrant la tolérance de l'organisme envers sa flore commensale. Cependant, le fait que les bactéries composant cette flore étaient exemptes de la circulation sanguine portale ou périphérique de ces chiennes prouve que cette propagation se limite strictement aux ganglions lymphatiques.

Avec une éviscération retardée, il est à craindre que des microlésions de la paroi intestinale causées par le gonflement *post-mortem* ou l'autolyse débutante ne soient responsables du relargage de bactéries aux tissus environnants. Selon Gill et al²⁶, seule une rupture du système digestif permettrait la libération d'entérobactéries vers la cavité abdominale, et les phénomènes responsables de sa dégradation (protéolyse enzymatique, gonflement) ne mèneraient pas à sa rupture avant 2 jours *post-mortem*, chez des animaux sains. De fait, l'équipe de chercheurs n'a constaté aucune croissance bactérienne (*E. coli*, *C. perfringens*, *B. cereus* et *P. fluorescens*) sur les muscles des membres postérieurs et du dos ainsi que dans les ganglions inguinaux de 30 carcasses d'ovins non éviscérées pendant 24 h à 20 °C.

Ces observations ont été confirmées plus récemment, lorsqu'une étude réalisée en Afrique du Sud sur 16 carcasses a révélé que le passage d'entérobactéries à travers la barrière intestinale est absent à négligeable chez les gnous noirs exposés à des retards d'éviscération allant jusqu'à 5 heures (à des températures situées entre 10 et 18 °C).

En comparaison, les articles en rapport avec la pratique de la chasse tendent vers les mêmes conclusions. Par exemple, une étude de 2016 a démontré qu'il n'y avait pas davantage de contamination microbienne sur une carcasse de gros gibier sauvage éviscérée endéans les 30 minutes et les 4 heures *post-mortem*²⁷. Il convient néanmoins de souligner que dans les études relatives au gibier sauvage, les critères microbiologiques sont souvent pris en considération en complément d'autres analyses (par exemple organoleptiques), au risque d'être moins complètes. De plus, les muscles écouvillonnés sont généralement situés à une certaine distance du tractus digestif (idéalement il devrait s'agir des muscles abdominaux).

Certaines expériences d'abattage à la ferme sur le terrain semblent aussi confirmer ces théories. Entre 2012 et 2015, l'Office vétérinaire du Rottal-Inn en Allemagne a effectué des analyses microbiologiques (bactéries aérobies mésophiles, entérobactéries, clostridies) sur 119 carcasses de bovins abattus à la ferme dont le délai entre saignée et éviscération avait excédé une heure (jusque 2 heures), sans réfrigération. Tous les résultats se sont avérés négatifs²⁸. Pour l'anecdote, le chef de groupe du bureau d'hygiène des viandes du Rottal-Inn nous avait également rapporté que deux accidents avaient eu lieu à l'abattoir VION de Pfarrkirchen en 2015, à la suite desquels 62 carcasses ont été éviscérées après plus de 2 heures (dont une fois après 3,5 heures). Là aussi, les examens bactériologiques qui avaient été initiés n'ont abouti à aucun résultat critique²⁹.

Parmi d'autres expériences européennes d'abattage à la ferme, les carcasses de 46 bovins abattus dans les unités mobiles d'abattage de Dokkum (Pays-Bas), ainsi que les carcasses de 66 porcs plein air abattus dans une ferme en Bavière ont été soumis à des examens microbiologiques. Ces résultats ont révélé que toutes les carcasses de bovins testées ne présentaient pas un taux de contamination supérieur aux carcasses de bovins abattus conventionnellement³⁰, et que 64 des 66 carcasses de porcs se situaient toutes dans les limites acceptables, et ne différaient pas entre un délai d'éviscération de moins d'une heure, ou de plus d'une heure et demie (jusque 2h30)³¹. Paradoxalement, la valeur médiane la plus élevée pour le nombre d'entérobactéries a même été obtenue pour une durée d'éviscération inférieure à une heure.

Cependant, il convient de noter que les deux remorques utilisées dans le cadre de ces expériences étaient munies d'un système de réfrigération.

Après discussion avec les auteurs de ces expériences, il s'est avéré que ce système était souvent activé avec les UMA de Dokkum car les trajets excédaient la plupart du temps deux heures. Dans le cas des porcs, le système de réfrigération n'était pas activé étant donné que les abattages se sont tous déroulés en automne et en hiver.

3) Méthode

L'équipe de recherche a tenté d'apporter des preuves préliminaires qu'une viande issue d'un bovin abattu à la ferme et dont le délai d'éviscération excédait 45 minutes pour atteindre jusque 4 heures, pouvait toujours être déclarée apte à la consommation humaine. Elle a donc, au travers de l'élaboration de protocoles nouveaux, cherché à répondre aux questions suivantes :

1. Constate-t-on une contamination bactérienne qui pourrait être attribuée à un phénomène de translocation sur les muscles de carcasses de bovins saignés mais non éviscérés ?
2. Si oui, quelle est la cinétique de contamination de ces muscles et à quel moment constate-t-on un « point de rupture » ?

3.1. Prélèvements sur le terrain

La convention initiale prévoyait uniquement le protocole *ex situ* décrit ci-dessous, en collaboration avec un abattoir. Cependant, la réunion du comité d'accompagnement du 05/01/2023 a mené à la conclusion que, pour renforcer la fiabilité des résultats et leur acceptation par l'AFSCA, il était judicieux de les compléter par des résultats issus d'un protocole se rapprochant davantage des conditions réelles d'abattage à la ferme, décrites ci-dessous en tant que protocole *in situ*.

3.1.1. Protocole *ex situ*

Ce protocole est qualifié d'*ex situ* en raison du fait que les structures ont été écouvillonnées après avoir été séparées de la carcasse, et ne sont pas restées à leur emplacement physiologique. Cette méthode consistait à prélever sur la chaîne d'abattage d'une part un tractus digestif et d'autre part un flanchet de bovin sain, avant de les mettre en contact étroit et de les disposer dans des bacs laissés à température ambiante. Les flanchets étaient dirigés avec la face péritonéale vers le tractus digestif en vue de reconstituer l'environnement digestif entouré de la paroi abdominale. Ils n'étaient séparés que pour réaliser les prélèvements par écouvillonnage à différents temps stratégiques.

Ce protocole prévoyait de recruter un abattoir désireux de travailler avec l'équipe de recherche et disposé à fournir des flanchets et intestins de bovins, ainsi qu'un lieu de travail pour permettre de réaliser les différents prélèvements. Ainsi, des bovins sains seraient sélectionnés pour l'expérience avec l'aide de l'abattoir et différents jours de prélèvement seraient déterminés. A l'issue des examens *ante* et *post-mortem*, les bovins auront été déclarés aptes à la consommation humaine et leurs parties pourraient être utilisées pour l'expérience.

En premier lieu, il a été question de travailler avec un certain abattoir (nommé ci-après « abattoir A »). Des premiers prélèvements y ont été réalisés début décembre 2022 dans le but de tester et valider le protocole établi. Ce premier test a par la suite amené l'équipe de recherche à contacter

un autre abattoir partenaire en raison de contraintes techniques et financières. En effet, les flanchets y étaient facturés à un prix élevé (approximativement 500 euros) et ne pouvaient être fournis qu'après refroidissement complet (c'est-à-dire à 1 °C au départ), car l'atelier de découpe craignait que la découpe à chaud n'endommage la carcasse. De plus, la distance physique entre l'atelier de découpe et l'abattoir où se réalisaient les prélèvements rendait compliqué le transfert hygiénique du flanchet jusqu'au lieu de prélèvement.

Un autre abattoir (ci-après nommé « abattoir B ») a été contacté en second lieu et il a été décidé d'y réaliser tous les prélèvements nécessaires. Un objectif initial de 5 bovins femelles et 5 mâles a été fixé, avant analyse statistique des résultats. La première expérience à l'abattoir A a permis d'identifier les points d'attention et d'adapter le protocole et le matériel nécessaire dans le but de diminuer au maximum les contaminations initiales des flanchets comme de l'intestin. Des adaptations ont encore été apportées au fil des prélèvements à l'abattoir B, en fonction de ce qu'il était possible d'y faire tout en évitant de perturber les activités de l'abattoir.

Les informations précises concernant les journées-type de prélèvement, comprenant la récolte des échantillons pour chaque journée d'abattage à l'abattoir B, sont décrites ci-dessous.

a) Récupération des organes

- 1) Dans la zone propre de l'abattoir, un flanchet issu d'un bovin a d'abord été prélevé de la carcasse par des ouvriers de l'abattoir après avoir subi un pré-refroidissement (*shock chilling*) d'approximativement une heure. En effet, l'abattoir a expliqué ne pouvoir légalement travailler des carcasses à chaud, c'est-à-dire au-dessus de 16 °C. Le flanchet récupéré a ensuite été découpé en deux parties égales afin de permettre de réaliser en parallèle l'expérience sur deux tubes digestifs différents. Ces demi-flanchets ont alors été déposés par des ouvriers de l'abattoir dans un bac en plastique préalablement nettoyé.
- 2) Peu après, deux intestins de bovins différents ont été prélevés. Lors du premier jour de prélèvement, le tube digestif a été collecté depuis le tapis roulant par lequel les viscères sont acheminés vers la boyauderie mais par après, le protocole a été ajusté. Dès le deuxième jour de prélèvement, les intestins ont été prélevés directement sur la chaîne d'abattage et transférés aussitôt dans un sac poubelle noir propre, lui-même disposé dans une poubelle à déchets de classe B2 propre. Le tube digestif sélectionné avait préalablement été ligaturé de part et d'autre à l'aide de clips en plastique placés aux extrémités de celui-ci, puis coupé de sorte que l'intestin était isolé du reste du système digestif. La première phase test à l'abattoir A a permis de tirer la conclusion que seule l'utilisation des intestins était pertinente pour l'expérience, et non celle des préestomacs pour les raisons suivantes :
 - Pour des raisons anatomiques, le muscle, s'il est placé sur le rumen et non en-dessous, se retrouve en contact avec la phase gazeuse du rumen, qui n'est pas la phase pertinente en termes de population bactérienne et de migration de bactéries au travers de la paroi.
 - La paroi des pré-estomacs, et en particulier du rumen, possède une épaisseur bien plus importante que celle de l'intestin, ce qui constitue certainement un frein physique supplémentaire à la migration des bactéries.
- 3) Une fois les deux demi-flanchets et intestins récoltés, ceux-ci étaient acheminés dans un local attenant à des zones de récupération et tri des déchets d'abattoir avec accès sur l'extérieur. Des sondes de température reliées à un datalogger ont été placées dans l'épaisseur du muscle

d'un demi-flanchet, entre les anses intestinales sur lesquelles il allait être posé, et à température ambiante. Les demi-flanchets ont alors été déposés sur les intestins, avant de refermer les sacs sur le tout entre deux prélèvements. La taille des sacs utilisés a été adaptée au fil des journées de prélèvements afin qu'une fois fermés, ceux-ci recouvrent la totalité des échantillons.

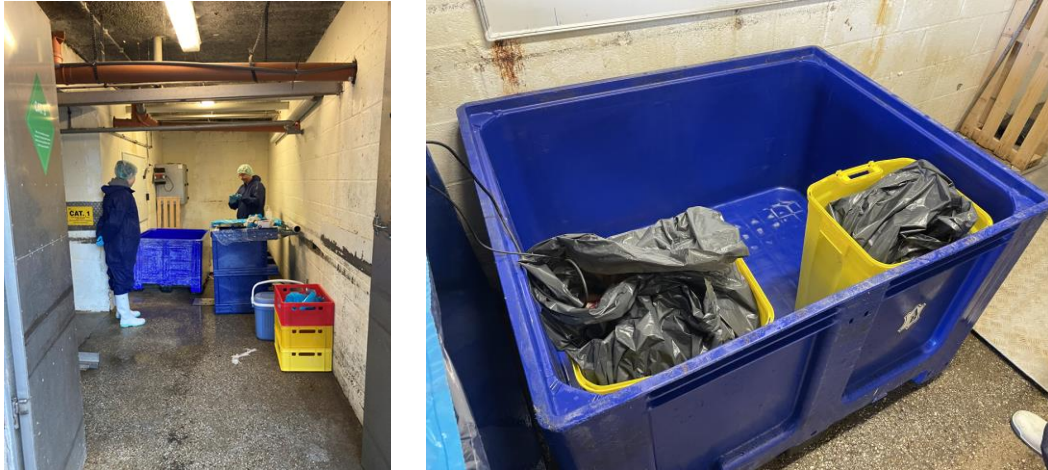


Fig.3.1. De gauche à droite : Vue d'ensemble du local de travail à l'abattoir B et disposition des bacs contenant les demi-flanchets et intestins

- 4) Pour réaliser les prélèvements, un des opérateurs se munissait de gants préalablement désinfectés à l'alcool et récupérait les flanchets en contact avec les intestins dans le sac. Il les déposait ensuite sur un support recouvert par un plastique propre de sorte de présenter à l'opérateur la face interne du muscle qui était en contact avec les intestins.



Fig.3.2. Gauche : table de travail à l'abattoir. Droite : morceau de flanchet sorti du sac pour être écouvillonné.

- 5) L'opérateur a écouvillonné les demi-flanchets à différents temps. Le temps T0 correspondait au temps avant la première mise en contact avec l'intestin. Le plan de travail de la convention initiale prévoyait de réaliser des prélèvements après 0 minute, 20 minutes, 45 minutes, 1h, 1h40, 2h, 2h20, 3h et 4h. Cependant après réflexion, il a été convenu d'allonger les délais de prélèvements pour diminuer les risques de biais dus aux manipulations multiples, et d'utiliser

un intervalle régulier (toutes les 45 minutes) afin de disposer de données normalisées. Ainsi, les temps de prélèvements suivant T0 correspondaient à T1 (T0+45 min), T2 (T0 + 1h30), T3 (T0+2h15), T4 (T0 + 3h) et T5 (T0+3h45).

La méthode employée pour l'écouvillonnage est qualifiée de non-destructrice. Dans les études citées au point 2.2, les chercheurs ont généralement utilisé la méthode destructrice qui consiste à prélever un morceau de muscle par l'intermédiaire d'une biopsie (« excision »). Néanmoins, si cette méthode permet une meilleure récupération des micro-organismes, il y a aussi un risque de résultats faussement négatifs en raison de la faible taille d'échantillon biopsié étudié. La méthode non destructrice permet une récolte des bactéries sur une surface plus étendue.

La surface d'écouvillonnage correspondait à la taille du demi-flanchet qui était fourni, et variait donc d'une fois à l'autre. Les prélèvements ont été réalisés à l'aide d'un écouvillon humidifié suivi d'un écouvillon sec. L'écouvillon humidifié était une éponge abrasive communément employée lors des contrôles officiels dans le secteur viande (3M Sponge stick 3,8 x 7,6 cm, 10ml letheen broth), imbibée de 10 ml de diluant et conditionnée dans un sac hermétique stérile. L'écouvillon sec était un coton stérile et son passage avait pour objectif d'absorber le liquide excédentaire afin d'éviter que le diluant de l'éponge ne « mouille » les flanchets et n'humidifie trop le milieu, risquant de biaiser les résultats. La même personne a réalisé tous les prélèvements, en passant l'éponge sur la surface des flanchets d'abord verticalement, puis horizontalement, et pour finir en diagonale avec une pression soutenue. La personne chargée de frotter l'éponge sur les muscles était équipée de gants stériles, changés à chaque éponge utilisée. Les cotons stériles étaient ensuite disposés avec l'éponge associée dans les mêmes sacs hermétiques pour être également analysés. Une fois les prélèvements réalisés, les sacs contenant les échantillons ont été placés dans une boîte isotherme contenant des blocs congelés avant d'être acheminés vers le laboratoire.



Fig 3.3. Ecouvillonnage du flanchet à l'aide de l'éponge abrasive

3.1.2. Protocole *in situ*

Le second protocole est qualifié d'*in situ* en raison du fait que les organes écouvillonnés ont demeuré à leur position physiologique au moment des prélèvements. Plus précisément, les prélèvements ont été réalisés sur des dépouilles de vaches fraîchement abattues mais non éviscérées, de sorte que la situation imitait le plus possible les conditions réelles futures d'abattage à la ferme.

A) *Vaches abattues*

Ces abattages ont été réalisés au sein de la ferme pédagogique et expérimentale de l'Université de Liège (FEPEX), en collaboration avec cette dernière. La ferme, qui gère entre autres une exploitation laitière, était disposée à fournir à l'équipe de recherche des vaches de réforme destinées à l'abattoir. Même si la FEPEX dispose aussi de bovins de race Blanc Bleu Belge destinés à la production de viande, les abattages se sont limités au cheptel laitier car en raison du retard d'éviscération, la carcasse entière de la vache abattue était considérée comme impropre à la consommation humaine et destinée à l'équarrissage. Au vu du budget disponible, il n'était pas possible d'appliquer cette méthode sur un large panel d'échantillons, ou sur des taurillons viandeux étant donné leur valeur bouchère.

b) *L'acte d'abattage*

Le jour de l'abattage, la vache destinée à être abattue a été isolée de ses congénères et amenée à l'extérieur des étables, dans un renforcement mural sur un sol bétonné (fig.3.4). Accrochée au licol à un anneau d'attache, elle a préalablement été tondue à l'endroit qui allait être ouvert pour procéder par la suite rapidement aux opérations.



Fig.3.4. Lieu de préparation de la vache à l'abattage

Les vaches ont été abattues conformément aux bonnes pratiques d'abattage³², étourdiées au pistolet à tige perforante puis saignées dans la minute par un médecin vétérinaire formé et diplômé ECVPH^{IV}. Avant de réaliser la saignée, celui-ci s'est assuré de l'efficacité de l'étourdissement par un contrôle adéquat des signes d'inconscience (absence de mouvement de redressement, apnée, réflexe cornéen négatif)³³. La saignée a eu lieu le plus rapidement possible (dans la minute) après l'étourdissement sur vache couchée (écroulée suite à l'étourdissement), à l'aide d'un unique couteau utilisé pour sectionner à la fois la peau de la région du cou, les deux artères carotides et les veines jugulaires.

Après avoir fixé des sangles au-dessus des boulets des deux membres postérieurs, la dépouille a été soulevée à l'aide d'un chargeur frontal d'une hauteur approximative de 3,5 mètres et déposée sur le flanc gauche sur une table en inox. L'espace d'entrée ne permettant pas de rentrer avec la dépouille sur la table dans le local à césarienne initialement désigné pour y réaliser les prélèvements, les étapes suivantes se sont déroulées juste à l'extérieur de celui-ci, à l'entrée de l'étable, à distance des autres bovins.



Fig.3.5. Suspension de la dépouille à l'aide d'un chargeur frontal après la saignée

^{IV} European College of Veterinary Public Health



Fig.3.6. Lieu de travail et de prélèvements pour le protocole *in situ*

c) Prélèvements et prise de températures

Une fois la dépouille positionnée sur la table, la zone formant le creux du flanc droit a été nettoyée et désinfectée à l'aide de 3 passages de compresses imbibées d'iso-Bétadine® savon suivis de 3 passages de compresses imbibées d'alcool pur, en formant des cercles s'éloignant du centre du creux du flan de manière centrifuge.

Dans des conditions qui se sont voulues les plus propres possible (après placement d'un champ opératoire stérile et à l'aide d'outils stérilisés), une laparotomie de la fosse lombaire droite a été réalisée par incision cutanée de 20 cm de longueur, approximativement 15 cm sous le sacrum entre l'angle de la hanche et la dernière côte (voir figure 3.7) jusqu'à exposition du péritoine viscéral des intestins.

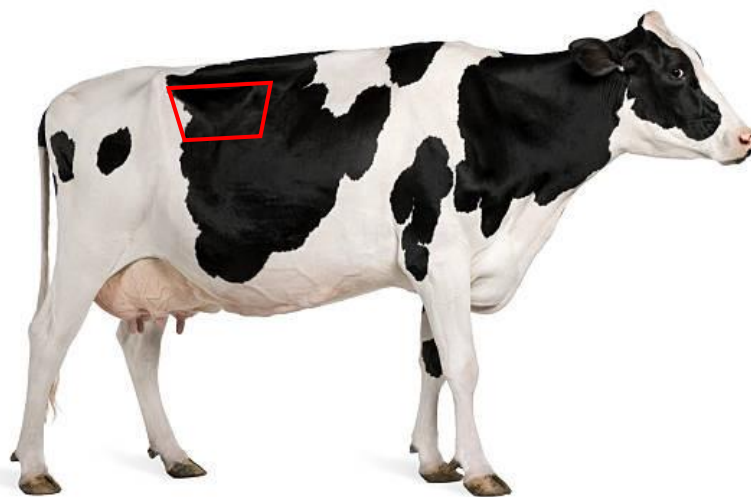


Fig.3.7 Zone correspondant à la surface écouvillonnée (encadrée en rouge)
<https://www.istockphoto.com/fr/photos/vache-profil>

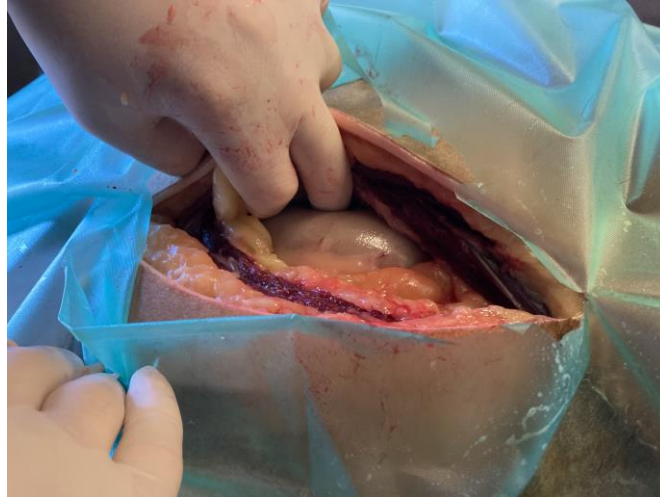


Fig.3.8. Ouverture du flanc jusqu'à exposition des intestins

Lorsque les intestins ont pu être exposés et que les muscles abdominaux profonds en contact avec ceux-ci étaient accessibles, l'opérateur muni d'une blouse et de gants stériles a procédé au premier écouvillonnage. Les muscles abdominaux profonds ont été écouvillonnés aux mêmes temps que ceux décrits dans le protocole *ex situ*, à l'exception de deux vaches qui ont aussi été écouvillonnées à un temps T6, correspondant au T5 mais réalisé sur l'autre flanc du bovin. Cet écouvillonnage supplémentaire permettait d'avoir une idée de l'éventuelle contamination de muscles qui n'avaient jusqu'alors pas été soumis à des biais éventuels dus aux frottements préalables répétés ou aux manipulations exercées pour exposer la zone à écouvillonner. Le même matériel a aussi été employé, à l'exception du fait que l'éponge utilisée disposait d'un manche pour faciliter l'opération. La zone d'écouvillonnage était également considérablement plus petite, correspondant approximativement à la longueur du manche de l'éponge (12 cm) sur la largeur d'ouverture du creux du flanc. Une plus grande ouverture aurait augmenté les risques de contamination environnementale, et se serait éloignée des conditions réelles intra-abdominales.

La même personne a réalisé tous les prélèvements afin d'assurer la constance de la pression appliquée sur le muscle lors du passage de l'éponge. Placée dorsalement à la dépouille, en passant l'éponge sur la surface des muscles dorsalement à ventralement puis crânialement à caudalement et pour finir en diagonale avec une pression soutenue. Après chaque prélèvement, les éponges et cotons ont été scellées dans leur sac d'origine, puis placées dans une boîte réfrigérante en attendant d'être transférées vers le laboratoire.

Entre chaque écouvillonnage, les bords de l'incision ont été remis en contact de manière à « refermer » la cavité abdominale et remettre les muscles en contact avec les intestins, afin de conserver les conditions internes réelles de la carcasse (en termes de température et d'oxygène).

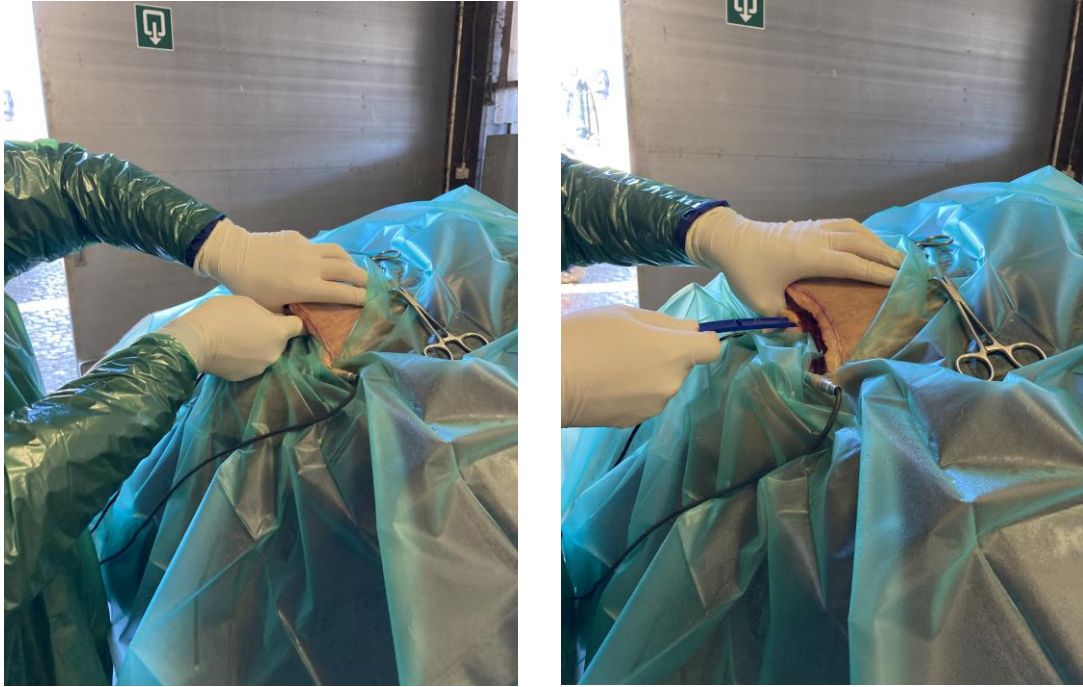


Fig.3.9. Procédure d'écouvillonnage du protocole *in situ*

En parallèle des écouvillonnages, des sondes de température reliées à un datalogger ont été placées respectivement à l'extérieur de dépouille, enfoncées dans l'épaisseur des muscles abdominaux profonds (sonde pénétrante) et entre les anses intestinales afin d'étudier l'évolution de différentes températures (température ambiante, température abdominale interne et température du muscle) et l'effet éventuel de celles-ci sur les résultats au fil du temps. Ces sondes ont été placées avant le premier prélèvement et laissées en place tout au long de la procédure, jusqu'au dernier prélèvement. Les sondes n'ont cependant pas été replacées dans le flanc gauche des vaches écouvillonnées à T6.

d) Échantillonnage microbiologique d'air

Ultérieurement aux journées d'abattage, un prélèvement de l'air de la pièce dans laquelle avaient été pratiqués les écouvillonnages a été réalisé à l'aide d'un échantillonneur d'air portable pour des volumes de 10 L, 100 L, 500 L et 1000 L d'air à une vitesse de 4 tours par minute. Ceci avait pour objectif de renseigner sur la charge microbienne environnante à l'endroit où avaient été réalisés les prélèvements.

3.2. Ensemencements au laboratoire

Les échantillons, qu'ils proviennent de l'abattoir B ou de la FEPEX, ont été acheminés vers le laboratoire de microbiologie de la Faculté de Médecine vétérinaire directement après avoir procédé au dernier écouvillonnage, de sorte que les prélèvements étaient généralement réalisés le matin et les ensemencements l'après-midi du même jour.

La flore intestinale des bovins est constituée en majeure partie d'organismes anaérobies stricts³⁴, mais nous n'avons cependantensemencé les échantillons que dans des milieux permettant la croissance d'*E. coli*, d'*Enterobacteriaceae* et de la flore totale aérobie mésophile, qui représentent des milieux d'intérêt pour tout contrôle dans le secteur agroalimentaire. Nous n'avons pas jugé pertinent de cultiver ces bactéries en anaérobiose pour les raisons suivantes :

- Les protocoles employés ne respectaient pas les conditions anaérobies, de sorte que des bactéries anaérobies strictes n'auraient pu résister dans des environnements en contact avec l'oxygène.
- Le phénomène de translocation concernerait bien plus rarement les bactéries anaérobies qu'aérobies, la translocation des anaérobies n'ayant été signalée que dans des circonstances extrêmes³⁵. De fait, les anaérobies pathogènes comme les *Clostridium* nécessitent plusieurs heures pour que les spores puissent germer et se développer dans une carcasse, le temps que l'oxygène résiduel disparaisse et que le potentiel redox du milieu diminue suffisamment. Ces éléments laissent donc à croire que leur présence sur les surfaces écouvillonnées était très peu probable.

L'ensemencement et le dénombrement des germes totaux aérobies mésophiles a été réalisée conformément à la norme ISO 4833-2:2013/Cor1 : 2014, le dénombrement des entérobactéries conformément à la norme ISO 21528-2:2004 et le dénombrement d'*E. coli* par la norme ISO 7251:2005 modifiée par une incubation à 37 °C.

Chaque éponge, qui contenait initialement 10 ml de diluant, avait été replacée dans le sac stérile sur le lieu de prélèvement, avec le coton stérile correspondant. Au laboratoire, 10 ml de diluant (eau physiologique 0,09 %) supplémentaires ont été ajoutés dans chaque sac afin de disposer d'une quantité suffisante de liquide pour les analyses ultérieures. Chaque sac a ensuite été mélangé individuellement à l'aide d'un stomacher pendant 2 minutes afin d'amener toutes les bactéries contenues dans les éponges et les cotons en suspension. Les suspensions résultantes ont été étalées sur 3 milieux de culture différents en utilisant à la fois la technique d'ensemencement en profondeur « dans la masse » et en surface :

- Plate Count Agar (PCA - Flore totale)
- Violet Red Bile Glucose (VRBG - *Enterobactériaceae*)
- Tryptone-bile-glucuronate (TBX - *E. coli*)

En fonction du niveau de contamination de l'échantillon, l'une ou l'autre méthode pouvait s'avérer plus pertinente. L'ensemencement en surface permettait de faciliter le dénombrement d'échantillons fortement contaminés. Ces ensemencements ont été réalisés à l'aide d'un ensemenceur en spirale EasySpiral de chez Interscience. L'échantillon a été déposé sur chaque milieu précoulé à raison de 0,1 ml.

L'avantage de la profondeur par rapport à la surface est que cette technique est plus sensible sur un échantillon faiblement contaminé. Elle permet donc de mettre plus de colonies bactériennes en évidence par le biais de l'utilisation d'une quantité de suspension-mère 10 fois plus élevée que dans la surface. Lorsque les prélèvements étaient peu ou pas contaminés par des entérobactéries et *E. coli*, c'est donc préférentiellement ce résultat-là qui a été pris en compte. Les ensemencements en profondeur ont été réalisés manuellement, en déposant au fond d'une boîte de Pétri 1ml de suspension avant de couler le milieu gélosé dessus. En théorie donc, il fallait s'attendre à dénombrer 10 fois plus de colonies sur les boîtes ensemencées en profondeur qu'en surface.

Pour l'échantillonnage d'air, une boîte remplie de milieu PCA précoulé a été utilisé.

Après ensemencement, les boîtes de Pétri ont été incubées en aérobiose à 30 °C (PCA) et 37 °C (TBX et VRBG).

Les échantillons restants (après prélèvement pour analyse microbiologique) ont été congelés pour la réalisation de PCR ultérieures.

3.3. Dénombrements

Les dénombrements ont été réalisés pour chaque boîte après 24 h (TBX et VRBG) et 72 h (PCA). Bien que ces dernières aient aussi été dénombrées après 24 h au cas où les échantillons seraient trop contaminés ultérieurement, ce sont les résultats finaux à 72 h qui ont été retenus.

Les résultats ont d'abord été exprimés sous forme de résultats bruts, c'est-à-dire en nombre de colonies observées à l'œil nu après les différentes périodes. Pour pouvoir traiter les données issues des boîtes sur lesquelles aucune colonie n'a été observée, il fallait obligatoirement disposer d'une valeur. **Pour ces échantillons inférieurs à la limite du seuil de dénombrement, une valeur arbitraire égale à la moitié de la valeur du seuil de dénombrement a été choisie, soit 0,5 colonie par boîte ensemencée sans dilution préalable.**

Ces résultats bruts ont ensuite été exprimés en ufc^v/cm² afin de répondre aux normes de l'AFSCA et pouvoir rapporter tous les résultats à une même surface, rendant ainsi les résultats comparables. Pour ce faire, les zones écouvillonnées ont toutes été mesurées, puis leur surface a été définie. Le résultat en ufc/cm² a été obtenu selon le calcul suivant :

$$\text{ufc/cm}^2 = (\text{nombre de colonies dénombrées par ml ensemencé} \times 20^*) / \text{surface écouvillonnée}$$

* 20 correspond aux 10 ml de diluant initiaux contenues dans l'éponge, additionnés de 10 ml de diluant ajoutés au laboratoire.

Les dénombrements (ufc/cm²) ont ensuite été transformés en log (log10) avant l'analyse pour répondre à l'hypothèse de normalité.

Etant donné qu'à chaque écouvillonnage, on ne pouvait exclure l'hypothèse qu'une « micro-couche » de muscle ait pu se détacher par l'action de l'éponge abrasive, il fallait tenir compte des contaminations aux temps précédents, en plus de la contamination étudiée au temps considéré. Ainsi, la contamination totale au temps Tx correspond à la contamination au temps Tx additionnée de la contamination au temps Tx-1. Des deltas (différence logarithmique des populations de microorganismes aux deux temps voisins) ont ensuite été déterminés en calculant la différence entre la contamination au temps Tx et la contamination au temps Tx-1.

^v Unités Formant des Colonies

3.4. Traitement des résultats

3.4.1. Comparaison aux critères microbiologiques établis par l'AFSCA

Dans un premier temps, les résultats exprimés en log ufc/cm² ont été comparés aux critères microbiologiques légalement applicables aux carcasses d'ongulés domestiques. Ces limites sont établies par le règlement européen (CE) No 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires³⁶ et sont re-précisés dans la circulaire relative aux critères microbiologiques applicables aux carcasses d'ongulés domestiques et à la possibilité d'assouplissement de la fréquence d'échantillonnage pour les « petits abattoirs », établie par l'AFSCA³⁷. Cette dernière précise les seuils établis pour les méthodes d'échantillonnage non destructrices telles qu'employées dans la présente étude, sur base de l'Arrêté Royal du 30 novembre 2015 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires d'origine animale.

Deux valeurs limites sont fournies dans les tableaux 3.1 et 3.2. Les résultats de l'analyse de dénombrement des colonies aérobies et des entérobactéries sont considérés comme :

- satisfaisants lorsque le log calculé est inférieur ou égal à la valeur m,
- acceptables lorsque le log calculé se situe entre m et M,
- insatisfaisants lorsque le log calculé est supérieur à M³⁸.

Catégorie de denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage (°)		Limites (°)		Méthode d'analyse de référence (°)	Stade d'application du critère	Action en cas de résultats insatisfaisants
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés (°)	Nombre de colonies aérobies			3,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	5,0 log ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 4833	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé
	Enterobacteriaceae			1,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	2,5 log ufc/cm ² log moyen quotidien	ISO 21528-2	Carcasses après l'habillage, mais avant le ressuage	Améliorations de l'hygiène de l'abattage et réexamen des contrôles de procédé

Tableau 3.1. Critères microbiologiques fixés par le règlement européen (CE) No 1441/2007

	Micro-organismes	Limites (UFC/cm ²)	
		m	M
Carcasses de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés	Colonies aérobies	3,0 log	4,5 log
	<i>Enterobacteriaceae</i>	1,0 log	2,0 log

Tableau 3.2. Critères microbiologiques fixés par l'AFSCA

3.4.2. Analyses statistiques

Dans un second temps, des analyses statistiques ont été réalisées dans plusieurs buts. Les questions auxquelles l'équipe de recherche cherchait à répondre étaient les suivantes :

1. La croissance des bactéries dans le modèle abattoir et le modèle FEPEX est-elle équivalente ? Les résultats pour les deux méthodes sont-ils donc comparables ?
2. La croissance des bactéries évolue-t-elle de manière significative avec le temps d'écouvillonnage, au regard, d'une part, de la concentration en bactéries à chaque temps et, d'autre part, de la variation de la concentration de bactéries entre deux temps (deltas)? Est-elle significativement différente à un temps par rapport à un autre ou pas ?
3. Est-ce que la puissance statistique des données est suffisante pour en tirer des résultats pertinents ou faudrait-il davantage de résultats, donc d'abattage/prélèvements?

Modèle statistique

Pour répondre à ces questions, il a été proposé d'utiliser un modèle mixte faisant intervenir le lieu d'abattage (facteur fixe à 2 niveaux : « Fepex » ou « Abattoir »), le temps après abattage (facteur fixe répété à 7 niveaux : 0, 45, 90, 135, 180, ou 225 minutes) et l'interaction entre ces deux facteurs ($2*7 = 14$ niveaux). En outre, comme il s'agit de données mesurées de manière répétée sur les mêmes individus, il a été proposé d'introduire une structure de corrélation entre les résidus des mesures effectuées sur le même individu (facteur aléatoire propre à l'individu).

Deux remarques sur le design expérimental :

- L'effet du sexe était à priori peu probable. De plus, si le sexe des vaches issues du protocole *in situ* était connu, la manière de classer des paires flanchet-intestins, parfois issues d'animaux de sexe différent, est moins évident. Cet effet n'a donc pas été pris en compte dans les analyses.
- Dans le protocole *ex situ*, le nombre de sondes de températures étant limité, seule la température d'un des deux demi-flanchets en contact avec les intestins a été relevée. Les températures abdominales pour les couples flanchet-intestins dans le protocole *ex situ* ne sont données que pour les premiers intestins de chaque flanchet. Il est supposé que la température était la même pour les seconds intestins à l'abattoir.

Le modèle mathématique suivant a été utilisé pour répondre aux questions posées :

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \tau_j + (\gamma\tau)_{ij} + i_k + \beta_a * Ta_{ijk} + \beta_{im} * Tim_{ijk} + \beta_{ia} * Tia_{ijk} + e_{ijk}$$

Dans ce modèle :

- Y_{ijk} est une concentration associée à l'individu k du groupe i au temps j,
- μ est une moyenne générale,
- γ_i est l'effet du groupe i,
- τ_j est l'effet du temps j,
- $(\gamma\tau)_{ij}$ est l'interaction entre le groupe i et le temps j,
- i_k est l'effet aléatoire de l'individu k,
- $\beta_a * Ta_{ijk}$ est un terme de régression linéaire de la concentration sur la température ambiante,

- $\beta_{im} * Tim_{ijk}$ est un terme de régression linéaire de la concentration sur la température intramusculaire,
- $\beta_{ia} * Tia_{ijk}$ est un terme de régression linéaire de la concentration sur la température intra-abdominale,
- e_{ijk} est le résidu aléatoire associé à la mesure Y_{ijk} .

Il faut signaler que :

- L'effet aléatoire « individu » permet d'introduire une corrélation entre les mesures successives sur le même individu, ce qui est nécessaire. Par contre, un tel effet suppose que la corrélation entre deux mesures successives est identique à celle entre deux mesures plus éloignées dans le temps, ce qui peut être abusif. Une alternative est de modéliser une « autocorrélation » entre résidus. Dans ce cas, la corrélation entre résidus diminue pour des mesures éloignées dans le temps. Le modèle exploitant cette structure d'« autocorrélation » sera testé et comparé au modèle employant une structure de « symétrie composée » (c'est-à-dire le système introduisant un effet aléatoire individuel).

3.5. PCR quantitative

Pour renforcer les résultats de la microbiologie par culture, des PCR quantitatives ciblant la flore totale ont été réalisées sur les échantillons issus du protocole *in situ*. Plus précisément, l'objectif de celles-ci était de confirmer l'absence de translocation de bactéries qui ne se multiplieraient pas sur les milieux de culture utilisés depuis les intestins vers la paroi musculaire à un temps T, laquelle se manifesterait par une augmentation soudaine et continue de bactéries à partir de ce temps.

3.5.1. Extraction d'ADN

L'ADN bactérien a préalablement été extrait des échantillons restants à l'aide du DNeasy Blood & Tissue Kits (Quiagen, Belgique). Après centrifugation d'1,5 ml d'échantillon (sauf pour le T1 de la vache 2 pour lequel 1 ml a été prélevé), le culot formé a été mélangé à 180 μ l d'une solution composée de lysozyme (20 mg/ml) dissout dans du tampon de lyse (Tris-Cl 20 mM, pH 7,4, Na EDTA 8,2 mM, Triton X-100 20mg/ml, molecular biology water). Après une incubation d'une heure à 56 °C, 5 billes de Zirconia, 25 μ l de protéinase K et 200 μ l de tampon de lyse fourni par le kit ont été ajoutés dans le but d'induire la lyse chimique et mécanique des parois et des membranes bactériennes. Les échantillons ont à nouveau été incubés pendant 1h à 56 °C puis centrifugés pour éliminer les débris cellulaires. 200 μ l d'éthanol ont ensuite été additionnés au surnageant récupéré avant de verser le mélange sur la colonne de spin. S'en sont suivis 2 cycles de nettoyage/centrifugation à l'aide de 500 μ l de tampon de lavage, avant l'ajout de 50 μ l de tampon d'élution. Après centrifugation, 2 μ l de surnageant final ont été isolés et analysés au spectrophotomètre afin d'évaluer la concentration finale en acides nucléiques et la pureté des échantillons. Le reste a été congelé à -22 °C avant la réalisation de la qPCR.

3.5.2. PCR en temps réel

La charge bactérienne des échantillons a été estimée en réalisant une PCR quantitative ciblant les régions hypervariables V2-V3 de l'ADNr 16S à l'aide des amorces 16S-Forward [5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCAG-3'] et 16S reverse [5'-ATTACCGCGGCTGG-3']. Des standards d'ADN ont préalablement été obtenus à partir de produits PCR purifiés de spores de *C. difficile*, et quantifié à l'aide de PicoGreen (Thermo Fischer Scientific, Waltham). Des dilutions par 10 de cet ADN ont été réalisées pour générer une courbe standard. 10,5 µl d'un mélange contenant 0,25 µl de primer F, 0,25 µl de primer R, 6,25 µL de Rox SYBR 2×MasterMix (Eurogentec, Seraing, Belgium) et 3,75 µL d'eau moléculaire ont été déposés dans chaque puit de la plaque PCR. 2µl de chaque dilution de standards, des produits d'extraction purs, des produits d'extraction dilués 10 fois et d'un contrôle négatif (nuclease-free water) y ont ensuite été ajoutés. Tous les standards, produits d'extraction et le contrôle négatif ont été chargés sur la plaque en dupliquat.

Les données ont été générées par un appareil de PCR en temps réel en appliquant le profil thermique suivant : 1 cycle à 50 °C pendant 2 min ; 1 cycle à 95 °C pendant 10 min ; 40 cycles à 95 °C pendant 15 s puis à 60 °C pendant 1 min. Une courbe de dissociation a été dressée dans l'intervalle de 64 à 95 °C à la fin du cycle afin de vérifier la spécificité de l'amplification. Les résultats finaux exprimés en logarithme de base 10 du nombre de copies par cm² ont été déduits à partir des CT renseignés par la machine.

4) Résultats

4.1. Echantillons

4.1.1. A l'abattoir B

Les flanchets de trois bovins mâles et deux bovins femelles ont été écouvillonnés ont été écouvillonnés entre mars et avril 2023. Les âges de ceux-ci variaient entre 2,5 et 7 ans. Les intestins qui ont été associés aux flanchets étudiés provenaient majoritairement de mâles viandeux, à l'exception de deux. Les données sur les âges n'étaient pas toujours disponibles pour les bovins desquels provenaient les intestins.

Malgré l'application des ouvriers d'abattoir lors des manipulations, certains intestins ont été percés lors de l'éviscération sur la chaîne. Généralement, ce constat était posé dans le local utilisé pour réaliser les prélèvements, avant de les mettre en contact avec les flanchets. De fait, du jus issu du tractus digestif était observé à la surface de la séreuse. Comme il n'était à ce stade plus envisageable de retourner sur la chaîne pour prélever un intestin intact, la portion qui semblait percée a été enfouie sous les autres anses afin que la paroi de l'intestin en contact avec le flanchet ne soit pas trop contaminée.

Echantillon	Age (années)	Sexe	Filière	Race	Remarques particulières ¹	Surface (cm ²)
Flanchet 1	7	F	Viande	BBB	/	A: 932,75 B: 980
Flanchet 2	4,5	M	Viande	BBB	N'a subi aucun refroidissement	A: 742 B: 1149,5
Flanchet 3	6	M	Viande	BBB	/	A: 434 B: 678,5
Flanchet 4	4,5	M	Viande	BBB	/	A: 821,5 B: 866,25
Flanchet 5	2,5	F	Viande	BBB	/	A: 770,25 B: 640
Intestins 1	/	M	Viande		/	
Intestins 2	/	M	Viande		/	
Intestins 3	/	M	Viande		/	
Intestins 4	/	M	Viande		Percés	
Intestins 5	1	M	Viande		/	
Intestins 6	1	M	Viande		Percés	
Intestins 7	1	M	Viande		Percés	
Intestins 8	1	M	Viande		/	
Intestins 9	6,5	F	Viande		/	
Intestins 10	5,5	F	Viande		/	

Tableau 4.1. Profil des bovins ayant fourni les flanchets et intestins à l'abattoir B

¹ « / » signifie qu'il n'y a rien à signaler. ² Comme expliqué au point 3.1.1, chaque flanchet a été subdivisé en deux demi-flanchets déposés sur deux intestins différents. Ces deux demi-flanchets ont été nommés A et B.

4.1.2. Vaches abattues à la FEPEX

Les vaches sélectionnées pour l'abattage étaient des vaches laitières de réforme de race Holstein âgées de 2 à 10 ans. Deux vaches ont été apportées par un marchand à la FEPEX le matin même de leur abattage, en raison du fait que peu d'animaux de réforme étaient disponibles à la FEPEX ces jours-là. Les vaches issues de la FEPEX présentaient un score corporel^{VI} important en comparaison des vaches de réforme apportées par un marchand (voir tableau 4.2).

Individu	Race	Sexe	Filière	Origine	Age (années)	Nb vêlages /lactation	Score corporel (sur 5)
Vache 1	Pie-Noire-Holstein	F	Lait	FEPEX	10	5	3,75
Vache 2	Pie-Noire-Holstein	F	Lait	FEPEX	4,5	2	3,75
Vache 3	Pie-Noire-Holstein	F	Lait	FEPEX	3	1	3,5
Vache 4	Pie-Noire-Holstein	F	Lait	MARCHAND	2	1	1,75
Vache 5	Pie-rouge Holstein	F	Lait	MARCHAND	4,5	/	2,25

Tableau 4.2. Profil des vaches ayant été abattues à la FEPEX

4.2. Températures

4.2.1. Protocole *in situ*

a) *Température ambiante*

Le protocole initial prévoyait de travailler dans un local à césarienne chauffé à une vingtaine de degrés. Néanmoins, des contraintes liées au déplacement de la dépouille et à la place disponible pour rentrer n'ont pas permis de travailler dans le local préalablement désigné pour effectuer les écouvillonnages. Les manipulations ont donc été réalisées dans un endroit attenant à ce local, à l'extrémité de l'étable, à côté d'une porte donnant accès à l'extérieur. Les abattages ayant été réalisés au début du printemps (tableau 4.3), les températures ambiantes n'ont jamais dépassé 16 °C. Le jour d'abattage le plus frais, le thermomètre affichait une température initiale de 5 °C.

^{VI} Le score corporel évalue l'état d'embonpoint des vaches laitières. Il est compris entre 1 (vache très maigre) à 5 (vache très grasse).

b) Température intra-musculaire

La température initiale des muscles obliques de l'abdomen des vaches fraîchement abattues était comprise entre 23,4 à 33,9 °C, avec une moyenne initiale de 28 °C et une décroissance moyenne entre le temps T0 et T5 de 3,9 °C. Les vaches qui présentaient une température initiale plus élevée ont connu la décroissance de température la plus importante avec le temps. Les différences de température intramusculaires entre les vaches peuvent, du moins en partie, être expliquées par leur tempérament, ou des facteurs de stress³⁸. Par exemple, la vache 1 a montré un tempérament très calme, par rapport à la vache 2 qui s'est davantage débattue à la pose du licol. De plus, les vaches provenant du marchand, soumises à davantage de stimuli stressants en raison de leur transport préalable et l'exposition à un environnement nouveau, présentaient une température intra-musculaire plus importante que les vaches issues de la FEPEX.

c) Température intra-abdominale

Les températures intra-abdominales sont les plus élevées qui ont été enregistrées avec une moyenne de température initiale de 35,4 °C. Il convient de noter que la prise de température intra-abdominale est susceptible d'être exposée à davantage de biais que la prise intramusculaire. De fait, la sonde employée pour le relevé de ces températures n'étant pas pénétrante mais juste positionnée entre les anses intestinales, il est probable que celle-ci ait été accidentellement déplacée lors des différents prélèvements, ce qui expliquerait certaines différences de températures soudainement plus importantes, comme entre T3 et T4 pour les mesures de la vache 1. De plus, les sondes étaient placées aléatoirement entre les anses intestinales, et certaines sondes ont sans doute été placées plus en profondeur que d'autres.

	Vache 1				Vache 2			
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)			Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta		Te	Tm	Ta
T0	13h30	10	23,4	37,5	13h21	10,7	27,1	39,1
T1	14h15	10,2	24,9	36,4	14h06	10,6	27,6	37,6
T2	15h	10,2	24,3	34,6	14h50	10,6	26,5	35,6
T3	15h45	10,3	23,4	31,8	15h35	10,8	25,7	34,1
T4	16h30	10,3	23,3	22,7	16h20	10,7	24,7	33
T5	17h15	10,2	22,8	22,6	17h05	10,8	24	32,4

	Vache 3			Vache 4				
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)			Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta		Te	Tm	Ta
T0	11h28	5	25	34,7	11h30	10	33,9	33,8
T1	12h13	5	24,8	33,2	12h15	10	29,2	31,9
T2	12h58	6	24,7	31,2	13h	10	28,4	31
T3	13h43	6	23,5	30,9	13h45	10	27,3	30
T4	14h30	6	22,8	29,6	14h30	11	27	28,9
T5	15h15	7	21,7	29,0	15h15	11	27	28,2
T6¹					15h28			

	Vache 5			
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta
T0	13h11	16	30,5	31,7
T1	13h56	16	27,7	30,4
T2	14h40	15	26,8	30,5
T3	15h25	15	26,9	30,10
T4	16h10	15	25,2	27,3
T5	16h53	15	24,9	26,7
T6¹	17h22	15		

Tableau 4.3 Résultats des relevés de température à la FEPEX

Légende : Te = température ambiante, Tm = température intramusculaire, Ta= température de la cavité abdominale

¹ Les sondes de température n'ont pas été replacées pour le prélèvement dans le flanc gauche

4.2.2. Protocole *ex situ*

a) Température ambiante

Tous les relevés de température ambiante à l'abattoir confondus étaient compris dans la fourchette 9-15 °C. Ces conditions de température se rapprochent fortement de celles en conditions *in situ*. Dans les deux cas, elles correspondaient de près aux températures extérieures enregistrées ces journées-là, car les pièces où étaient réalisés les prélèvements donnaient sur un accès direct à l'extérieur.

b) Température intra-musculaire

Etonnamment, les températures intra-musculaires enregistrées étaient sensiblement proches des températures intra-musculaires enregistrées à la FEPEX, alors qu'ils avaient préalablement subi un pré-refroidissement, comme indiqué par l'abattoir. Cependant, un *shock chilling* d'une heure seulement ne fait qu'amorcer le refroidissement en surface, ce qui s'illustre bien ici. Seul un flanchet s'est démarqué par sa température comparativement basse au regard des autres (flanchet 5 – voir tableau 4.4). Ainsi, en isolant les données de température de ce dernier flanchet des quatre autres, on obtient une température moyenne intra-musculaire initiale de 24,5 °C, contre 28,0 °C à la FEPEX.

Aucun commentaire particulier n'avait été fait par le personnel de l'abattoir quant à un traitement différent du flanchet 5 par rapport aux autres, et cette différence de température s'explique difficilement. Elle pourrait être en partie attribuable au fait qu'il s'agissait du bovin le plus jeune et le plus léger, présentant sans doute une masse musculaire et grasseuse moins importante que les autres. Paradoxalement, le flanchet dont il avait été dit qu'il n'avait subi aucun refroidissement n'a pas présenté la température la plus chaude, ce qui démontre sans doute à quel point le refroidissement est à ce stade très superficiel.

Les températures intra-musculaires évoluent également différemment avec le temps. Les trois premiers flanchets présentent une évolution négative de la température intra-musculaire avec le temps, tandis que les deux derniers ont visiblement été réchauffés au contact des intestins.

c) Température intra-abdominale

La température entre les anses intestinales chute plus vite que lors des expériences à la FEPEX et est moins élevée de base, sans doute attribuable à la position de la sonde qui peut bouger lors des manipulations.

	10/03 - Flanchet 1			17/03 - Flanchet 2				
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)			Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta		Te	Tm	Ta
T0	8h54	11	22,2	32,3	9h09	13,2	24,2	37,5
T1	9h39	10,1	22,1	29,1	9h54	12,7	24,5	31,5
T2	10h24	10,1	21,9	26,8	10h39	13	23,4	28,2
T3	11h09	10,2	21,7	25,1	11h24	13,8	21,9	28
T4	11h54	9,6	21,4	24	12h09	14,5	22,1	27,2
T5	12h39	10,2	21,3	23,3	12h54	14,8	22,3	28,6

	31/03 - Flanchet 3				14/04 - Flanchet 4			
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)			Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta		Te	Tm	Ta
T0	8h29	14,5	29,3	33	8h33	14,4	22,2	37,8
T1	9h14	13,5	26,6	33,7	9h18	13	23,8	34,4
T2	9h59	13	25,3	31,4	10h07	13	23,6	32,6
T3	10h44	14	24,5	29,1	10h50	12,5	24,10	29,10
T4	11h29	14	24	27,4	11h36	14	24	25,8
T5	12h13	14	23,7	26,2	12h18	14	24	24

	21/04 - Flanchet 5			
	Heure de prélèvement	Températures (°Celsius)		
		Te	Tm	Ta
T0	8h25	8	11	33,8
T1	9h10	8	12,7	32,1
T2	9h53	9	14,5	31,5
T3	10h51	10	15,8	30
T4	11h24	10	16,8	28,9
T5	12h09	11	17	28,2

Tableau 4.4 Résultats des relevés de température

Légende : Te = température ambiante, Tm = température intramusculaire, Ta= température de la cavité abdominale

4.3. Dénombrements

4.3.1. *Protocole in situ*

Il convient de préciser que le temps de prélèvement T0 correspondait en réalité à un délai de 20-30 minutes *post-mortem*. En effet, cet intervalle de temps était nécessaire pour attendre la fin de la saignée, bien positionner la dépouille sur la table, et préparer le site de prélèvement (désinfection, ouverture, etc.). Ces 20-30 minutes correspondent en fait à un temps d'éviscération « normal » dans un abattoir.

Vache	1	2	3	4	5
Heure d'étourdissement	13h10	13h02	11h03	11h04	12h40
Heure de prélèvement à T0	13h30	13h21	11h28	11h30	13h11

Tableau 4.5. Heures auxquelles les vaches ont été étourdies et leur carcasse écouvillonnée au temps T0

Les résultats bruts de comptage et calculs ultérieurs sont présentés dans les tableaux 4.6 et 4.7. **Tous les échantillons issus des prélèvements à la FEPEX se situent sous la valeur seuil de dénombrement (aucune colonie au bout de 24h) en *E. coli* et *Enterobacteriaceae*, à l'exception de quelques prélèvements ponctuels.** Plus précisément:

- La vache 1 à T3 qui présentait 4 colonies d'entérobactéries
- La vache 2 qui présentait 1 colonie d'entérobactéries à T2 et une et deux colonies d'*E. coli* à T1 et T2 respectivement

Les échantillons ne sont en revanche pas exempts de flore totale aérobie mésophile, et ce dès le premier prélèvement. Le milieu PCA n'étant pas sélectif sur le type de bactérie, toutes les bactéries aérobies environnementales et pathogènes ou non sont susceptibles de pousser sur ce milieu. De fait, si l'environnement s'est voulu le plus propre possible, il n'était pas complètement stérile et l'air circulant dans une étable contient toujours un certain nombre bactéries de environnantes. Cela s'est confirmé au dénombrement des boîtes de Pétri utilisées pour l'échantillonnage d'air ambiant. Seule la boîte qui avait servi à l'extraction de 10 litres d'air a pu être dénombrée, les autres étant trop chargées et ce, dès 24h. **Trois cents colonies ont été dénombrées sur la boîte de 10 L après 24 h, indiquant une charge bactérienne environnante équivalente à au moins 3×10^4 bactéries/m³.**

Il est intéressant de noter que les prélèvements plus contaminés le sont ponctuellement et que la contamination ne semble pas graduelle. De plus, contre toute attente, T5 ou T6 ne représentent jamais les temps qui sont les plus contaminés. Concernant la vache 2, les deux seuls échantillons sur lesquels ont été trouvés des *E. coli* correspondent également au temps présentant le plus de flore totale. Ce n'était pas le cas de la vache 1 qui n'a présenté des *Enterobacteriaceae* qu'au temps T3.

Même si ces données ne sont disponibles que pour deux vaches, les résultats des T6 sont intéressants. En effet, ils ne sont pas soumis au biais des frottements précédents (prélèvements à l'éponge) et représentent le temps d'écouvillonnage le plus tardif. On constate que s'ils sont bien négatifs pour les *Enterobacteriaceae* et pour les *E. coli*, ils représentent les valeurs les plus basses en flore totale aérobie par rapport à tous les temps écouvillonnés sur le flanc droit.

Résultats bruts <i>E. coli</i> (CFU/100 cm ²)							
Echantillon	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)	T6 (3h45)
Vache 1	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 2	<SD	5	10	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 3	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 4	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 5	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD

Résultats bruts <i>Enterobacteriaceae</i> (CFU/100 cm ²)							
Echantillon	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)	T6 (3h45)
Vache 1	<SD	<SD	<SD	20	<SD	<SD	<SD
Vache 2	<SD	<SD	5	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 3	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 4	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD
Vache 5	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD	<SD

Résultats bruts flore totale aérobie (CFU/100 cm ²)							
Echantillon	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)	T6 (3h45)
Vache 1	600	900	150	850	850	450	
Vache 2	200	1100	3550	400	750	950	
Vache 3	833	1000	1333	1667	2917	2167	
Vache 4	1333	1000	1083	1000	1417	750	83
Vache 5	167	2333	333	417	2167	750	250

Tableau 4.6. Résultats bruts des dénombrements d'*E. coli*, des *Enterobacteriaceae* et de la flore totale aérobie, exprimés en CFU/100 cm²

Remarque : « <SD » correspond aux valeurs seuils de dénombrement définies pour chaque prélèvement pour lequel aucune colonie n'a été dénombrée. Le nombre de colonies dans ce cas a donc arbitrairement été fixé à 0,5 et la valeur seuil présentée en vert ci-dessus été calculée sur base du calcul développé au point 3.3. Les valeurs en gras représentent les résultats des échantillons pour lesquels au moins une colonie a été détectée.

4.3.2. Protocole *ex situ*

Les résultats bruts issus du protocole *ex situ* sont présentés au tableau 4.7. Il est à noter que les flores totales aérobies n'ont pu être dénombrées après les deux premiers jours de prélèvements, soit pour le flanchet 1 et le flanchet 2. En effet, les colonies présentes sur la boîte étaient trop nombreuses et incomptables à l'œil nu. Par la suite, le protocole a été adapté et une dilution supplémentaire a été réalisée pour permettre le dénombrement.

Aucun flanchet n'était contaminé par *E. coli* au temps T0 avant la mise en contact avec les intestins. En revanche, presque tous les flanchets, mais particulièrement le 5, 6, 9 et 10, étaient contaminés par des *Enterobacteriaceae* avant même qu'ils n'aient été mis en contact avec le tractus digestif. Cela s'est illustré à la lecture des boîtes de flore totale aérobie. Les parois musculaires d'un animal vivant sain qui vient de mourir sont pratiquement stériles de bactéries aérobies. Les bactéries présentes à la surface de celles-ci aussi peu de temps après la mort sont assurément le fruit de contaminations sur la chaîne d'abattage. Lorsque la flore totale exprimée par 100 cm² est calculée pour T0, d'une part pour les bovins abattus à la FEPEX et, d'autre part, à l'abattoir, on constate que **les contaminations initiales étaient déjà plus de 13 fois supérieures à l'abattoir par rapport à la FEPEX**. Il convient de tenir compte de cette information pour les interprétations ultérieures.

Tout comme à la FEPEX avec la technique d'écouvillonnages répétés, le nombre de colonies n'augmente pas graduellement avec le temps mais présente à certains moments de petits pics de contamination non prévisibles. Dans certains cas, c'est d'ailleurs les prélèvements réalisés au

temps T0 qui sont les plus contaminés de toute la série, laissant penser que le premier frottement réalisé avec l'éponge stérile a ôté une couche superficielle qui venait d'être contaminée.

Le couple flanchet 2-intestins 4 a fait objet d'un comptage exceptionnellement élevé dès la mise en contact avec les intestins (T1) qu'il s'agisse des *E. coli*, des *Enterobacteriaceae* ou de la flore totale aérobie. Le jour du prélèvement, il avait été constaté que les intestins 4 avaient été troués lors de l'éviscération, ce qui explique assurément le pic de contamination dès la mise en contact avec le flanchet. Les intestins 6 ainsi que les 7 avaient également été troués, mais la différence de contamination avec les autres n'est pas aussi frappante. Ces résultats dépendent sans doute de la façon dont le flanchet était disposé sur les intestins troués. Lorsque l'endroit percé était clairement identifié, celui-ci était enseveli sous les autres anses pour éviter de contaminer le flanchet, mais il est probable que l'endroit percé n'ait pas toujours été bien identifié dès le début ou que la contamination ait déjà eu lieu préalablement.

Il ressort également des tableaux ci-dessous que dans certains cas, la contamination aux *Enterobacteriaceae* des échantillons semble concorder avec la contamination aux *E. coli*, c'est-à-dire que lorsque des augmentations des premières sont observées, on constate des augmentations des deuxièmes au même moment. Pour certains prélèvements, les valeurs sont même identiques (par exemple au T3 du flanchet 2 - intestins 4). *E. coli* étant une bactérie Gram négative faisant elle-même partie de la famille des *Enterobacteriaceae*, on peut conclure, dans ces cas, qu'il s'agissait en fait de contaminations par les mêmes bactéries.

Echantillon	Résultats bruts <i>E. coli</i> (CFU/100 cm ²)					
	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)
Flanchet 1 - intestins 1	<SD	47,2	94,3	98,6	90,1	171,5
Flanchet 1 - intestins 2	<SD	65,3	38,8	110,2	83,7	93,9
Flanchet 2 - intestins 3	<SD	18,9	27,0	43,1	35,0	78,2
Flanchet 2 - intestins 4	<SD	2122,7	2122,7	1217,9	4802,1	26098,3
Flanchet 3 - intestins 5	<SD	32,3	221,2	193,5	175,1	294,9
Flanchet 3 - intestins 6	<SD	<SD	<SD	2,9	5,9	<SD
Flanchet 4 - intestins 7	<SD	17,0	111,5	174,5	572,0	533,2
Flanchet 4 - intestins 8	<SD	<SD	<SD	2,3	2,3	6,9
Flanchet 5 - intestins 9	<SD	2,6	5,2	2,6	2,6	7,8
Flanchet 5 - intestins 10	<SD	34,4	15,6	15,6	6,3	3,1

Echantillon	Résultats bruts <i>Enterobacteriaceae</i> (CFU/100 cm ²)					
	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)
Flanchet 1 - intestins 1	2,1	96,5	163,0	135,1	122,2	184,4
Flanchet 1 - intestins 2	<SD	244,9	367,3	857,1	2163,3	2530,6
Flanchet 2 - intestins 3	<SD	16,2	32,3	43,1	67,4	91,6
Flanchet 2 - intestins 4	<SD	2505,4	2314,0	1496,3	4123,5	14162,7
Flanchet 3 - intestins 5	115,2	55,3	221,2	248,8	124,4	294,9
Flanchet 3 - intestins 6	507,0	53,1	17,7	1,5	5,9	2,9
Flanchet 4 - intestins 7	12,1	26,7	92,1	310,2	901,6	630,1
Flanchet 4 - intestins 8	<SD	<SD	<SD	4,6	6,9	2,3
Flanchet 5 - intestins 9	675,1	41,5	5,2	2,6	2,6	280,4
Flanchet 5 - intestins 10	190,6	71,9	37,5	15,6	15,6	18,8

Echantillon	Résultats bruts flore totale aérobie (CFU/100 cm ²)					
	T0 (0 min)	T1 (45 min)	T2 (1h30)	T3 (2h15)	T4 (3h)	T5 (3h45)
Flanchet 1 - intestins 1	/	/	/	/	/	/
Flanchet 1 - intestins 2	/	/	/	/	/	/
Flanchet 2 - intestins 3	/	/	/	/	/	/
Flanchet 2 - intestins 4	/	/	/	/	/	/
Flanchet 3 - intestins 5	30415	15668	4147	18433	9217	26728
Flanchet 3 - intestins 6	2358	3242	4716	3242	3832	4422
Flanchet 4 - intestins 7	1697	5817	9452	18904	24236	59136
Flanchet 4 - intestins 8	231	1385	924	924	3001	3925
Flanchet 5 - intestins 9	5712	18695	7270	7270	3376	2337
Flanchet 5 - intestins 10	2188	5625	3438	1250	3750	3125

Tableau 4.7. Résultats bruts des dénombrements d'*E. coli*, des *Enterobacteriaceae* et de la flore totale aérobie, exprimés en CFU/100 cm²

Remarque : « <SD » correspond aux valeurs seuils de dénombrement définies pour chaque prélèvement pour lequel aucune colonie n'a été dénombrée. Le nombre de colonies dans ce cas a donc arbitrairement été fixé à 0,5 et la valeur seuil présentée en vert ci-dessus été calculée sur base du calcul développé au point 3.3. Les valeurs en gras représentent les résultats des échantillons pour lesquels au moins une colonie a été détectée.

4.4. Comparaison aux critères microbiologiques

Les graphiques de l'évolution des contaminations bactériennes avec le temps sont présentées dans les figures 4.1, 4.2 et 4.3. Les contaminations sont exprimées en log cfu/cm² et tiennent compte des contaminations aux temps précédents (addition des contaminations de chaque temps). Les valeurs en log encadrées sur les graphiques représentent les limites de satisfaction et d'acceptabilité fixées par l'AFSCA (voir point 3.4.1). Ni le règlement européen, ni l'AFSCA n'ayant défini de limites précises en ce qui concerne les *E. coli*, nous avons arbitrairement fixé leurs seuils aux mêmes valeurs que pour les *Enterobacteriaceae*. En effet, les résultats bruts ont illustré le fait que souvent, les augmentations d'*Enterobacteriaceae* concordaient avec les augmentations d'*E. coli*, ce qui laisse à penser que celles-ci étaient majoritaires dans cette famille de bactéries. Seule l'évolution des contaminations du protocole *ex situ* est présentée dans les graphiques car, concernant les animaux écouvillonnés lors du protocole *in situ*, **tous les résultats pour les concentrations en *E. coli*, *Enterobacteriaceae* et flore totale se situent dans l'intervalle « satisfaisant » établi par l'AFSCA, c'est-à-dire en-dessous de la limite minimale imposée (annexe 3).** De fait, la majorité des prélèvements se situaient en-dessous du seuil de dénombrement pour les *E. coli* et les *Enterobacteriaceae*, et les contaminations en flore totale aérobie peuvent être considérées comme négligeables.

Pour les flanchets écouvillonnés avec le protocole *ex situ*, seul l'échantillon « flanchet 2 – intestins 4 » a présenté des valeurs d'*E. coli* et *Enterobacteriaceae* supérieures à la limite d'acceptabilité (flore totale non disponible pour cet échantillon). Pour rappel, les intestins 4 avaient été percés lors de l'éviscération ainsi que les intestins 6 (dont les valeurs restent sous la limite de satisfaction) et les intestins 7 (dont les résultats se situent dans l'intervalle de tolérance). **En ce qui concerne les prélèvements à l'abattoir, nous constatons que la majorité des prélèvements ne dépasse pas la limite de satisfaction, 6 se situent dans l'intervalle de tolérance et un seul dépasse la limite d'acceptabilité.**

Les graphiques illustrent bien le pic de contamination entre T0 et T1 pour certains flanchets, mettant en évidence l'avant et après mise en contact avec les intestins.

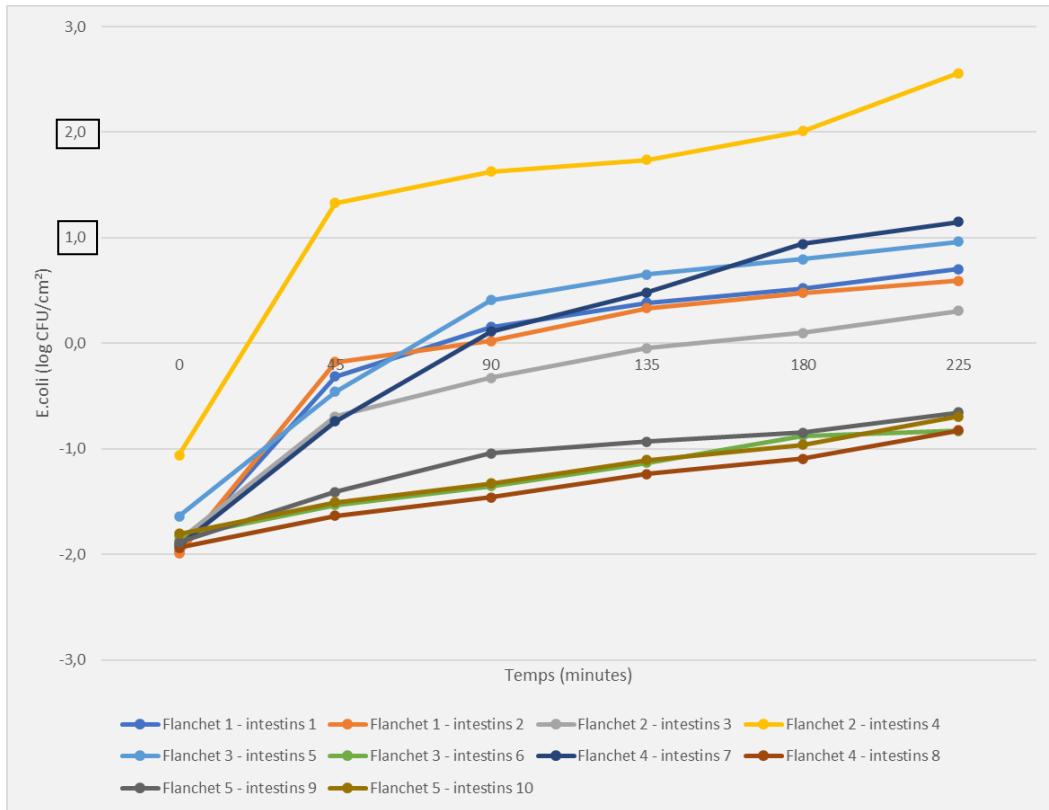


Figure 4.1. Evolution des *E. coli* des échantillons issus du protocole *ex situ* au cours du temps
NB : les valeurs encadrées correspondent aux limites de satisfaction et d'acceptabilité établies par l'AFSCA

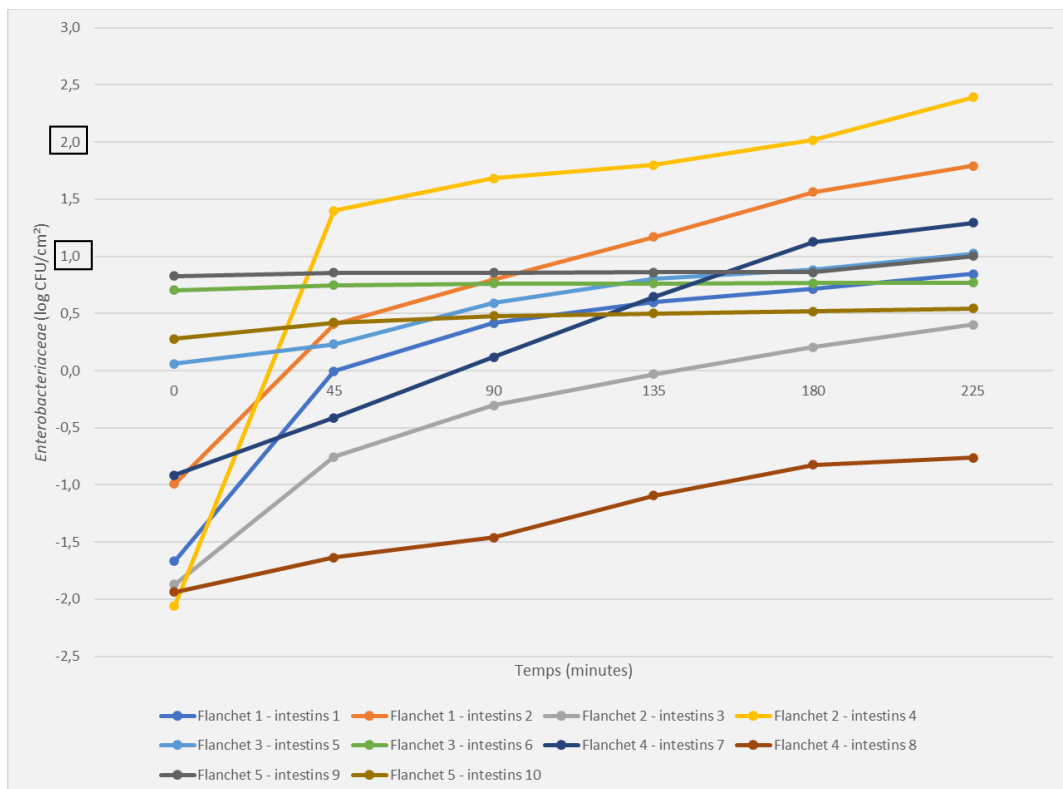


Figure 4.2. Evolution des *Enterobacteriaceae* des échantillons issus du protocole *ex situ* au cours temps
NB : les valeurs encadrées correspondent aux limites de satisfaction et d'acceptabilité établies par l'AFSCA

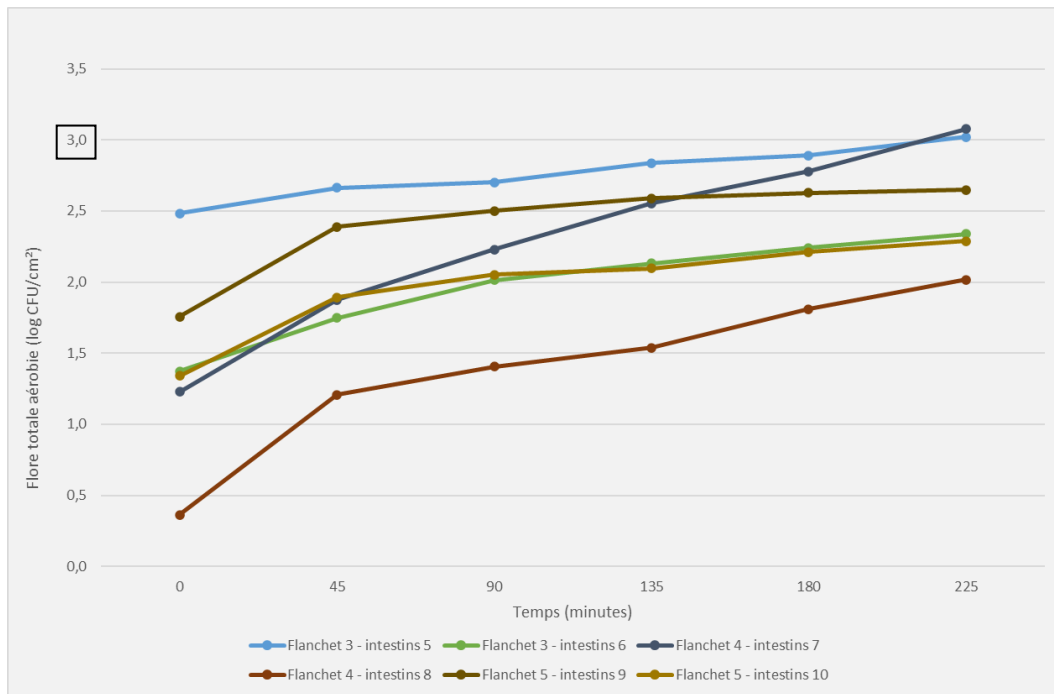


Figure 4.3. Evolution de la flore totale aérobie des échantillons issus du protocole *ex situ* au cours du temps
NB : la valeur encadrée correspond à la limite de satisfaction établie par l'AFSCA

4.5. Analyses statistiques

Les données, analysées avec la procédure MIXED du logiciel SAS/STAT 12.1, sont **les valeurs normalisées exprimées en log CFU/cm²** comme illustrées dans les graphiques ci-dessus. Ces derniers s'avèrent intéressants pour donner une première idée du comportement des données. Il est utile de rappeler que pour pouvoir interpréter des informations, il a été considéré que les boîtes ne contenant aucune colonie visible en contenaient en fait 0,5 (qui correspond à la moitié du seuil, soit 1 colonie). La surface d'écouvillonnage étant beaucoup plus large sur les flanchets à l'abattoir que sur les carcasses non éviscérées à la FEPEX explique pourquoi les valeurs de contamination de certains flanchets se situent en-dessous de celles des vaches de la FEPEX, alors que beaucoup de valeurs brutes issues de ces vaches étaient pourtant nulles (voir annexes).

4.5.1. Structures de corrélation

Comme mentionné au point 3.4.2, deux structures de corrélation ont été testées. Les modèles obtenus ont été comparés via le critère d'information d'Akaike (AIC), pour lequel des valeurs plus faibles correspondent à de meilleurs modèles. Le tableau 4.8 donne les résultats de ces comparaisons.

AIC	Autocorrélation	Symétrie composée
<i>E. coli</i>	88,5	119,3
<i>Enterobacteriaceae</i>	126,4	157,4
<i>Flore totale</i>	15,5	28,5

Tableau 4.8 : AIC pour les modèles testés

Il ressort de ce tableau que pour les 3 mesures, le modèle avec autocorrélation est préférable. Nous avons donc utilisé ce modèle par la suite. Pour nos données pour lesquelles les mesures successives sont prises à des intervalles réguliers, cela signifie que la corrélation entre résidus vaut :

$$r(e_{ijk}, e_{imk}) = \rho^{|j-m|}$$

où ρ est un paramètre à estimer. Dit autrement, la corrélation entre deux mesures prises à 45 minutes d'intervalle vaut ρ , celle entre deux mesures prises à 90 minutes d'intervalle vaut ρ^2 , etc...

Les (auto)corrélations estimées pour les 3 mesures sont données dans le tableau 4.9.

	ρ
<i>E. coli</i>	0,9277
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,8808
<i>Flore totale</i>	0,9227

Tableau 4.9. Coefficients d'autocorrélation pour les 3 mesures.

4.5.2. Régressions

Le tableau 4.10 présente les coefficients de régression des concentrations sur les différentes températures.

Il ressort de ce tableau que la température ambiante et la température intramusculaire ne semblent pas impacter les concentrations (du moins, dans l'étendue des valeurs observées pour ces deux paramètres). Par contre, la température intraabdominale (qui est plus variable dans les données) semble avoir un effet notamment pour les *Enterobacteriaceae*, et plus légèrement sur *E. coli* dont les concentrations semblent diminuer avec l'augmentation de la température (bêta négatif). Il a donc été proposé que cette température intraabdominale soit conservée dans le modèle final, et que les deux autres températures ne soient plus modélisées.

	β_a	$p(\beta_a > 0)$	β_{im}	$p(\beta_{aim} > 0)$	β_{ia}	$p(\beta_{ia} > 0)$
<i>E. coli</i>	-0,021	0,6964	-0,007	0,8164	-0,057	0,0257
<i>Enterobacteriaceae</i>	-0,028	0,6749	-0,027	0,4809	-0,117	0,0007
<i>Flore totale</i>	-0,026	0,4954	0,026	0,2005	-0,025	0,2020

Tableau 4.10. Coefficients de régression et valeurs p associées.

4.5.3. Facteurs de classification

Les facteurs temps, groupe et l'interaction groupe * temps (pour tester si l'effet du temps diffère entre les groupes) ont donc également été testés dans les modèles (tableau 4.11).

Valeurs p	Temps	Groupe	Temps* Groupe
<i>E. coli</i>	<,0001	0,3222	0,0060
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0932	0,0427	0,3781
<i>Flore totale</i>	<,0001	0,0100	0,9487

Tableau 4.11. Valeurs p des différents effets de classification.

En résumé, il y a un effet du temps (croissance) marqué pour *E. coli* et pour la flore totale aérobie, mais moins marqué pour les *Enterobacteriaceae*, qui ont effectivement un profil globalement plus « plat ». Les groupes sont peu distincts (mélangés) pour *E. coli* ($p > 0.05$), alors qu'ils apparaissent plus distinctement pour les deux autres mesures ($p < 0.05$). Enfin, il existe une interaction assez marquée pour *E. coli*, ce qui correspond sans doute à cette croissance importante observée dans les premières mesures pour des échantillons « Abattoir » alors que ce phénomène n'est pas apparent pour les échantillons « FEPEX ». Comme il s'agit sans doute de croissances artéfactuelles, cette analyse a été refaite en ne considérant pas la première mesure pour les données pour lesquelles cette mesure pourrait être faussée (flanchets 1 et 2 pour *E. coli* et *Enterobacteriaceae*, intestins 5 pour *E. coli*). Les résultats figurent dans le tableau 4.12.

Valeurs p	Temps	Groupe	Temps* Groupe
<i>E. coli</i>	<,0001	0,7740	0,4573
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0044	0,0094	0,4471

Tableau 4.12. Valeurs p des différents effets de classification après suppression des données artéfactuelles.

On peut voir que les effets du groupe et du temps apparaissent cette fois plus clairement pour les *Enterobacteriaceae*, et que l'interaction observée pour *E. coli* semblait effectivement bien provenir de ces données douteuses mesurées en T0.

En résumé, il a été proposé de :

- Modéliser les corrélations résiduelles par une autocorrélation,
- Ne régresser que sur la température intra-abdominale,
- D'exclure les données artéfactuelles en T0 de l'étude,
- De ne pas modéliser d'interaction Temps*Groupe, qui est non-significative.

Le modèle final utilisé est donc :

$$Y_{ijk} = \mu + \gamma_i + \tau_j + \beta_{ia} * Tia_{ijk} + e_{ijk}$$

dans lequel les résidus associés à un même individu sont supposés auto-corrélés.

Les résultats obtenus avec ce modèle sont présentés dans les tableaux qui suivent (tableaux 4.13 à 4.15). Le tableau 4.13 montre **une influence significative de l'effet du temps sur les contaminations bactériennes dans les trois groupes de bactéries étudiées, ainsi qu'une influence du groupe sur les concentrations en *Enterobacteriaceae* et flore totale. La température intra-abdominale influence également de manière significative les concentrations en *Enterobacteriaceae*.**

Le tableau 4.14 montre que **les augmentations importantes se situent entre T0 (0 minutes après abattage) et T2 (90 minutes après abattage), puis les concentrations tendent à se stabiliser pour atteindre un plateau.**

Le tableau 4.15 montre **des concentrations significativement plus élevées à l'abattoir qu'en ferme pour les *Enterobacteriaceae* et la flore totale, alors que la différence pour *E. coli* n'est pas significative au seuil $\alpha = 5\%$.**

Valeurs p	Temps	Groupe	T° IA
<i>E. coli</i>	<,0001	0,7393	0,0986
<i>Enterobacteriaceae</i>	0,0012	0,0115	0,0242
<i>Flore totale</i>	<,0001	0,0158	0,0994

Tableau 4.13. Valeurs p des différents effets de classification.

Différence	<i>E. coli</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>		Flore totale	
	Δ	$p(\Delta > 0)$	Δ	$p(\Delta > 0)$	Δ	$p(\Delta > 0)$
$T_1 - T_0$	0,3695	<,0001	0,2078	0,0002	0,5210	<,0001
$T_2 - T_1$	0,2379	0,0006	0,1378	0,0097	0,1570	0,0099
$T_3 - T_2$	0,1112	0,1103	0,1218	0,0296	0,0739	0,2391
$T_4 - T_3$	0,0697	0,3687	0,0240	0,6921	0,0666	0,3357
$T_5 - T_4$	0,1056	0,7393	0,0465	0,3378	0,0792	0,1568

Tableau 4.14. Différences entre temps et valeurs p associées

Différence	<i>E. coli</i>		<i>Enterobacteriaceae</i>		Flore totale	
	Δ	$p(\Delta > 0)$	Δ	$p(\Delta > 0)$	Δ	$p(\Delta > 0)$
<i>Abattoir - Fepex</i>	-0,0919	0,7393	1,2348	0,0115	0,7178	0,0158

Tableau 4.15. Différences entre groupes et valeurs p associées

4.6. PCR quantitative

Les résultats des cycles de seuil (CT)^{vii} ainsi que des conversions en nombre de copies d'ADN/cm² obtenus sont présentés dans le tableau 4.16.

Seuls les CT des dupliquats de produits d'extraction dilués 10 fois ont été utilisés. Beaucoup des CT des produits d'extraction purs présentaient des valeurs supérieures au contrôle négatif, ce qui témoigne de la présence d'inhibiteurs dans ces puits.

Les résultats de la PCR quantitative (qPCR) peuvent laisser croire à la présence de bactéries qui n'auraient pas été détectées par culture. Cependant il convient d'interpréter ces résultats avec prudence. La PCR quantitative et la culture sur gélose sont deux méthodes très différentes permettant de mettre en évidence la présence de bactéries ou de l'ADN de celles-ci sur des milieux. La qPCR permet la quantification du nombre de copies d'un segment du gène codant pour l'ARNr 16S présent chez toutes les bactéries. A la différence des cultures qui ont été effectuées dans la présente étude, celle-ci reflète la présence d'un gène présent chez toutes les bactéries, y compris celles qui ne se multiplient pas sur les milieux de culture utilisés (bactéries anaérobies strictes, psychrophiles ou thermophiles, mycoplasmes, par exemple). De plus, ce gène peut aussi être détecté si les bactéries ne sont plus viables. Cependant, il n'est pas possible de déterminer la charge bactérienne précise car les gènes ciblés peuvent être présents en plusieurs copies chez une même bactérie, le nombre de copies variant en fonction de la taille du génome et surtout de la vitesse de multiplication de la bactérie³⁹. De plus le standard est composé de produits de PCR et non d'ADN extrait, ce qui augmente l'efficacité de la PCR. Pour cette raison, il est davantage pertinent de l'utiliser dans ce cadre pour illustrer l'évolution des résultats aux différents temps plutôt que d'essayer d'en déduire une concentration précise de bactéries vivantes.

Considérant que la valeur du CT est inversement proportionnelle à la quantité d'ADN contenue dans les échantillons, on constate étonnement que T0 présente dans tous les cas (sauf T1 de la vache 2) la valeur CT la plus basse. Il faut aussi remarquer que les deux prélèvements réalisés à T6 sur l'autre flanc donnent des résultats similaires aux T0 par qPCR. En revanche, ils ne vont pas dans le sens des résultats des dénombrements PCA pour lesquels T0 et T6 représentaient les valeurs LOG de colonies les plus basses. On pourrait, sur base de ces observations, émettre l'hypothèse de la présence de bactéries (vivantes ou non) non détectées par culture à la surface du muscle avant l'ouverture de la cavité abdominale. La première action abrasive de l'éponge aurait contribué à supprimer ces sources d'ADN provenant sans doute majoritairement de bactéries anaérobies, tandis que l'ouverture réalisée présentait une voie d'entrée pour les bactéries aérobies présentes dans l'air ambiant, qui ont plutôt eu tendance à augmenter légèrement après T0.

Dans tous les cas, les CT moyens et les LOG du nombre de copies d'ADNr 16S varient peu entre les échantillons de temps différents et semblent très stables avec le temps.

^{vii} Nombre de cycles nécessaires pour atteindre une valeur seuil de fluorescence

Vache	Temps	CT moyen	Résultats qPCR (log nombre de copies d'ADNr 16S/cm ²)	Résultats dénombrements PCA (log CFU/cm ²)
Vache 1	T0	19,41	6,4	0,78
	T1	20,07	6,2	0,95
	T2	21,35	5,8	0,18
	T3	21,26	5,9	0,93
	T4	21,28	5,9	0,93
	T5	21,80	5,7	0,65
Vache 2	T0	20,07	6,5	0,30
	T1	20,25	6,6	1,04
	T2	20,70	6,3	1,55
	T3	21,37	6,2	0,60
	T4	20,23	6,5	0,88
	T5	20,58	6,4	0,98
Vache 3	T0	19,10	6,3	0,92
	T1	20,13	6,0	1,00
	T2	20,28	5,9	1,12
	T3	20,00	6,0	1,22
	T4	21,31	5,6	1,46
	T5	20,99	5,7	1,34
Vache 4	T0	18,40	6,9	1,12
	T1	18,93	6,8	1,00
	T2	20,82	6,2	1,03
	T3	21,18	6,1	1,00
	T4	21,32	6,1	1,15
	T5	22,15	5,8	0,88
	T6*	18,90	6,8	-0,08
Vache 5	T0	18,19	7,2	0,22
	T1	21,81	6,3	1,37
	T2	20,39	6,6	0,52
	T3	21,20	6,4	0,62
	T4	21,33	6,4	1,34
	T5	20,94	6,5	0,88
	T6*	18,21	7,2	0,40

Tableau 4.16. Tableau comparatif des bactéries obtenus après qPCR et après dénombrement sur milieu PCA

Note : les résultats des deux dernières colonnes sont ici exprimés sans addition des contaminations des temps précédents

* T6 correspond à un premier prélèvement réalisé dans l'autre flanc et pas à un 7^{ème} prélèvement.

5) Discussion

5.1. Les protocoles employés

Le projet a utilisé deux protocoles distincts. Un protocole *ex situ* plus facile et moins onéreux à mettre en œuvre, ainsi qu'un protocole *in situ* qui s'est voulu plus proche de la réalité de terrain pour venir compléter les résultats du premier.

Les résultats de l'analyse statistique indiquent une influence du groupe (*in situ* ou *ex situ*) sur les concentrations en *Enterobacteriaceae* et en flore totale, avec des concentrations significativement plus élevées en abattoir qu'à la FEPEX. Ceci confirme que le protocole *in situ* permet de travailler dans des conditions moins contaminées et plus proches d'une situation réelle, et que le protocole *ex situ* pourrait difficilement se substituer au protocole *in situ* pour des expériences similaires. Il convient néanmoins de noter une certaine confusion entre le site d'abattage et le type d'échantillon (vache ou paire flanchet-intestins). Par conséquent, il n'est pas possible de conclure avec certitude à un effet du site d'abattage car la présence d'une différence entre « FEPEX » et « Abattoir » n'indique pas nécessairement une différence entre les deux sites. En effet, la différence pourrait être due à une différence entre les deux types d'échantillons étant donné que les races ainsi que la finalité des bovins utilisés dans les deux groupes n'étaient pas les mêmes. De fait, les vaches utilisées pour le protocole *ex situ* étaient des BBB à finalité viandeuse tandis que les vaches du protocole *in situ* étaient des laitières de réforme. Il est établi que des facteurs intrinsèques comme la génétique, l'âge et le sexe influencent la composition du microbiote⁴⁰. Des facteurs extrinsèques, principalement l'alimentation qui varie en termes de rapport concentrés/fourrages chez les laitières et viandeuses, influencent également significativement les populations bactériennes contenues dans le tube digestif⁴¹. Le fait qu'une variation de la flore intestinale influence le phénomène de translocation bactérienne chez les ruminants reste hypothétique. Selon Wiest et al.⁴², en médecine humaine, certaines bactéries présentent en effet plus de facilité à transloquer que d'autres, comme les bactéries pathogènes intracellulaires facultatives (espèces *Salmonella*) ou certaines entérobactéries (*E. coli*, entérocoques, streptocoques,...).

5.2. Peut-on croire à un effet de translocation bactérienne s'amplifiant avec le temps ?

Les résultats obtenus au cours de cette étude ne mettent pas en évidence un phénomène de translocation bactérienne. Plusieurs observations confortent cette affirmation.

Il convient en premier lieu de se concentrer sur l'évolution des contaminations pour les trois catégories de flores bactériennes étudiées, qui tend à atteindre un plateau à partir des derniers prélèvements. Cette tendance s'illustre au travers des différents graphiques présentés au point 4.4, mais également à la lecture des deltas de plusieurs échantillons^{VIII} (présentés en annexe) dont

^{VIII} Les deltas correspondent à la différence logarithmique de la population des microorganismes à deux temps

l'analyse statistique montre que les augmentations importantes se situent entre T0 (0 minutes après abattage) et T2 (90 minutes après abattage).

Un « relargage » des bactéries depuis le tractus intestinal vers la cavité péritonéale aurait donné lieu à une courbe de contamination suivant une cinétique différente, exponentielle. Nous aurions assisté à une augmentation soudaine, rapide et continue des contaminations, et non à un ralentissement de celles-ci avec le temps. De plus, le milieu intestinal étant très chargé en bactéries étudiées, les valeurs de cfu/cm² obtenues auraient été bien supérieures. Dans le cas présent, la quasi-totalité des échantillons se sont trouvés sous le seuil de satisfaction imposé par l'AFSCA. Dans le cadre du *protocole ex situ*, nos observations laissent supposer la présence de contaminations superficielles initiales et inévitables dans les conditions dans lesquelles il a été conçu. Il semblerait ensuite que l'action de frottement de l'éponge abrasive ait rapidement « raclé » la majorité des micro-organismes en surface, limitant la multiplication par la suite. L'influence significative de l'effet du temps sur les trois catégories de bactéries serait donc plutôt attribuable à ces contaminations extérieures qu'à un phénomène de translocation. Comme le modèle a montré qu'il n'existait pas d'interaction entre le temps et le groupe et que les données issues des deux protocoles ont été mélangées, le même effet a été rapporté avec le protocole *in situ*. Cependant, il convient de garder à l'esprit d'une part que le nombre d'échantillons du protocole *ex situ* était double par rapport à celui de *in situ*, dans lequel les valeurs d'un ou deux bovins ont pu biaiser l'analyse par l'effet de faible effectif, et d'autre part que la valeur seuil de dénombrement n'était pas identique dans les deux groupes (en raison de la différence dans la surface écouvillonnée).

En deuxième lieu, les résultats individuels à la fois des cultures sur gélose et de la PCR restent très stables au cours du temps et n'indiquent pas non plus de moment de rupture à un moment donné. Il est d'ailleurs fréquent de retrouver davantage de contaminations à T1 - T2 qu'à T4 - T5, ce qui conforte l'hypothèse que les contaminations proviennent majoritairement des manipulations inhérentes aux protocoles.

Dans le protocole *in situ*, le prélèvement au temps « T6 » réalisé sur deux bovins illustre la quasi-stérilité (aérobie) du muscle 4 heures après l'abattage, muscle exempt de tout biais liés aux différents prélèvements. Il convient néanmoins d'interpréter ces résultats avec précaution, car le flanc gauche écouvillonné au T6 n'était pas en contact avec les mêmes structures que le flanc droit. En effet, le flanc gauche est majoritairement en contact avec le rumen tandis que le flanc droit soutient majoritairement les intestins. Pour les mêmes raisons que celles citées au point 3.1.1 (a : prélèvement des organes), les bactéries sont sans doute moins susceptibles de transloquer depuis le rumen que les intestins.

5.3. *Y a -t-il un effet de la température sur les contaminations ?*

Après la mort, diverses réactions se produisent au sein de la carcasse d'un bovin. Normalement, la température du corps augmente rapidement, car la fermentation du rumen et des intestins se poursuit et les enzymes contribuent à la libération d'énergie⁴³. Ce phénomène n'a pas été constaté dans les expériences précédentes, mais ce résultat s'explique aisément par le fait que les différentes structures n'étaient pas enfermées hermétiquement dans la cavité abdominale. Avec les réactions enzymatiques *post-mortem* s'accompagnent un gonflement abdominal. A l'heure actuelle, on ignore si l'effet du gonflement est susceptible d'influencer la translocation bactérienne, bien que cela constitue une des craintes en cas d'éviscération différée⁴⁴. Bien qu'aucun effet de la température extérieure n'ait été mis en évidence dans le modèle statistique,

des données empiriques laissent à penser que des températures extérieures élevées accélèreraient le processus de gonflement et également la température intra-abdominale. Bien que les prélèvements aient été étalés sur trois mois, la gamme des températures extérieures n'était pas très étendue (souvent comprises entre 10 et 15 °C). Ce manque de variations entre journées de prélèvements peut expliquer le fait qu'aucun effet de la température extérieure n'ait été constaté. Il convient de noter que même si les températures n'ont pas été très élevées, cela n'a pas empêché les carcasses de gonfler lors des expériences à la FEPEX. Bien que ce paramètre n'ait pas été précisément mesuré, l'opérateur a pu le ressentir au travers de la difficulté à effectuer les derniers prélèvements en raison de la diminution, avec le temps, de l'espace entre les intestins et la paroi musculaire.

L'analyse statistique n'a pas mis en évidence d'effet significatif de la température intramusculaire sur le nombre de bactéries. Néanmoins, un effet significatif de la température intra-abdominale sur les *Enterobacteriaceae* et plus légèrement sur *E. coli* a été trouvé, dont les valeurs semblent diminuer avec l'augmentation de la température. Cet effet étonnant n'est sans doute pas attribuable à la température intra-abdominale directement, mais plutôt au fait que les contaminations extérieures majeures aient eu lieu lors des premiers prélèvements, au moment où les températures intra-abdominales étaient aussi les plus élevées.

5.4. Limites de l'étude

La présente étude a été conduite pendant une période limitée. Une des limites principales qui en découle est de ne pas avoir pu la poursuivre en conditions météorologiques plus chaudes, les températures extérieures lors des prélèvements à la FEPEX n'ayant jamais excédé 15 °C. Nous sommes actuellement confrontés à des étés de plus en plus chauds et l'abattage à la ferme représente une belle opportunité d'éviter de transporter des animaux vivants dans ces conditions éprouvantes. Toutefois, ne connaissant pas réellement l'impact de températures plus hautes sur le risque de contaminations microbiennes mais sachant que le phénomène d'autolyse augmente avec celles-ci⁴⁵, des recherches plus approfondies en ferme(s) seraient nécessaires.

Une autre limite de l'étude est d'avoir restreint les expérimentations *in situ* aux vaches laitières. Le microbiote est un ensemble complexe qui diffère entre individus de même espèce (notamment en fonction de la race, de l'âge, du sexe, de l'alimentation, etc.) mais assurément aussi entre individus d'espèces différentes. L'abattage à la ferme est autorisée pour les espèces bovines (autres que bisons), porcines et solipèdes. Selon l'enquête citée au point 2.1, la majorité des Etats-membres est également favorable à l'ouverture de la pratique aux ovins. Des études liant la composition du microbiote et les probabilités de translocation bactérienne seraient pertinentes en ce sens. D'ici là, des prélèvements semblables à ceux réalisés dans le protocole *in situ* étendus à d'autres profils d'animaux permettraient d'apporter des preuves supplémentaires rassurantes.

Enfin, l'objectif de la présente étude étant d'apporter des preuves préliminaires que la viande issue d'un bovin abattu à la ferme et supposément transporté dans les deux heures à l'abattoir est saine d'un point de vue microbiologique, nous ignorons encore à partir de quel moment *post-mortem* la translocation des bactéries débiterait. Comme les résultats des dénombrements de bactéries tendent à atteindre un plateau avec le temps, il n'a pas été possible de prédire statistiquement de moment « de rupture ». Pour définir cela, il serait pertinent de reproduire les expériences réalisées en écouvillonnant des carcasses sur une plus large portée de temps.

6) Recommandations

L'objectif de la présente étude était d'apporter des éléments factuels et des preuves scientifiques dans la perspective d'une reconsidération du délai entre mise à mort et éviscération lors d'abattage à la ferme. Si ces expériences ont été menées dans un temps et avec un budget limité, elles amènent néanmoins des éléments préliminaires en faveur d'un allongement de ce délai sans conséquences négatives pour la santé publique. De plus, ces preuves viennent compléter d'une part les résultats de différentes études réalisées par le passé, d'autre part les témoignages d'acteurs qui ont déjà pris part à l'abattage à la ferme dans leur pays. Considérant que ces témoignages constituent des sources d'informations pertinentes et qu'il serait important de les intégrer aux résultats de ce rapport, il serait intéressant d'amener nos autorités sanitaires à discuter du sujet avec leurs homologues allemands, et à organiser dans ce sens un colloque permettant de les réunir.

L'abattage à la ferme devient depuis quelque temps un sujet d'intérêt au niveau européen. Il en a récemment été question lors d'une table ronde politique portant sur la réforme du règlement transport, et plusieurs Etats-membres ont exprimé leur intérêt pour l'étude menée en Wallonie. L'introduction de ce rapport fait aussi mention d'une volonté d'une majorité des Etats-membres à établir un délai saignée-éviscération précis au niveau européen. Un objectif à long terme serait de fournir davantage de résultats provenant de pays et de laboratoires différents pour que d'ici quelques années, l'EFSA les globalise et émette ses propres recommandations à l'international.

Il convient dès à présent de solliciter le comité scientifique de l'AFSCA et de lui présenter les résultats de la présente étude. L'équipe de recherche restera à disposition de la Région pour apporter toutes les informations nécessaires, mais il convient de préciser que ce sont les ministres régionaux qui doivent saisir le comité scientifique à travers une demande auprès de l'Administrateur Délégué, qui va relayer la même demande auprès du comité scientifique. Il s'agira-là d'une validation à la fois du protocole expérimental et des résultats générés par celui-ci. Le risque étant, dans ce cas-là, de devoir revoir le protocole (si le comité scientifique émet des remarques négatives à ce propos) et de recommencer l'expérience ou de la compléter pour pouvoir disposer de résultats additionnels. Il n'est pas non plus exclu que le délai de réponse du comité scientifique soit assez long (un comité de travail sera désigné et il faudra des réunions qui devront être organisées). Le délai de réponse peut prendre de 6 mois à 1 an. Il faut préciser également que le comité scientifique dispose d'une compétence d'avis et que l'AFSCA n'est pas obligée de suivre *sensu stricto* les recommandations de celui-ci. Si le comité scientifique émet un avis favorable quant à la prolongation du délai entre saignée et éviscération, il faudra aussi que l'AFSCA puisse modifier la circulaire sur les abattages à la ferme. En attendant, des discussions avec l'AFSCA pourraient amener à leur faire autoriser l'abattage sous réserve que des analyses soient réalisées en cas de dépassement du délai, comme c'est le cas en abattoir fixe⁴⁶.

Il convient de tenir compte que la présente étude s'est concentrée sur les qualités microbiologiques des viandes issues de bovins pour lesquelles l'éviscération a été différée par rapport à la saignée. Dans ces cas précis, il ne faut pas négliger qu'il est aussi à craindre des impacts sur les qualités organoleptiques des viandes. Dans son rapport publié en 2022, le comité scientifique de l'AFSCA cite : « *Selon l'ANSES, une éviscération tardive peut entraîner une coloration terne, grisâtre ou gris brun de la séreuse péritonéale. Cette couleur anormale s'accompagne d'une odeur désagréable liée à la propagation de gaz intestinaux.* » A nouveau, nous ignorons à partir de

quel délai ces modifications apparaissent. Elles n'ont en tout cas pas été constatées par les opérateurs dans le cadre des présentes expériences, mais devraient dans le futur faire l'objet de considérations plus importantes. Il convient aussi de noter que si les prélèvements ont été réalisés jusque 4h *post-mortem* dans le cadre de nos expérimentations, le transport des bovins abattus à la ferme vers l'abattoir excédera très rarement une heure et demie en Wallonie.

La mise en place d'un projet-pilote en Wallonie permettrait de poursuivre les études déjà réalisées et de combler une partie des manques cités ci-dessus en mettant en place un suivi sanitaire et organoleptique des carcasses dans les premiers mois d'abattage. A cette fin, un appel à volontaires permettrait d'attirer des éleveurs prêts à s'engager et d'avoir une idée des abattoirs fixes qui seraient prêts à les suivre dans ces démarches. Un nouveau financement pourrait être apporté, destiné à couvrir les frais liés aux analyses microbiologiques et à l'achat d'UMA. Un tel projet est déjà en phase de concrétisation côté flamand, et différents partenaires se sont déjà associés. Le groupe de travail flamand est aussi en attente d'un déblocage du côté de l'AFSCA avant de lancer les premiers abattages. Il serait évidemment enrichissant d'établir une collaboration entre acteurs wallons et flamands, afin de compiler les futurs résultats.

Etant donné la finalité de l'étude qui est d'assurer le bon fonctionnement des éventuels abattages à la ferme en Wallonie, il convient aussi dans le futur de se concentrer sur l'aspect bien-être animal, capital pour sa mise en place. Des recommandations précises avaient déjà été publiées à la suite de projets-pilotes en Allemagne, et devraient être prises en compte dans les abattages futurs. Des critères relatifs au bien-être animal comme la qualité de l'étourdissement mais également des évaluations pré-abattage devraient faire l'objet d'une formation, d'un suivi et de contrôles au même titre que les aspects sanitaires. Nous avons par exemple pu constater que l'étourdissement à la ferme sans dispositif de contention autre qu'un licol demande davantage de dextérité afin de viser au moment auquel l'animal ne bouge pas. Cela souligne la pertinence de l'utilisation d'une UMA dans laquelle un dispositif de contention serait intégré (voir rapport 1). Pour les animaux de nature plus sauvage, il faudrait sérieusement envisager d'utiliser une arme à feu comme moyen d'étourdissement, pour la sécurité des hommes comme des animaux. L'AFSCA n'ayant pas mentionné d'exigences concernant la méthode d'étourdissement dans sa circulaire, il serait également intéressant d'en discuter avec elle. A nouveau, des éleveurs pratiquant le tir au pré pourraient être invités à témoigner, tout comme des vétérinaires ayant l'habitude d'être présents sur place lors de ces événements.

Outre l'aspect bien-être, l'aspect pratique devra aussi être évalué dans un projet-pilote. Nous avons constaté qu'il peut être compliqué de trouver un compromis entre rapidité de saignée, sécurité humaine et sécurité alimentaire. De fait, les bonnes pratiques requièrent de pratiquer la saignée thoracique^{ix}, mais elles recommandent également de la réaliser dans les plus brefs délais. L'accès au cœur est plus compliqué que celui au cou sans matériel adapté et dépend de la façon dont le bovin s'écroule après l'étourdissement.

Cependant il reste un autre frein assez important à lever et qui avait également été pointé lors de la première étude. En effet, le texte européen précise que l'unité mobile d'abattage doit « *faire partie d'un abattoir agréé par l'autorité compétente* ». Selon l'interprétation de l'AFSCA, cela signifie que les UMA doivent être reprises dans l'agrément d'un abattoir agréé et que son système d'autocontrôle doit couvrir le fonctionnement de l'UMA. Cette mesure décourage la majorité des abattoirs wallons à collaborer avec des éleveurs désireux d'abattre leurs animaux à la ferme. De

^{ix} La saignée thoracique, ou la saignée « au cœur » consiste à sectionner les plus gros vaisseaux présents à la base du cœur (tronc brachio-céphalique et veine cave antérieure). Elle se pratique en réalisant une incision à l'entrée du sternum, le couteau dirigé vers l'entrée de la poitrine.

fait, un problème provenant d'un abattage à la ferme risquerait de menacer toutes les activités de l'entreprise (ex : perte de la validation du système d'autocontrôle voire perte de l'agrément). Ces derniers, pourtant pour la plupart non opposés au principe d'abattage à la ferme, souhaiteraient un éclaircissement au niveau de l'interprétation européenne du texte, prônant davantage un fonctionnement équivalent à celui d'une activité agréée complémentaire à celle de l'abattoir mais indépendante des activités de celui-ci, à l'image des autorisations spéciales pour le transport à chaud des carcasses⁴⁷.

En janvier 2023, nous avons été contactés par la FEBEV^x pour discuter de l'avancement des travaux et des problèmes liés à la mise en place de l'abattage à la ferme. Celle-ci avait questionné l'AFSCA sur la possibilité d'un statut de l'abattage à la ferme similaire à celui du transport à chaud des carcasses, mais s'était vu refuser toute autre forme d'interprétation par l'Agence. Il serait pertinent à ce stade qu'un cabinet ministériel interpelle directement la commission européenne pour demander l'interprétation précise de l'exigence européenne.

^x Fédération belge de la viande

7) Conclusion

La présente étude avait pour objectif d'étudier la cinétique de la contamination bactérienne à la surface de muscles, en contact avec les intestins, de bovins abattus et non éviscérés. Ceci pour mimer les conditions d'abattage à la ferme lors desquelles l'éviscération serait inévitablement différée de la saignée des animaux.

Au terme de celle-ci, aucun élément ne vient confirmer l'hypothèse d'un phénomène de translocation bactérienne depuis les intestins vers la paroi musculaire dans les quatre heures *post-mortem*.

D'un point de vue microbiologique, les différents résultats obtenus indiquent que la consommation d'une viande issue d'un bovin qui aurait été abattu à la ferme ne présente pas de risques accrus pour la santé humaine, mais ceci devrait être confirmé par de nouveaux résultats d'écouvillonnage réalisés pendant les mois d'été et pendant des périodes de canicule .

En plus de discussions avec les autorités sanitaires qui seront à initier pour discuter du délai actuellement imposé en Belgique et son éventuel allongement, la présente étude a souligné la nécessité d'études additionnelles visant à compléter les résultats de celle-ci en élargissant les profils d'animaux étudiés et les conditions dans lesquelles se déroulent les prélèvements (en termes de température principalement).

Les protocoles de type *ex situ* étant inévitablement soumis à nombreux biais, la mise en place d'un projet-pilote d'abattage à la ferme accompagné d'un suivi sanitaire et organoleptique des viandes, ainsi que d'un suivi relatif au bien-être animal et aux questions organisationnelles serait pertinent et permettrait de répondre parfaitement à la demande de nombreux éleveurs.

Néanmoins, cette étude constitue une bonne base pour la concrétisation de futurs projets d'abattage à la ferme.

8) Annexes

Les tableaux présentés dans les pages qui suivent correspondent aux feuilles de calculs dans lesquelles, à partir des résultats bruts obtenus aux dénombrements, ont été définies les valeurs en log cfu/cm² pour *E. coli*, *Enterobacteriaceae* et flore totale aérobie des différents échantillons.

Note : lorsque le nombre de colonies excédait 300 sur les boîtes de Pétri, celles-ci étaient considérées comme incomptables.

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,25	-0,60	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,50	-0,30	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,75	-0,12	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,00	0,00	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,25	0,10	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,50	0,18	0,08
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,03	-1,60	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,05	-1,30	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,08	-1,12	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,10	-1,00	0,12
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,13	-0,90	0,10
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,15	-0,82	0,08
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,25	-0,60	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,5	-0,30	0,30
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,75	-0,12	0,18
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1	0,00	0,12
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,25	0,10	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,5	0,18	0,08
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,03	-1,60	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,05	-1,30	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,08	-1,12	0,18
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	4	4	4	400	0,2	0,28	-0,56	0,56
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,30	-0,52	0,04
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,33	-0,49	0,03
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	12	12	120	400	6	6	0,78	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	18	18	180	400	9	15	1,18	0,40
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	3	3	30	400	1,5	16,5	1,22	0,04
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	17	17	170	400	8,5	25	1,40	0,18
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	17	17	170	400	8,5	33,5	1,53	0,13
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	9	9	90	400	4,5	38	1,58	0,05
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	76	76	76	400	3,8	3,75	0,57	
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	85	85	85	400	4,25	8	0,90	0,33
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	67	67	67	400	3,35	11,35	1,05	0,15
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	121	121	121	400	6,05	17,4	1,24	0,19
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	133	133	133	400	6,65	24,05	1,38	0,14
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	70	70	70	400	3,5	27,55	1,44	0,06

Annexe 1 - Feuille de calcul pour la vache 1 issue du protocole *in situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,25	-0,60	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,50	-0,30	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,75	-0,12	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,00	0,00	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,25	0,10	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,50	0,18	0,08
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,03	-1,60	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1	1	1	400	0,05	0,08	-1,12	0,48
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	2	2	2	400	0,1	0,18	-0,76	0,37
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,20	-0,70	0,06
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,23	-0,65	0,05
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,25	-0,60	0,05
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,25	-0,60	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,5	-0,30	0,30
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	0,75	-0,12	0,18
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1	0,00	0,12
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,25	0,10	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	400	0,25	1,5	0,18	0,08
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,03	-1,60	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,05	-1,30	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1	1	1	400	0,05	0,10	-1,00	0,30
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,13	-0,90	0,10
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,15	-0,82	0,08
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	400	0,025	0,18	-0,76	0,07
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	4	4	40	400	2	2	0,30	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	22	22	220	400	11	13	1,11	0,81
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	71	71	710	400	35,5	48,5	1,69	0,57
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	8	8	80	400	4	52,5	1,72	0,03
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	15	15	150	400	7,5	60	1,78	0,06
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	19	19	190	400	9,5	69,5	1,84	0,06
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	12	12	12	400	0,6	0,6	-0,22	
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	112	112	112	400	5,6	6,2	0,79	1,01
T2	PCA	Profondeur	Secteur 4	34	34	1890	400	94,5	100,7	2,00	1,21
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	45	45	45	400	2,25	102,95	2,01	0,01
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	111	111	111	400	5,55	108,5	2,04	0,02
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	151	151	151	400	7,55	116,05	2,06	0,03

Annexe 2 - Feuille de calcul pour la vache 2 issue du protocole *in situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	10	10	100	240	8,33	8,33	0,92	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	12	12	120	240	10,00	18,33	1,26	0,34
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	16	16	160	240	13,33	31,67	1,50	0,24
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	20	20	200	240	16,67	48,33	1,68	0,18
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	35	35	350	240	29,17	77,50	1,89	0,21
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	26	26	260	240	21,67	99,17	2,00	0,11
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	99	99	99	240	8,25	3,75	0,57	
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	50	50	50	240	4,17	7,92	0,90	0,32
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	82	82	82	240	6,83	14,75	1,17	0,27
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	>300	>300	300	240	25,00	39,75	1,60	0,43
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	300	300	300	240	25,00	64,75	1,81	0,21
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	123	123	123	240	10,25	75,00	1,88	0,06

Annexe 3 - Feuille de calcul pour la vache 3 issue du protocole *in situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T6	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417			
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T6	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042			
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T6	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417			
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T6	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042			
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	16	16	160	240	13,33	13,33	1,12	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	12	12	120	240	10,00	23,33	1,37	0,24
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	13	13	130	240	10,83	34,17	1,53	0,17
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	12	12	120	240	10,00	44,17	1,65	0,11
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	17	17	170	240	14,17	58,33	1,77	0,12
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	9	9	90	240	7,50	65,83	1,82	0,05
T6	PCA	Surface	Toute la boîte	1	1	10	240	0,83			
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	24	24	24	240	2,00	3,75	0,57	
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	192	192	192	240	16,00	19,75	1,30	0,72
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	272	272	272	240	22,67	42,42	1,63	0,33
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	156	156	156	240	13,00	55,42	1,74	0,12
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	148	148	148	240	12,33	67,75	1,83	0,09
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	36	36	36	240	3,00	70,75	1,85	0,02
T6	PCA	Profondeur	Toute la boîte	32	32	32	240	2,67	73,42		

Annexe 4 - Feuille de calcul pour la vache 4 issue du protocole *in situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T6	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417			
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T6	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042			
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,42	-0,38	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	0,83	-0,08	0,30
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,25	0,10	0,18
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	1,67	0,22	0,12
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,08	0,32	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417	2,50	0,40	0,08
T6	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	240	0,417			
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,04	-1,38	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,08	-1,08	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,13	-0,90	0,18
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,17	-0,78	0,12
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,21	-0,68	0,10
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042	0,25	-0,60	0,08
T6	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	240	0,042			
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	2	2	20	240	1,67	1,67	0,22	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	28	28	280	240	23,33	25,00	1,40	1,18
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	4	4	40	240	3,33	28,33	1,45	0,05
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	5	5	50	240	4,17	32,50	1,51	0,06
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	26	26	260	240	21,67	54,17	1,73	0,22
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	9	9	90	240	7,50	61,67	1,79	0,06
T6	PCA	Surface	Toute la boîte	3	3	30	240	2,50			
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	14	14	14	240	1,17	3,75	0,57	
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	25	25	25	240	2,08	5,83	0,77	0,19
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	102	102	102	240	8,50	14,33	1,16	0,39
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	240 /	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	104	104	104	240	8,67	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	78	78	78	240	6,50	/	/	/
T6	PCA	Profondeur	Toute la boîte	20	20	20	240	1,67			

Annexe 5 - Feuille de calcul pour la vache 5 issue du protocole *in situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm²)	CFU/cm²	CFU total /cm²	Log CFU total/cm²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	933	0,11	0,11	-0,97	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	933	0,21	0,32	-0,49	0,48
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	6	6	60	933	1,29	1,61	0,21	0,70
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	13	13	130	933	2,79	4,40	0,64	0,44
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	7	7	70	933	1,50	5,90	0,77	0,13
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	16	16	160	933	3,43	9,33	0,97	0,20
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	933	0,01	0,01	-1,97	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	22	22	22	933	0,47	0,48	-0,32	1,65
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	44	44	44	933	0,94	1,43	0,15	0,47
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	46	46	46	933	0,99	2,41	0,38	0,23
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	42	42	42	933	0,90	3,31	0,52	0,14
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	80	80	80	933	1,72	5,03	0,70	0,18
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	933	0,11	0,11	-0,97	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	2	2	20	933	0,43	0,54	-0,27	0,70
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	12	12	120	933	2,57	3,11	0,49	0,76
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	7	7	70	933	1,50	4,61	0,66	0,17
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	37	37	370	933	7,93	12,54	1,10	0,43
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	60	60	600	933	12,87	25,41	1,40	0,31
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1	1	1	933	0,02	0,02	-1,67	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	45	45	45	933	0,96	0,99	-0,01	1,66
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	76	76	76	933	1,63	2,62	0,42	0,42
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	63	63	63	933	1,35	3,97	0,60	0,18
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	57	57	57	933	1,22	5,19	0,72	0,12
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	86	86	86	933	1,84	7,03	0,85	0,13
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	933	/	/	/	/

Annexe 6 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 1-intestins 1 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm²)	CFU/cm²	CFU total /cm²	Log CFU total/cm²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	980	0,10	0,10	-0,99	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	5	23	230	980	4,69	4,80	0,68	1,67
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	12	23	230	980	4,69	9,49	0,98	0,30
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	28	33	330	980	6,73	16,22	1,21	0,23
T4 (3h)	TBX	Surface	72h: secteur 5 zone B	94		920	980	18,78	35,00	1,54	0,33
T5 (3h45)	TBX	Surface	72h: secteur 4	84		156	980	3,18	38,18	1,58	0,04
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	980	0,010	0,01	-1,99	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	32	32	32	980	0,653	0,66	-0,18	1,81
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	19	19	19	980	0,388	1,05	0,02	0,20
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	54	54	54	980	1,102	2,15	0,33	0,31
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	41	41	41	980	0,837	2,99	0,48	0,14
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	46	46	46	980	0,939	3,93	0,59	0,12
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	980	0,10	0,10	-0,99	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	12	12	120	980	2,45	2,55	0,41	1,40
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	18	18	180	980	3,67	6,22	0,79	0,39
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	42	42	420	980	8,57	14,80	1,17	0,38
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	106	106	1060	980	21,63	36,43	1,56	0,39
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	124	124	1240	980	25,31	61,73	1,79	0,23
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	5	980	0,10	0,03	-1,60	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	68	68	68	980	1,39	1,41	0,15	1,75
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	34	34	34	980	0,69	2,11	0,32	0,17
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	252	252	252	980	5,14	7,25	0,86	0,54
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Secteur 4	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable /	/	/	/	/	/	/	/

Annexe 7 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 1-intestins 2 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	742	0,13	0,13	-0,87	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	0,40	-0,39	0,48
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	0,67	-0,17	0,22
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	0,94	-0,03	0,15
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	1,21	0,08	0,11
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	1,48	0,17	0,09
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	0,5	0,5	742	0,01	0,01	-1,87	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	7	7	7	742	0,19	0,20	-0,69	1,18
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	10	10	10	742	0,27	0,47	-0,33	0,37
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	16	16	16	742	0,43	0,90	-0,04	0,28
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	13	13	13	742	0,35	1,25	0,10	0,14
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	29	29	29	742	0,78	2,04	0,31	0,21
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	742	0,13	0,13	-0,87	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	0,40	-0,39	0,48
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	742	0,13	0,54	-0,27	0,12
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	2	2	20	742	0,54	1,08	0,03	0,30
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	1	1	10	742	0,27	1,35	0,13	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	5	5	50	742	1,35	2,70	0,43	0,30
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0	0,5	742	0,01	0,01	-1,87	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	6	6	6	742	0,16	0,18	-0,76	1,11
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	12	12	12	742	0,32	0,50	-0,30	0,45
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	16	16	16	742	0,43	0,93	-0,03	0,27
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	25	25	25	742	0,67	1,60	0,21	0,24
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	34	34	34	742	0,92	2,52	0,40	0,20
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	67	67	670	742	18,06	18,06	1,26	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	61	61	610	742	16,44	34,50	1,54	0,28
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	89	89	890	742	23,99	58,49	1,77	0,23
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	742	/	/	/	/

Annexe 8 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 2-intestins 3 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0	0,5	5	1149,5	0,09	0,09	-1,06	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Zone 4	23	23	1220	1149,5	21,23	21,31	1,33	2,39
T2 (1h30)	TBX	Surface	Zone 4	24	24	1220	1149,5	21,23	42,54	1,63	0,30
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	70	70	700	1149,5	12,18	54,72	1,74	0,11
T4 (3h)	TBX	Surface	zone 3	28	28	2760	1149,5	48,02	102,74	2,01	0,27
T5 (3h45)	TBX	Surface	Zone 1	30	30	15000	1149,5	260,98	363,72	2,56	0,55
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0	1	1		0,017	0,02	-1,76	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0	0,5	0,5	1149,5	0,01	0,01	-2,06	
T1	VRBG	Surface	zone 4	26	1440	1440	1149,5	25,05	25,06	1,40	3,46
T2	VRBG	Surface	zone 6	23	1330	1330	1149,5	23,14	48,20	1,68	0,28
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	86	860	860	1149,5	14,96	63,17	1,80	0,12
T4	VRBG	Surface	zone 3	23	2370	2370	1149,5	41,24	104,40	2,02	0,22
T5	VRBG	Surface	zone 2	43	8140	8140	1149,5	141,63	246,03	2,39	0,37
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0	0	0		0,00	0,03	-1,60	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	38	38	380		6,61	6,6	0,82	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Secteur 4	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/		/	/	/	/

Annexe 9 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 2-intestins 4 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	434	0,23	0,23	-0,64	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	5		5	50	434	2,30	2,53	0,40	1,04
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	434	0,02	0,02	-1,64	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	7		7	7	434	0,32	0,35	-0,46	1,18
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	48		48	48	434	2,21	2,56	0,41	0,87
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	42		42	42	434	1,94	4,49	0,65	0,24
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	38		38	38	434	1,75	6,24	0,80	0,14
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	64		64	64	434	2,95	9,19	0,96	0,17
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	3		3	30	434	1,38	1,38	0,14	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	434	0,23	1,61	0,21	0,07
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	11		11	110	434	5,07	6,68	0,82	0,62
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	14		14	140	434	6,45	13,13	1,12	0,29
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	7		7	70	434	3,23	16,36	1,21	0,10
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	15		15	150	434	6,91	23,27	1,37	0,15
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	25		25	25	434	1,15	1,15	0,06	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	12		12	12	434	0,55	1,71	0,23	0,17
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	48		48	48	434	2,21	3,92	0,59	0,36
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	54		54	54	434	2,49	6,41	0,81	0,21
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	27		27	27	434	1,24	7,65	0,88	0,08
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	64		64	64	434	2,95	10,60	1,03	0,14
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	66	Dilution 10-1	66	6600	434	304,15	304,15	2,48	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	34	Dilution 10-1	34	3400	434	156,68	460,83	2,66	0,18
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	9	Dilution 10-1	9	900	434	41,47	502,30	2,70	0,04
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	40	Dilution 10-1	40	4000	434	184,33	686,64	2,84	0,14
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	20	Dilution 10-1	20	2000	434	92,17	778,80	2,89	0,05
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	58	Dilution 10-1	58	5800	434	267,28	1046,08	3,02	0,13
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	434	/	/	/	/

Annexe 10 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 3-intestins 5 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	678,5	0,15	0,15	-0,82	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	678,5	0,15	0,30	-0,53	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	678,5	0,15	0,44	-0,35	0,17
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	678,5	0,15	0,59	-0,23	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	678,5	0,15	0,74	-0,13	0,10
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	15		15	150	678,5	4,42	5,16	0,71	0,84
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	678,5	0,015	0,01	-1,83	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	678,5	0,015	0,03	-1,53	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	678,5	0,015	0,04	-1,35	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	678,5	0,029	0,07	-1,13	0,22
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	678,5	0,059	0,13	-0,88	0,26
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	678,5	0,015	0,15	-0,83	0,05
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	16		16	160	678,5	4,72	4,72	0,67	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	10		10	100	678,5	2,95	7,67	0,88	0,21
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	3		3	30	678,5	0,88	8,55	0,93	0,05
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	1		1	10	678,5	0,29	8,85	0,95	0,01
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0	0	678,5	0,00	8,85	0,95	0,00
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	2		2	20	678,5	0,59	9,44	0,97	0,03
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	172		172	172	678,5	5,07	5,07	0,71	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	18		18	18	678,5	0,53	5,60	0,75	0,04
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	6		6	6	678,5	0,18	5,78	0,76	0,01
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0		0	0,5	678,5	0,01	5,79	0,76	0,00
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	678,5	0,06	5,85	0,77	0,00
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	678,5	0,03	5,88	0,77	0,00
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	8	Dilution 10-1	8	800	678,5	23,58	23,6	1,37	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	11	Dilution 10-1	11	1100	678,5	32,42	56,0	1,75	0,38
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	16	Dilution 10-1	16	1600	678,5	47,16	103,2	2,01	0,27
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	11	Dilution 10-1	11	1100	678,5	32,42	135,6	2,13	0,12
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	13	Dilution 10-1	13	1300	678,5	38,32	173,9	2,24	0,11
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	15	Dilution 10-1	15	1500	678,5	44,22	218,1	2,34	0,10
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	678,5	/	/	/	/

Annexe 11 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 3-intestins 6 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm2	CFU total /cm2	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	821,5	0,12	0,12	-0,91	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	1		1	10	821,5	0,24	0,37	-0,44	0,48
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	5		5	50	821,5	1,22	1,58	0,20	0,64
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	15		15	150	821,5	3,65	5,23	0,72	0,52
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	62		62	620	821,5	15,09	20,33	1,31	0,59
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	32		32	320	821,5	7,79	28,12	1,45	0,14
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	821,5	0,01	0,01	-1,92	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	7		7	7	821,5	0,17	0,18	-0,74	1,18
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	46		46	46	821,5	1,11	1,30	0,11	0,85
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	72		72	72	821,5	1,75	3,04	0,48	0,37
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	236		236	236	821,5	5,72	8,76	0,94	0,46
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	220		220	220	821,5	5,33	14,09	1,15	0,21
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	1		1	10	821,5	0,24	0,24	-0,62	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	3		3	30	821,5	0,73	0,97	-0,01	0,60
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	6		6	60	821,5	1,45	2,42	0,38	0,40
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	14		14	140	821,5	3,39	5,82	0,76	0,38
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	49		49	490	821,5	11,88	17,69	1,25	0,48
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	33		33	330	821,5	8,00	25,69	1,41	0,16
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	5		5	5	821,5	0,12	0,12	-0,92	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	11		11	11	821,5	0,27	0,39	-0,41	0,51
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	38		38	38	821,5	0,92	1,31	0,12	0,53
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	128		128	128	821,5	3,10	4,41	0,64	0,53
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	372		372	372	821,5	9,02	13,43	1,13	0,48
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	260		260	260	821,5	6,30	19,73	1,30	0,17
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	7	Dilution 10-1	7	700	821,5	16,97	16,97	1,23	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	24	Dilution 10-1	24	2400	821,5	58,17	75,13	1,88	0,65
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	39	Dilution 10-1	39	3900	821,5	94,52	169,65	2,23	0,35
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	78	Dilution 10-1	78	7800	821,5	189,04	358,70	2,55	0,33
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	100	Dilution 10-1	100	10000	821,5	242,36	601,06	2,78	0,22
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	244	Dilution 10-1	244	24400	821,5	591,36	1192,42	3,08	0,30
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	821,5	/	/	/	/

Annexe 12 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 4-intestins 7 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	Commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm ²)	CFU/cm ²	CFU total /cm ²	Log CFU total/cm ²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,12	0,12	-0,94	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,12	0,23	-0,64	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,12	0,35	-0,46	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,12	0,46	-0,34	0,12
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	2		2	20	866,3	0,46	0,92	-0,03	0,30
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,12	1,04	0,02	0,05
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,012	0,012	-1,94	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,012	0,023	-1,64	0,30
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,012	0,03	-1,46	0,18
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	866,3	0,023	0,06	-1,24	0,22
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	866,3	0,023	0,08	-1,09	0,15
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	3		3	3	866,3	0,069	0,15	-0,82	0,27
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,115	0,115	-0,94	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	3		3	30	866,3	0,693	0,81	-0,09	0,85
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,115	0,92	-0,03	0,06
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,115	1,04	0,02	0,05
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	1		1	10	866,3	0,231	1,27	0,10	0,09
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	866,3	0,115	1,39	0,14	0,04
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,01	0,01	-1,94	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,01	0,02	-1,64	0,30
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	866,3	0,01	0,03	-1,46	0,18
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	866,3	0,05	0,08	-1,09	0,37
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	3		3	3	866,3	0,07	0,15	-0,82	0,27
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	866,3	0,02	0,17	-0,76	0,06
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	1	Dilution 10-1	1	100	866,3	2,31	2,3	0,36	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	6	Dilution 10-1	6	600	866,3	13,85	16,2	1,21	0,85
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	4	Dilution 10-1	4	400	866,3	9,24	25,4	1,40	0,20
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	4	Dilution 10-1	4	400	866,3	9,24	34,6	1,54	0,13
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	13	Dilution 10-1	13	1300	866,3	30,01	64,6	1,81	0,27
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	17	Dilution 10-1	17	1700	866,3	39,25	103,9	2,02	0,21
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	866,3	/	/	/	/

Annexe 13 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 4-intestins 8 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies dénombrées après 24h (TBX et VRBG) et 72h (PCA)	commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm²)	CFU/cm²	CFU total /cm²	Log CFU total/cm²	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	770,3	0,13	0,13	-0,89	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	770,3	0,13	0,26	-0,59	0,30
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	770,3	0,13	0,39	-0,41	0,18
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	2		2	20	770,3	0,52	0,91	-0,04	0,37
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	770,3	0,13	1,04	0,02	0,06
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	38		38	380	770,3	9,87	10,91	1,04	1,02
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	770,3	0,01	0,01	-1,89	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	770,3	0,03	0,04	-1,41	0,48
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	770,3	0,05	0,09	-1,04	0,37
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	770,3	0,03	0,12	-0,93	0,11
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	770,3	0,03	0,14	-0,85	0,09
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	3		3	3	770,3	0,08	0,22	-0,66	0,19
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	23		23	230	770,3	5,97	5,97	0,78	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	1		1	10	770,3	0,26	6,23	0,79	0,02
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	3		3	30	770,3	0,78	7,01	0,85	0,05
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	8		8	80	770,3	2,08	9,09	0,96	0,11
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0	0	770,3	0,00	9,09	0,96	0,00
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	2		2	20	770,3	0,52	9,61	0,98	0,02
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	260		260	260	770,3	6,75	6,75	0,83	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	16		16	16	770,3	0,42	7,17	0,86	0,03
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	770,3	0,05	7,22	0,86	0,00
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	770,3	0,03	7,24	0,86	0,00
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	770,3	0,03	7,27	0,86	0,00
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	108		108	108	770,3	2,80	10,07	1,00	0,14
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	22	Dilution 10-1	22	2200	770,3	57,12	57,12	1,76	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	72	Dilution 10-1	72	7200	770,3	186,95	244,08	2,39	0,63
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	28	Dilution 10-1	28	2800	770,3	72,70	316,78	2,50	0,11
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	28	Dilution 10-1	28	2800	770,3	72,70	389,48	2,59	0,09
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	13	Dilution 10-1	13	1300	770,3	33,76	423,24	2,63	0,04
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	9	Dilution 10-1	9	900	770,3	23,37	446,61	2,65	0,02
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable	/	/	/	770,3	/	/	/	/

Annexe 14 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 5-intestins 9 issu du protocole *ex situ*

Temps	Milieu	Surface/prof	Zone de comptage	Nombre de colonies après 24h	commentaires	Nombre de colonies (pour calcul)	CFU/ml	Surface écouvillonnée (cm²)	CFU/cm2	CFU total /cm2	Log CFU	Delta
T0 (0 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	0,16	-0,81	
T1 (45 min)	TBX	Surface	Toute la boîte	2		2	20	640	0,63	0,78	-0,11	0,70
T2 (1h30)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	0,94	-0,03	0,08
T3 (2h15)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	1,09	0,04	0,07
T4 (3h)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	1,25	0,10	0,06
T5 (3h45)	TBX	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	1,41	0,15	0,05
T0	TBX	Profondeur	Toute la boîte	0		0,5	0,5	640	0,02	0,016	-1,81	
T1	TBX	Profondeur	Toute la boîte	11		11	11	640	0,34	0,36	-0,44	1,36
T2	TBX	Profondeur	Toute la boîte	5		5	5	640	0,16	0,52	-0,29	0,16
T3	TBX	Profondeur	Toute la boîte	5		5	5	640	0,16	0,67	-0,17	0,11
T4	TBX	Profondeur	Toute la boîte	2		2	2	640	0,06	0,73	-0,13	0,04
T5	TBX	Profondeur	Toute la boîte	1		1	1	640	0,03	0,77	-0,12	0,02
T0	VRBG	Surface	Toute la boîte	2		2	20	640	0,63	0,625	-0,20	
T1	VRBG	Surface	Toute la boîte	4		4	40	640	1,25	1,88	0,27	0,48
T2	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	2,03	0,31	0,03
T3	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	2,19	0,34	0,03
T4	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	2,34	0,37	0,03
T5	VRBG	Surface	Toute la boîte	0		0,5	5	640	0,16	2,50	0,40	0,03
T0	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	61		61	61	640	1,91	1,91	0,28	
T1	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	23		23	23	640	0,72	2,63	0,42	0,14
T2	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	12		12	12	640	0,38	3,00	0,48	0,06
T3	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	5		5	5	640	0,16	3,16	0,50	0,02
T4	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	5		5	5	640	0,16	3,31	0,52	0,02
T5	VRBG	Profondeur	Toute la boîte	6		6	6	640	0,19	3,50	0,54	0,02
T0	PCA	Surface	Toute la boîte	7	Dilution 10-1	7	700	640	21,88	21,9	1,34	
T1	PCA	Surface	Toute la boîte	18	Dilution 10-1	18	1800	640	56,25	78,1	1,89	0,55
T2	PCA	Surface	Toute la boîte	11	Dilution 10-1	11	1100	640	34,38	112,5	2,05	0,16
T3	PCA	Surface	Toute la boîte	4	Dilution 10-1	4	400	640	12,50	125,0	2,10	0,05
T4	PCA	Surface	Toute la boîte	12	Dilution 10-1	12	1200	640	37,50	162,5	2,21	0,11
T5	PCA	Surface	Toute la boîte	10	Dilution 10-1	10	1000	640	31,25	193,8	2,29	0,08
T0	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/
T1	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/
T2	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/
T3	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/
T4	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/
T5	PCA	Profondeur	Toute la boîte	Incomptable		/	/	640	/	/	/	/

Annexe 15 - Feuille de calcul pour le couple flanchet 5-intestins 10 issu du protocole *ex situ*

9) Sources

-
- ¹ Règlement (CE) n° 1099/2009 sur la protection des animaux au moment de leur mise à mort, J.O.U.E., L.303, 18 novembre 2009, p.1.
- ² Claudia C. Terlouw. Stress reactivity, stress at slaughter and meat quality. Meat Quality, Genetic and Environmental Factors, CRC Press, 528 p., 2015, Chemical and Functional Properties of Food Components Series, 9781482220315. hal-02792925
- ³ Nature & Progrès, Groupe multi-acteurs pour l'abattage à la ferme (2018). Abattage à la ferme : Pistes pour une concrétisation en Wallonie.
- ⁴ Règlement (CE) no 1/2005 du Conseil du 22 décembre 2004 relatif à la protection des animaux pendant le transport et les opérations annexes et modifiant les directives 64/432/CEE et 93/119/CE et le règlement (CE) no 1255/97. JO L 3 du 5.1.2005, p. 1–44.
- ⁵ European Parliament recommendation of 20 January 2022 to the Council and the Commission following the investigation of alleged contraventions and maladministration in the application of Union law in relation to the protection of animals during transport within and outside the Union (2021/2736(RSP))
- ⁶ Web-agri, Alice Peucelle. 15/12/2022. L'abattoir mobile Le bœuf éthique en redressement judiciaire. <https://www.web-agri.fr/actualite-de-lelevage/article/223202/l-entreprise-d-abattage-le-boeuf-ethique-placee-en-redressement-judiciaire>
- ⁷ Maldague, A., Korsak Koulagenko, N., Vandenheede, M., & La Spina, S. (2022). Opportunités de développement de l'abattage à la ferme en Wallonie. Disponible sur http://bienetreanimal.wallonie.be/files/documents/Documentation/2022_Uli%C3%A8ge_RW_Abattageferme_public.pdf
- ⁸ Règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale. JO L 139 du 30.4.2004, p. 55.
- ⁹ Règlement délégué (UE) 2021/1374 de la Commission du 12 avril 2021 modifiant l'annexe III du règlement (CE) no 853/2004 du Parlement européen et du Conseil en ce qui concerne les exigences spécifiques en matière d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale (Texte présentant de l'intérêt pour l'EEE)
- ¹⁰ De la ferme à la table - Consilium (europa.eu). <https://www.consilium.europa.eu/fr/policies/from-farm-to-fork/>
- ¹¹ Syndicat Confédération Paysanne Nationale française d'après les informations reçues par la Direction Générale de l'Alimentation, communication personnelle (février 2023).
- ¹² AFSCA, Circulaire du 01/12/2017 relative au transport de sang de porc non entièrement refroidi et de carcasses et parties de carcasses de bovin, d'ovin, de caprin et de porc non entièrement refroidies. Référence PCCB/S3/TVV/387969
- ¹³ Zweifel, C., Capek, M., & Stephan, R. (2014). Microbiological contamination of cattle carcasses at different stages of slaughter in two abattoirs. Meat Science, 98(2), 198–202. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.05.029>
- ¹⁴ Nagel-Alne, G. E., Murphy, E., McCauslin, B., Hauge, S. J., Schrøder-Petersen, D. L., Holthe, J., & Alvseike, O. (2022). Meat safety legislation and its opportunities and hurdles for innovative approaches: A review. In Food Control (Vol. 141). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109160>
- ¹⁵ Brooks JW. Postmortem Changes in Animal Carcasses and Estimation of the Postmortem Interval. Veterinary Pathology. 2016;53(5):929-940. doi:10.1177/0300985816629720
- ¹⁶ Communication personnelle du 15/03/2023, Confédération Paysanne, France

-
- ¹⁷ Communication personnelle du 15/03/2023, Confédération Paysanne, France.
- ¹⁸ Milena Burri (FiBL), 12/01/2023. Amélioration de la situation juridique pour l'abattage à la ferme et au pâturage
- ¹⁹ HMUKLV-Stand 17.05.2021 Informationen für Landwirte zur neuen EU-Regelung der mobilen Schlachtung im Herkunftsbetrieb
- ²⁰ <https://www.verbrauchergesundheit.gv.at/be-verarbeitung/schlacht-tier-und-fleischuntersuchung-hygienekontrollen/Weideschlachtung.html>
- ²¹ SciCom (2020/18). AVIS 10-2022 sur les facteurs de risque de contamination microbienne des carcasses durant le processus d'abattage d'animaux domestiques de production.
- ²² AFSCA. Rapport d'activités 2019.
<https://www.favvafsa.be/rapporactivites/2019/inspections/abattage/#abattageurgence>
- ²³ Balzan, S., De Almeida Quadros, C., De Cleve, R., Zilberstein, B., & Ceconello, I. (2007). Bacterial translocation: Overview of mechanisms and clinical impact. In *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)* (Vol. 22, Issue 4, pp. 464–471). Blackwell Publishing. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2007.04933.x>
- ²⁴ Gill CO, Penney N, Nottingham PM. Effect of delayed evisceration on the microbial quality of meat. *Appl Environ Microbiol.* 1976 Apr;31(4):465-8. doi: 10.1128/aem.31.4.465-468.1976. PMID: 178276; PMCID: PMC169805.
- ²⁵ Dahlinger J, Marks SL, Hirsh DC. Prevalence and identity of translocating bacteria in healthy dogs. *J Vet Intern Med.* 1997 Nov-Dec;11(6):319-22. doi: 10.1111/j.1939-1676.1997.tb00473.x. PMID: 9470154.
- ²⁶ Gill, C.O., Penney, N., Nottingham, P.M., 1978. Tissue sterility in uneviscerated carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 356–359. <https://doi.org/10.1128/aem.36.2.356-359.1978>
- ²⁷ Soriano A, Montoro V, Vicente J, Sánchez-Migallón BF, Benítez S, Utrilla MC, García Ruiz A. Influence of evisceration time and carcass ageing conditions on wild venison quality. Preliminary study. *Meat Sci.* 2016 Apr;114:130-136. doi: 10.1016/j.meatsci.2015.12.021. Epub 2015 Dec 30. PMID: 26773970.
- ²⁸ Wullinger, E. (2016) Hofnahe Schlachtung aus der Sicht eines für Fleischhygiene zuständigen amtlichen Tierarztes. Tagung Hofnahe Schlachtung, 22.11.2016. Hüttenberg. <https://tierschutz.hessen.de/hofnahe-schlachtung>. Zugriffsdatum 03.05.2018
- ²⁹ Wullinger, E. Communication personnelle du 17/08/2021.
- ³⁰ NVWA, 2020. Advies van BuRO over de pilot Mobiele Dodings Unit in Noord Nederland | Risicobeoordeling | NVWA 1–77.
- ³¹ Wullinger-Reber, H.S., 2019. Mobile Schlachtung von Schweinen aus Freilandhaltung - Tierschutz, Fleischqualität und Lebensmittelsicherheit - 1–179. Dissertation, LMU München: Faculty of Veterinary Medicine.
- ³² Welfare of cattle at slaughter - EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), 2020.
- ³³ Claudia C. Terlouw, Cécile Bourguet, Véronique Deiss. La conscience, l'inconscience et la mort dans le contexte de l'abattage. Partie I. Mécanismes neurobiologiques impliqués lors de l'étourdissement et de la mise à mort. *La revue française de la recherche en viandes et produits carnés*, 2015, 31 (2-2), pp.1-20. fihal-02638116f
- Claudia C. Terlouw, Cécile Bourguet, Véronique Deiss. La conscience, l'inconscience et la mort dans le contexte de l'abattage. Partie II. Méthodes d'évaluation. *La revue française de la recherche en viandes et produits carnés*, 2015, 31 (2-3), pp.1-12. fihal-02638037
- ³⁴ Xu Q, Qiao Q, Gao Y, Hou J, Hu M, Du Y, Zhao K, Li X. Gut Microbiota and Their Role in Health and Metabolic Disease of Dairy Cow. *Front Nutr.* 2021 Aug 4;8:701511. doi: 10.3389/fnut.2021.701511. PMID: 34422882; PMCID: PMC8371392.

-
- ³⁵ Wiest, R., & Rath, H. C. (2003). Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(3), 397–425. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00024-6)
- ³⁶ Règlement européen (CE) No 1441/2007 de la Commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. JOUE L 322/12. 7.12.2007
- ³⁷ AFSCA, Circulaire du 15/05/2020 relative aux critères microbiologiques applicables aux carcasses d'ongulés domestiques et à la possibilité d'assouplissement de la fréquence d'échantillonnage pour les « petits abattoirs ». Référence PCCB/S3/148040
- ³⁸ Lees, A. M., Salvin, H. E., Colditz, I. G., & Lee, C. (2020). The influence of temperament on body temperature response to handling in angus cattle. *Animals*, 10(1). <https://doi.org/10.3390/ani10010172>
- ³⁹ Biomnis ; PCR et séquençage du gène ARN 16S : applications en Bactériologie (2015). Focus (n18)
- ⁴⁰ Fan, P., Nelson, C. D., Driver, J. D., Elzo, M. A., Peñagaricano, F., & Jeong, K. C. (2021). Host genetics exerts lifelong effects upon hindgut microbiota and its association with bovine growth and immunity. *ISME Journal*, 15(8), 2306–2321. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-00925-x>
- ⁴¹ Lin L, Lai Z, Zhang J, Zhu W, Mao S. The gastrointestinal microbiome in dairy cattle is constrained by the deterministic driver of the region and the modified effect of diet. *Microbiome*. 2023 Jan 20;11(1):10. doi: 10.1186/s40168-022-01453-2. PMID: 36670455; PMCID: PMC9863278.
- ⁴² Wiest, R., & Rath, H. C. (2003). Bacterial translocation in the gut. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17(3), 397–425. [https://doi.org/10.1016/S1521-6918\(03\)00024-6](https://doi.org/10.1016/S1521-6918(03)00024-6)
- ⁴³ Nation, P. N., & Williams, E. S. (1989). Maggots, mutilations and myth: Patterns of postmortem scavenging of the bovine carcass. In *Can Vet J* (Vol. 30).
- ⁴⁴ Nagel-Alne, G. E., Murphy, E., McCauslin, B., Hauge, S. J., Schrøder-Petersen, D. L., Holthe, J., & Alvseike, O. (2022). Meat safety legislation and its opportunities and hurdles for innovative approaches: A review. In *Food Control* (Vol. 141). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2022.109160>
- ⁴⁵ https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/4551346/mod_resource/content/2/cap%209.pdf
- ⁴⁶ https://www.favv-afsca.be/comites-fr/consultatif/rapportsreunions/_documents/Point5C-ARH2_FR_000.pdf
- ⁴⁷ AFSCA. Circulaire (01/12/2017) relative au transport de sang de porc non entièrement refroidi et de carcasses et parties de carcasses de bovin, d'ovin, de caprin et de porc non entièrement refroidies. Référence PCCB/S3/TVV/387969