



anses

Décontamination et gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire

Avis de l'Anses
Rapport d'expertise collective

Juin 2022

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 juin 2022

AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.
L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.
Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.
Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).
Ses avis sont publiés sur son site internet.*

L'Anses a été saisie le 25 juin 2019 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour la réalisation de l'expertise suivante : mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui à la décontamination et aux mesures de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale, le plus souvent d'origine alimentaire, provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par la bactérie *Clostridium botulinum* et qui se manifeste par une paralysie flasque pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Neuf types toxiques, répartis en une quarantaine de sous-types, sont actuellement connus.

En France, le botulisme animal affecte essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Chez les volailles, on recense annuellement vingt à trente foyers, majoritairement dus aux types mosaïque C/D (dans les élevages de poulets de chair et de dindes) suivi de D et mosaïque D/C (uniquement dans les élevages de dindes). Chez les bovins, l'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an et les épisodes de botulisme sont dus aux types mosaïque D/C (majoritaire), C, mosaïque C/D et rarement D.

Les pertes en élevage liées à ces foyers et les interrogations sur leurs conséquences dans le domaine de la santé publique ont amené les pouvoirs publics à réglementer le botulisme

animal en l'intégrant dans la liste des dangers sanitaires de première catégorie pour les espèces animales (arrêté du 29 juillet 2013)¹. Aujourd'hui, cette maladie figure dans une liste des maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime (arrêté du 03 mai 2022)². Pour autant, aucune mesure de police sanitaire de portée générale n'a été édictée à ce jour pour gérer les foyers de botulisme animal, et chacun est géré au cas par cas par la direction départementale en charge de la protection des populations (DDPP) concernée, et par la Mission des Urgences Sanitaires (MUS) de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL).

Jusqu'à présent, ces services se sont appuyés sur : un rapport sur le botulisme animal publié par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa 2002) et un avis rendu en janvier 2009 sur un projet (par la suite abandonné) d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire (Afssa 2009). Afin de pouvoir disposer de données actualisées et déterminer des mesures de gestion adaptées aux particularités du botulisme des type C, D et mosaïques C/D ou D/C, la DGAL a saisi l'Anses en juin 2019 *via* quatre saisines (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115)³.

L'expertise a été réalisée en deux étapes :

1. une mise à jour des connaissances sur *Clostridium botulinum* (types C, D, mosaïques C/D et D/C et E) effectuée par le groupe de travail (GT) « Groupe socle botulisme » (Anses 2021a), portant sur les caractéristiques microbiologiques, les maladies humaines et animales (bovins, oiseaux et poissons), la présence des différentes formes et types dans l'environnement, le danger dans les denrées alimentaires d'origine animale ainsi que l'efficacité des méthodes et procédés d'inactivation ;
2. le traitement des questions d'évaluation des risques par des GT spécifiques (« Botulisme décontamination » « Botulisme bovin-aviaire » ; « Botulisme faune sauvage »).

La première étape a fait l'objet d'un rapport de l'Anses du 30 juin 2021 (Anses 2021a). Le rapport et l'avis portant sur l'évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme ont été publiés en septembre 2021 (Anses 2021b) et celui portant sur la filière volaille en février 2022 (Anses 2022).

Le présent avis a vocation à répondre à la saisine portant sur l'évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux (SPAn) dans les foyers de botulisme bovin et aviaire. Les demandes et questions posées par la DGAL dans sa lettre de saisine sont les suivantes :

¹ Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. Cet arrêté, aujourd'hui abrogé, était devenu obsolète depuis l'entrée en application, au 21/04/2021, du règlement (UE) 2016/429 du Parlement européen et du Conseil (« *animal health law* » ou « Loi santé animale »), qui définit une liste de maladies animales transmissibles vis-à-vis desquelles s'appliquent les mesures de surveillance, de prévention et/ou de lutte prévues par ce règlement. Or, le botulisme animal n'a pas été retenu dans cette liste.

² Arrêté du 03 mai 2022 listant les maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime. Le botulisme animal figure dans l'annexe II de cet arrêté. Cette annexe destinée à être abrogée, réunit des maladies dont les mesures de surveillance, de prévention et/ou de lutte ne sont que transitoirement placées sous l'autorité de l'Etat.

³ 2019-SA-0112 : évaluation des mesures de maîtrise en filière bovine lors de la détection de cas de botulisme; 2019-SA-0113 : décontamination et gestion des sous-produits d'élevage lors des cas de botulisme bovin et aviaire; 2019-SA-0114 : évaluation des mesures de maîtrise en filière avicole lors de la détection de cas de botulisme; 2019-SA-0115 : mesures de gestion de cas de botulisme dans la faune sauvage.

1. « Actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols ».
2. « Le traitement du fumier et de la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ? »
3. « La conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C/1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ? »
4. Dans l'hypothèse de matière non assainie :
 - « L'épandage des eaux résiduaires⁴ voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-elles ? »
 - « Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »
 - « Lors de l'épandage du fumier à proximité, ou sur des sols destinés à des cultures, et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisés « Santé et bien-être des animaux » (CES SABA, pilote), « Substances et produits biocides » (CES BIOCIDES), « Evaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK) et « Eaux » (CES EAUX). L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Botulisme décontamination », rattaché aux comités d'experts spécialisés SABA, BIOCIDES, BIORISK et EAUX.

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été présentés régulièrement aux CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) : SABA (12 octobre, 14 décembre 2021, 8 février, 5 avril et 10 mai 2022) ; BIORISK (12 octobre 2021 et 6 avril 2022) ; BIOCIDES (31 mars 2022) et EAUX (11 janvier et 5 avril 2022). Ils ont été adoptés par le CES SABA réuni le 10 mai 2022. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Dans un premier temps, le GT « Botulisme décontamination » a décidé de travailler sur une actualisation des données sur la résistance et la persistance de *C. botulinum* types C, D, mosaïques C/D, D/C dans l'espace agricole ainsi que sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* et l'appréciation de leur efficacité. Ce travail a été réalisé en s'appuyant sur la mise à jour des connaissances effectuée par le GT « Groupe socle botulisme » (Anses 2021a), complétée par une recherche bibliographique. Dans un second temps, les questions relatives à l'évaluation de risque ont été traitées selon la méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale développée par l'Afssa (2008).

⁴ Après contact et discussion avec la DGAL, l'appellation « eaux résiduaires » fait référence à des eaux issues d'un élevage identifié comme foyer de botulisme animal, non relié au réseau de collecte des eaux usées et sans station de traitement des eaux usées (STEU) propre. Les abattoirs et autres établissements agroalimentaires ne sont pas concernés.

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DES CES ET DU GROUPE DE TRAVAIL

3.1. Les effluents d'élevage : définition et réglementation

Les effluents d'élevage sont constitués par les déjections des animaux (leurs excréments et/ou urines) avec ou sans litière, et les eaux résiduaires, incluant notamment les eaux de lavage des bâtiments d'élevage et de leurs équipements. Ils peuvent être directement valorisables en agriculture en tant que fertilisants organiques, transformés en compost (cas des fumiers) ou convertis en biogaz. Leur épandage doit tenir compte de leur valeur fertilisante, du niveau de fertilité des sols et des besoins des cultures qui diffèrent selon les végétaux et leur stade de croissance.

Le stockage et les épandages des effluents doivent être pratiqués dans le respect des réglementations environnementales en vigueur, notamment la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE)⁵, qui vise principalement la protection de la ressource en eau et la protection des tiers (voisinage), et la réglementation relative à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole^{6 7}. Les principales prescriptions applicables aux exploitations bovines et aviaires relevant de la réglementation ICPE sont : (i) les obligations de distances des locaux d'élevage par rapport aux tiers ou aux ressources en eau, (ii) les dispositions constructives visant à limiter les risques d'infiltration des effluents dans le sol, (iii) les normes applicables au stockage des effluents et celles relatives à leur épandage (périodes d'interdiction, distances à respecter vis-à-vis des habitations, des cours d'eau, etc.), renforcées dans les zones vulnérables⁸ délimitées dans le cadre de la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole.

En outre, les effluents issus d'élevages bovins et aviaires sont soumis à des règles sanitaires (règlement n°1069/2009/CE⁹ complété par le règlement n°142/2011/CE¹⁰) destinées à

⁵ Arrêtés du 27/12/13 relatifs, respectivement, aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous les rubriques nos 2101-1, 2101-2, 2101-3, 2102 et 2111, aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre des rubriques nos 2101, 2102 et 2111 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement, et aux installations relevant du régime de l'autorisation au titre des rubriques n° 2101, 2102, 2111 et 3660 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement.

⁶ La directive européenne n° 91/676/CEE du 12 décembre 1991, dénommée « directive nitrates », vise à protéger les eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole. Elle impose aux États Membres de fixer des programmes d'actions applicables dans les zones vulnérables.

⁷ Arrêté du 19 décembre 2011 modifié relatif au programme d'actions national à mettre en œuvre dans les zones vulnérables afin de réduire la pollution des eaux par les nitrates d'origine agricole.

⁸ Zones où la pollution des eaux par le rejet direct ou indirect de nitrates d'origine agricole et d'autres composés azotés susceptibles de se transformer en nitrates menace la qualité des milieux aquatiques et plus particulièrement l'alimentation en eau potable.

⁹ Règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux).

¹⁰ Règlement (CE) n° 142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009 du parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la directive 97/78/CE du Conseil en ce qui

prévenir ou réduire au maximum les risques qu'ils comportent pour la santé publique et la santé animale, notamment en vue de préserver la sécurité de la chaîne alimentaire, y compris lors d'usage pour la fertilisation des sols. Ces dispositions sont reprises et précisées sur le plan national dans l'arrêté ministériel du 9 avril 2018¹¹. Il est à noter que le règlement n°1069/2009/CE ne s'applique pas aux eaux résiduaires.

Les excréments et/ou urines des animaux d'élevage avec ou sans litière sont considérés par le règlement n°1069/2009/CE comme des SPAn de catégorie 2¹². De ce fait, ils peuvent être utilisés directement dans les sols en tant qu'engrais organique ou amendement. Lors de conversion de ces effluents en compost (cas des fumiers) ou en biogaz, le règlement n°1069/2009/CE impose que ces matières soient soumises pendant au moins 60 minutes à une température minimale de 70°C (« pasteurisation/hygiénisation »)¹³, pour prévenir ou réduire au maximum les risques pour la santé publique et la santé animale.

En outre, des restrictions sanitaires peuvent être spécifiquement définies par arrêté ministériel ou préfectoral, visant à prévenir tout risque de propagation d'une maladie grave transmissible lors d'usage des effluents d'élevage pour la fertilisation des sols.

3.2. Principales caractéristiques des *Clostridium botulinum* des types C, D, mosaïques C/D et D/C

Clostridium botulinum, regroupe un ensemble hétérogène de souches bactériennes dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine botulique. Ce sont des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes, sporulées, naturellement présentes dans l'environnement.

Les souches de *C. botulinum* sont classées en trois groupes (I à III) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques. La classification basée sur le type de toxine produite (neuf types différents : A à H, X) est actuellement la plus employée. Les souches de *C. botulinum* productrices des toxines C, D et mosaïques C/D et D/C (groupe III) sont responsables des foyers de botulisme affectant les élevages aviaires et bovins en France, et sont donc principalement ciblées dans la présente saisine. Les souches de types A, B ou F protéolytiques (groupe I) et celles de types B, E ou F non protéolytiques (groupe II) sont celles principalement incriminées dans les cas de botulisme humain. La faible sensibilité de l'être humain aux toxines C, D et mosaïques C/D, D/C est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas humains liés à ces types toxiques.

3.3. Détection et caractérisation de *C. botulinum* dans l'environnement

Les méthodes de détection de *C. botulinum* et de la toxine botulique à partir de matrices environnementales (sol, sédiments, effluents, végétaux) sont les mêmes que celles utilisées pour le diagnostic du botulisme animal. Elles nécessitent cependant des adaptations

concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive.

¹¹ Arrêté du 9 avril 2018 fixant les dispositions techniques nationales relatives à l'utilisation de sous-produits animaux et de produits qui en sont dérivés, dans une usine de production de biogaz, une usine de compostage ou en « compostage de proximité », et à l'utilisation du lisier. Les dispositions de cet arrêté sont détaillées dans l'instruction technique DGAL/SDSPA/2020-41 du 21/01/2020.

¹² Les matières de catégories 2 correspondent aux cadavres de monogastriques, cadavres de ruminants non suspects ou non atteints d'EST (encéphalopathies spongiformes transmissibles) ne contenant pas de matières à risque spécifié, tissus et organes saisis pour motifs autres que les EST, matières contenant des résidus de médicaments vétérinaires ; pouvant véhiculer de maladie transmissible à l'Homme ou l'animal et sous-produits d'animaux écartés de la consommation humaine pour motif autre que sanitaire, sous-produits de ruminants négatifs aux tests de dépistage EST. Les lisiers et le contenu de l'appareil digestif des animaux sont rattachés aux matières de catégorie 2.

¹³ Sauf dérogation accordée par la direction départementale en charge de la protection des populations.

méthodologiques pour tenir compte des particularités des matrices (effluents divers, échantillons de sol, etc.). Leur nature polymicrobienne rend très difficile l'utilisation des méthodes de détection classiques fondées sur les techniques d'isolement bactérien, faute de disposer de milieux sélectifs et en raison des difficultés de culture propres aux *C. botulinum* du groupe III.

En France, la méthode développée par le laboratoire national de référence (LNR) pour la détection de *C. botulinum* (spores et/ou cellules végétatives) et la détermination du type toxinique dans ces matrices, repose sur une étape d'enrichissement avec ou sans traitement thermique préalable, suivie d'une étape de détection moléculaire du gène codant la toxine botulique (PCR en temps réel), permettant de caractériser spécifiquement les souches productrices de toxines C, D, mosaïques C/D ou D/C. Cependant, le GT rappelle l'absence de norme pour la détection de *C. botulinum* du groupe III, qui s'explique par une absence de consensus méthodologique.

La détection et la détermination de la toxine reposent notamment sur le test sur souris (*Mouse bioassay* ou MBA), réalisé uniquement par le Centre National de Référence (CNR).

Les réponses aux questions de la saisine sont les suivantes :

3.4. Actualisation des données sur la résistance et la persistance de *C. botulinum* de type C, D et mosaïques C/D et D/C dans différentes matrices

Les souches de *C. botulinum* du groupe III se différencient de celles des autres groupes par leurs conditions de croissance, à partir de 15°C (optimales entre 37 et 40°C), avec un pH minimal de 5,1 et une activité de l'eau (a_w) minimale de 0,97, dans un milieu riche en matières organiques. Les cadavres en décomposition constituent par exemple un milieu très favorable à leur multiplication et leur toxinogénèse. La thermorésistance de leurs spores est intermédiaire entre celles des groupes I et II, avec des valeurs de « $D_{90^\circ\text{C}}$ »¹⁴ entre 8,9 et 11,9 min selon les souches. Les toxines C et D sont en revanche plus résistantes à la chaleur que les toxines A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70°C suffit pour les inactiver, il faut atteindre 90°C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines C et D.

➤ Présence de *C. botulinum* dans les sols en France

Il n'existe pas d'historique sur la distribution et la prévalence des divers types de toxines botuliques dans les sols en France. Les principales données émanent du projet BOTUSOL (2019-2023)¹⁵, qui vise à caractériser la distribution de *C. botulinum* dans les sols agricoles français, non reliée à des épisodes de botulisme animal. Les résultats préliminaires obtenus dans le cadre du projet BOTUSOL indiquent une large répartition de *C. botulinum* sur le territoire national, qui est détecté dans 46 % des échantillons jusqu'ici analysés. La quasi-totalité des souches détectées sont de type B, et seulement 1 % des échantillons positifs renferment des souches du groupe III. Rappelons que les foyers détectés ces 20 dernières années dans les élevages de volailles et bovins français sont dus à ces *C. botulinum* du groupe

¹⁴ D_T : temps de réduction décimale, est défini comme la durée de traitement thermique, exprimée généralement en minutes, nécessaire à la température T pour diviser par dix la charge microbienne.

¹⁵ BOTUSOL « Botulisme animal et épandage des effluents : devenir de *Clostridium botulinum* dans le sol » (2019-2023). Projet financé par France AgriMer. Coordination : Anses laboratoire de Ploufragan (HQPAP, EPISABE). Partenaires : Inrae Dijon (Agroécologie Equipe MERS), INNOVAL. Cette étude utilise le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS, GIS Sols) pour obtenir des échantillons de sols répartis sur l'ensemble du territoire national et représentatifs des différents modes d'usage des sols (grande culture, prairies, forêts, etc.) ainsi que des différentes pratiques culturales.

III. Le projet BOTUSOL inclut aussi des suivis après épandages d'effluents contaminés, mais le travail n'est pas suffisamment abouti au moment de la rédaction de cet avis.

➤ Présence de *C. botulinum* dans les locaux d'élevage

Les études, menées notamment à la suite d'épisodes de botulisme dus à des *C. botulinum* du groupe III montrent bien la large contamination des locaux d'élevage et de leurs abords, et la persistance possible de la bactérie pendant sept mois dans un élevage de poulets de chair après le départ pour l'abattoir d'un lot reconnu *a posteriori* infecté par *C. botulinum* D/C et la désinfection du local. Les données concernant les élevages bovins et leur environnement sont en revanche plus limitées. Elles relèvent essentiellement d'observations ou d'investigations qui, suite à la découverte de foyers de botulisme en lien épidémiologique avec des élevages avicoles, ont permis la détection de *C. botulinum* (types mosaïques C/D ou D/C) dans les pâturages, les bâtiments d'élevage (stalles), le fumier ou le lisier.

➤ Présence de *C. botulinum* dans les effluents d'élevage

Les effluents, issus des élevages foyers de botulisme, en particulier les matières fécales et urines (avec ou sans litière) sont largement contaminés, notamment lorsqu'ils sont d'origine aviaire. Leur suivi, jusqu'à sept mois dans du fumier de bovins (pourtant traité à la chaux) montre la persistance de *C. botulinum* (projet BOTUSOL), et des études de tas de fumier de volailles stockés sans traitement durant deux mois suggèrent (données à confirmer) une possibilité de multiplication. Ces données montrent qu'un assainissement naturel par simple stockage ne peut être envisagé.

➤ Présence de *C. botulinum* dans les poussières et aérosols

Le GT s'est également intéressé à la question de la dissémination aéroportée de la bactérie par des poussières et des aérosols émis lors des épandages. *C. botulinum* peut être détectée dans les circuits de ventilation et au niveau des parois des bâtiments dans les élevages contaminés, suggérant fortement sa dissémination par les poussières. Le rôle des poussières entraînées par le vent lors d'épandage d'effluents contaminés ou à partir de tas de fumiers de volailles a fait l'objet de nombreuses constatations épidémiologiques suite à l'éclosion de foyers de botulisme bovin. A cet égard, les fumiers de volaille, du fait de leur teneur en matières sèches élevée et de la faible taille des particules, sont plus propices à l'émission de matières particulaires que les fumiers de bovin. Des études portant sur *C. difficile* dans des effluents de volailles ont montré que la bactérie pouvait être ainsi propagée sur 150 à 400 mètres du site d'épandage.

➤ Contamination des végétaux destinés à l'alimentation animale et humaine

S'agissant, enfin, des possibilités de contamination de végétaux, qu'ils soient destinés à l'alimentation animale ou humaine, le risque est principalement celui de la contamination de surface de *C. botulinum* sur les feuilles, fruits et/ou racines, suite à un épandage ou du fait de la persistance de la bactérie dans le sol après cet épandage. Aucune étude de suivi de la contamination de végétaux à la suite de fertilisation de cultures avec des effluents reconnus contaminés par *C. botulinum* n'est disponible.

En alimentation animale, la contamination des végétaux par *C. botulinum* est principalement décrite à la suite d'épandages sur prairies. À cet égard, le délai de trois à cinq semaines au minimum après épandage habituellement conseillé avant la mise à l'herbe des ruminants ou la récolte des végétaux destinés à leur alimentation, est insuffisant pour prévenir le développement de la maladie.

Si la contamination par des spores botuliques de végétaux fraîchement récoltés pour la consommation humaine peut être mise en évidence, elle s'avère généralement rare, avec des niveaux très faibles : les concentrations supérieures à 1 spore de *C. botulinum* / g sont exceptionnelles.

3.5. Actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* et l'appréciation de leur efficacité

Trois groupes de situations ont été analysés par le GT : i) la décontamination des supports inertes représentés par les structures et les matériels d'élevage, ii) la décontamination des produits organiques, notamment des effluents d'élevage (litières, fumiers, lisiers, eaux résiduaires) et des aliments contaminés, iii) la décontamination dans certains environnements comme les parcours, prairies naturelles et surfaces cultivées.

La décontamination¹⁶, est définie¹⁷ comme la série d'opérations, comprenant notamment des actions de nettoyage et de désinfection, visant à obtenir l'élimination ou la réduction du nombre d'agents pathogènes jusqu'à un niveau ne permettant plus leur dissémination.

➤ Décontamination des supports inertes représentés par les structures et les matériels d'élevage

Les procédures de décontamination des locaux d'élevage, de leurs équipements et du matériel (notamment lorsqu'il a été utilisé pour le transport et la manutention d'effluents contaminés) doivent être adaptées aux caractéristiques de *C. botulinum*, notamment à la résistance des spores botuliques et à leur capacité à persister dans de multiples sites, y compris les plus difficilement accessibles (par exemple les circuits de ventilation en élevage avicole). Pour une efficacité optimale, elles impliquent le choix d'un désinfectant dont l'activité sporicide est validée dans le contexte d'une utilisation en élevage, la réalisation de deux opérations de désinfection successives après nettoyage, et des contrôles d'efficacité montrant la disparition de la bactérie dans les locaux et sur le matériel. Plusieurs biocides (aldéhydes, dérivés halogénés, produits oxydants et bases) sont reconnus comme ayant une activité sporicide. Les substances actives citées n'ont toutefois pas toutes été validées selon les normes en vigueur pour cette activité (cas de la chaux), et actuellement aucun produit disposant d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) pérenne ou dont le dossier d'AMM est en cours d'évaluation ne revendique une activité sporicide dans le domaine vétérinaire (TP3).

➤ Décontamination des effluents d'élevage

La décontamination des effluents des élevages atteints de botulisme est encore plus problématique. Le GT a précédemment indiqué qu'un stockage prolongé des effluents contaminés (études réalisées sur du fumier de volailles) ne permettait pas d'envisager un assainissement naturel vis-à-vis de *C. botulinum*.

Procédés chimiques :

¹⁶ Dans le cadre du règlement biocide 528/2012/CE, la terminologie décontamination est liée aux moyens et mesures d'élimination du produit biocide des zones traitées ou en cas de rejet dans l'environnement. Dans le contexte de cette saisine, le terme décontamination est employé au sens d'un traitement (visant l'élimination de l'agent pathogène) par nettoyage et désinfection.

¹⁷ D'après le guide technique du plan national d'intervention sanitaire d'urgence (PNISU) dans le domaine de la santé animale sur la décontamination d'un élevage. DGAL, février 2021.

Il est difficile, par ailleurs, en raison des grands volumes à traiter et de leur charge très élevée en matières organiques (qui réduit ou neutralise l'activité biocide de la plupart des produits désinfectants) d'envisager leur traitement par un agent chimique. Le seul actuellement préconisable, du fait de sa biodégradabilité et de la possibilité de l'épandre sur certains terrains agricoles, est la chaux (chaux vive ou chaux éteinte). Les données d'efficacité de la chaux appliquée à la décontamination des effluents contaminés seront présentées plus loin dans la réponse à la 2^{ème} question du demandeur.

Compostage :

Le GT a également analysé les données disponibles sur une éventuelle efficacité du compostage vis-à-vis de *C. botulinum*. Le compostage est un processus biologique de décomposition et de transformation « contrôlé » en milieu aérobie (obtenu par aération ou ventilation forcée) des matières organiques biodégradables permettant d'obtenir un produit organique stabilisé, le compost. Le compostage est reconnu pour présenter, en outre, un effet hygiénisant vis-à-vis de certains agents pathogènes, dû principalement à l'élévation thermique au-dessus de 55°C (jusqu'à 71-72°C, voire 80°C) qui résulte de l'action des micro-organismes aérobies thermophiles sélectionnés durant ce processus. Il n'existe, à la connaissance du GT, aucune donnée relative à l'évolution de *C. botulinum* au cours du processus de compostage, sinon des données ponctuelles indiquant la détection de spores dans certains composts. Par ailleurs, des recherches montrant la persistance d'autres bactéries sporulées (telles que *Clostridioides difficile*) suggèrent fortement que le processus de compostage ne permet pas d'éliminer les spores botuliques.

Digestion anaérobie (méthanisation) :

Les digestats de méthanisation agricole constituent une source de matière organique disponible pour la fertilisation en agriculture. Ils sont produits à la suite de la conversion en biogaz de divers substrats organiques, dont une part importante est constituée d'effluents d'élevages (fumiers, lisiers). La production de biogaz résulte d'un processus de digestion anaérobie, au cours duquel la matière organique est dégradée par des micro-organismes en milieu anaérobie dans des digesteurs thermorégulés. Les installations peuvent traiter les effluents de plusieurs élevages, ce qui aboutit à une dilution des effluents éventuellement contaminés. Il existe une diversité importante des systèmes de conversion en biogaz (voie sèche ou humide, en conditions psychrophile, mésophile ou thermophile), mais en France ils fonctionnent majoritairement en conditions mésophiles (entre 34 et 42°C). Hors intervention possible d'autres facteurs biotiques (compétitions bactériennes) ou abiotiques (pH) dont les effets sur *C. botulinum* ne sont pas caractérisés, les conditions anaérobies et de température (du moins en conditions mésophiles) dans les digesteurs ne semblent pas défavorables à la persistance de la bactérie et de ses toxines. Les quelques études disponibles comparant la présence de *C. botulinum* dans les intrants et en sortie dans les digestats n'ont pas montré un effet assainissant vis-à-vis de cette bactérie et notamment de ses spores.

➤ Décontamination de l'environnement

Les possibilités de traitement des abords enherbés des bâtiments d'élevage et des parcours en plein air pour les volailles sont quasiment limitées à l'application de chaux vive avant de retourner la terre par labourage, mais aucune étude n'a été conduite jusqu'ici pour en valider son efficacité sur les spores botuliques et leur devenir après enfouissement dans la terre.

Dans le cas des prairies et des terrains cultivés, aucun procédé ne permet d'éliminer les spores introduites en surface ou dans la terre à la suite de l'épandage d'un effluent contaminé. Le risque de botulisme doit alors être analysé en fonction des végétaux produits (végétaux

consommés ou non), des espèces amenées à les consommer (humains ou animaux) et des modalités de consommation.

3.6. Le traitement du fumier et de la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ?

La chaux vive (oxyde de calcium) et la chaux éteinte (hydroxyde de calcium) agissent en augmentant l'alcalinité du milieu traité avec la possibilité d'atteindre un pH supérieur à 12. La chaux vive se transforme en chaux éteinte au contact de l'eau en provoquant une réaction exothermique se manifestant par une élévation de température de 45°C jusqu'à 100°C. L'action synergique obtenue (pH > 12 et température élevée) contribue à renforcer l'action sporicide.

La chaux est largement préconisée en élevage pour le traitement des litières, des sols des bâtiments d'élevage en terre battue, ainsi que des fumiers, voire lisiers, eaux résiduaires. Bien que son activité sporicide soit reconnue dans la littérature, cette activité n'est pas revendiquée par les producteurs de chaux dans les dossiers d'AMM pérennes. En outre, il n'existe que très peu de données publiées sur l'efficacité de la chaux vis-à-vis des spores de *C. botulinum* lorsqu'elle est utilisée sur le terrain.

S'agissant du fumier et des litières usagées, la méthode la plus utilisée en pratique dans le cadre de la gestion du botulisme consiste à obtenir une combustion progressive du fumier et de la litière usagée par mélange par strates avec de la chaux vive selon la méthode du « mille-feuilles ». Il s'agit d'un procédé délicat à mettre en œuvre par les risques d'incendie qu'il génère. Ce traitement contribue à réduire le volume de l'effluent contaminé et la quantité de cellules de *C. botulinum* présentes. En revanche les contrôles réalisés par le LNR montrent que l'utilisation de la chaux vive s'avère insuffisante pour éliminer totalement *C. botulinum* dont le gène codant la toxine botulique est encore détectable dans les résidus de fumier qui n'ont pas été incinérés.

3.7. La conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C/1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ?

Conformément au règlement n°1069/2009/CE, des exigences minimales s'appliquent pour la conversion des lisiers en compost ou en biogaz. Elles correspondent à l'étape dite de « pasteurisation/hygiénisation », définie dans le règlement n°142/2011/CE, qui doit précéder la digestion anaérobie, dans le cas d'une usine de production de biogaz, et qui intervient au cours du processus de compostage dans le cas d'une usine de compostage. À cet égard, ces établissements doivent garantir le maintien d'une température minimale de 70°C de toutes les matières pendant au moins 60 minutes. Les composts et digestats soumis à ces paramètres de conversion sont des produits dérivés transformés.

Le GT rappelle que le compostage et la digestion anaérobie ne permettent pas d'inactiver les spores de *C. botulinum*. Il convient donc ici d'évaluer l'apport d'une étape de « pasteurisation/hygiénisation » sur le devenir de *C. botulinum* au cours de ces opérations.

S'agissant du compostage, le respect du couple température / temps prévu, c'est-à-dire une température minimale de 70°C de toutes les matières avec durée minimale de 60 minutes, implique qu'il soit effectué dans des établissements disposant d'un équipement spécifique de suivi en continu et d'enregistrement des températures, et idéalement dans un réacteur de compostage. Le respect du couple température / temps prévu apparaît plus favorable à

l'élimination de la toxine préformée et des formes végétatives de *C. botulinum* présentes dans la litière ou le fumier compostés qu'à celle des spores. Ainsi, les quelques études et observations de terrain suggèrent que le respect du couple prévu température/temps ne permet pas de garantir une inactivation totale des spores éventuellement présentes ni un abattement significatif de leur nombre, même si l'on peut s'attendre à une disparition de la toxine et des formes végétatives.

S'agissant de la méthanisation, la mise en œuvre du prétraitement des intrants par chauffage à 70°C durant 1 heure implique de disposer d'un équipement de pasteurisation en amont du digesteur anaérobie, ce qui est rarement le cas dans les installations traitant les effluents d'élevage. S'appuyant sur les estimations des temps de réduction décimale (*D*) en milieu aqueux de *C. botulinum* du groupe III effectuées à partir de données publiées par Segner et Schmidt (1971), le GT a conclu que l'étape de pasteurisation proposée ne permettait pas l'inactivation des formes sporulées éventuellement présentes ($D_{70^{\circ}\text{C}} > 12\text{h}$), ce qui va dans le sens des observations conduites sur d'autres bactéries sporulées. Cette étape permet, en revanche, l'inactivation des formes végétatives. Le GT s'interroge néanmoins sur l'effet du choc thermique sur l'activation des spores et la possibilité, à démontrer toutefois, d'une éventuelle germination suivie d'une multiplication des formes végétatives lors du refroidissement précédant l'entrée de l'effluent dans le digesteur.

3.8. Quels risques en santé publique et en santé animale lors d'épandage de fertilisants organiques contaminés ?

Dans l'hypothèse de matière non assainie,

- « L'épandage des eaux résiduaires voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-elles ? »
- « Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »
- « Lors de l'épandage du fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

Pour répondre à ces questions, le GT a adopté une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale décrite par l'Afssa en 2008. Cette méthode comporte plusieurs phases définies sur la base d'un schéma événementiel (Annexe 1) identifiant les diverses étapes du cheminement du danger, représenté par les *C. botulinum* du groupe III et leurs toxines, depuis les effluents d'élevage issus d'un élevage bovin ou aviaire atteint de botulisme jusqu'aux cibles potentiels, animaux ou humains. En conjuguant des apports de la littérature scientifique (lorsqu'ils existaient) et les acquis de leur expérience, les experts ont collectivement procédé, pour chaque situation envisagée, à une estimation des probabilités qualitatives de l'émission du danger, d'exposition au danger et de contamination par *C. botulinum*. Les probabilités sont notées sur une échelle de [0] à [9], correspondant aux qualificatifs « nul » à « très élevé » (Afssa, 2008). Le niveau d'incertitude associé à chacune des probabilités a également été qualifié de « faible », « moyen », « élevé » ou « absence de données » en fonction des données disponibles et la présence de convergence entre experts.

3.8.1.« L'épandage des eaux résiduaires voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-ils ? »

L'épandage des effluents (y compris les eaux résiduaires contaminées) issus d'un foyer de botulisme aviaire ou bovin de type C, D, mosaïques C/D ou D/C, ainsi que des composts ou des digestats qui en dérivent, peut présenter un risque au regard de la santé des espèces animales sensibles. Différents paramètres agissent néanmoins sur ce risque, notamment la charge microbienne, plus élevée dans les fertilisants d'origine aviaire, et le type toxinique. En effet, certaines volailles, comme les poulets, sont peu ou pas sensibles aux types mosaïque D/C et D alors que les bovins y sont très sensibles.

➤ Risque de contamination d'un élevage de bovins

Bien qu'elle soit amenée à décroître au cours du temps, la probabilité de contamination la plus forte [8] est celle résultant de la mise à l'herbe de bovins sur une pâture fertilisée avec de la litière ou du fumier de volaille, y compris dans le respect des mesures de biosécurité applicables dans les élevages de volailles, c'est-à-dire en respectant le délai de stockage de 42 jours avant épandage, d'autant que les bovins peuvent être attirés par les effluents de volailles. Cette probabilité est moins importante [3-7] avec le fumier de bovin. La probabilité de contamination est en outre réduite si l'épandage d'un fertilisant organique liquide a été effectué par injection directe dans le sol, par un système à disques ou à socs.

En deuxième rang, et malgré un éventail assez large des probabilités de contamination [1-7], on notera l'importance que peut revêtir l'exposition des bovins à des poussières ou aérosols émis à l'occasion des épandages sans enfouissement immédiat, des fertilisants d'origine aviaire. La probabilité de contamination peut s'élever à [7] avec les produits les plus pulvérulents lorsque les poussières ou aérosols poussés par le vent peuvent atteindre les sites où sont stationnés les bovins (aire d'exercice ouverte d'une stabulation ou pâturage). Le risque de contamination est en revanche évalué comme plus faible lors d'épandage de fertilisants d'origine bovine [1-5].

Se situent en troisième rang les fourrages enrubannés, ensilages d'herbe ou foin secs issus de végétaux récoltés sur des prairies permanentes ou temporaires fertilisées dans les conditions précédemment évoquées à propos des pâtures. Dans ce cas, la probabilité de contamination des bovins auxquels ils sont distribués est réduite à des valeurs comprises entre [1] et [4]. Cela suppose toutefois, en particulier pour l'enrubanné et l'ensilage d'herbe, des précautions à la récolte (absence de cadavres de petits animaux, éviter d'incorporer de la terre, ne pas piéger d'eau dans le fourrage, etc.) et lors de leur réalisation (acidification rapide, avec un pH final inférieur à 5). En cas d'enrubannage ou d'ensilage mal conduits, la probabilité de contamination des bovins nourris avec ces produits peut être importante, jusqu'à [8].

Enfin, les probabilités de contamination de bovins ayant consommé des végétaux (cultures fourragères, céréales, graines oléagineuses et protéagineuses) cultivés sur des terres où ont été épandus des fertilisants organiques contaminés par des *C. botulinum* du groupe III, se situent dans une fourchette assez large [1-7]. Les probabilités les plus basses concernent les végétaux produits sur des terrains fertilisés par injection ou enfouissement avant implantation des semis, récoltés sans terre et dépoussiérés, et conservés dans de bonnes conditions (bonne aération, non exposés à la pluie).

➤ Risque de contamination d'un élevage de volailles

Le risque de contamination le plus important touche les volailles en extérieur, notamment lorsque le parcours est exposé aux poussières et aérosols émis lors d'un épandage à proximité et sous le vent. Une fertilisation des parcours herbeux ne se justifie pas en présence des volailles, mais peut être réalisée, dans le cadre d'une pratique culturale appropriée et dans le respect des exigences réglementaires, lors de leur conception ou leur remise en état à chaque rotation. Les probabilités de contamination se situent dans une fourchette assez large, pouvant atteindre [7] en cas d'exposition à des poussières et aérosols émis lors de l'épandage de fertilisants organiques issus de foyers de botulisme aviaire, voire [8] si le parcours a été fertilisé avec ces mêmes catégories de produits.

L'épandage des fertilisants organiques issus de foyers de botulisme aviaire ou bovin sur des cultures destinées à l'alimentation animale (céréales, graines oléagineuses et protéagineuses, luzerne, etc.) peut entraîner un risque de contamination des volailles (en claustration ou ayant accès à un parcours extérieur).

Nonobstant, les différences liées à leur sensibilité respective aux types toxiques, les risques de contamination des volailles sont équivalents à ceux présentés pour les bovins.

➤ Risque inter-espèces

Les conséquences d'épandages d'effluents issus de foyers de botulisme, quelle que soit leur nature (effluents frais, après stockage durant plusieurs mois dans les conditions réglementaires, après compostage ou après méthanisation), soulèvent la question de la dispersion des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C dans l'espace agricole et du risque de contamination inter-espèces.

Le risque principal est celui de la contamination croisée entre les élevages bovins et aviaires, et notamment dans les élevages mixtes bovins-aviaires. Dans les élevages mixtes, le respect de mesures de biosécurité destinées à séparer les deux activités d'élevage est essentiel (par exemple : pas de stockage de fumier de volaille en pâture, pas de mise en pâture des bovins sur les parcours de volailles, etc.).

De plus, les éleveurs de volailles ne disposent pas toujours de terrains permettant l'épandage de la totalité des fumiers, fientes sèches ou lisiers qu'ils produisent, et doivent alors rechercher des surfaces d'épandage extérieures à leur exploitation. Il est habituel de ne pas conseiller l'épandage de fumiers, fientes sèches ou lisiers de volailles sur des pâtures ou des prairies de fauche destinés aux bovins, et cela doit être proscrit si ces effluents sont reconnus contaminés par des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C. En outre, la conversion de ces effluents par compostage ou digestion anaérobie, sans effet assainissant vis-à-vis des spores de *C. botulinum*, ne diminue pas le risque encouru.

La question du risque lié à l'épandage de matières organiques issues de foyers bovins ne doit pas être sous-estimée, notamment lorsque l'éleveur, faute de surfaces cultivables suffisantes n'a d'autre choix que d'épandre le fumier ou le lisier sur ses prairies. Le respect des bonnes pratiques agricoles (relatives aux épandages, à la réalisation des ensilages, etc.) est indispensable. En cas de risque avéré, la pratique de la vaccination des bovins avec des vaccins bivalents dirigés contre les toxines C et D est essentielle.

L'épandage avec des fertilisants organiques contaminés par des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C peut également permettre ou faciliter la contamination d'autres espèces, petits mammifères ou oiseaux sauvages, dont les cadavres ou les déjections peuvent être une source de contamination pour les animaux d'élevages.

➤ Recommandations sur les distances avec les élevages et l'épandage

L'épandage de fertilisants organiques issus de foyers de botulisme est propice à la propagation de poussières et aérosols, notamment lorsque le teneur de matières sèches est supérieur à 70 %. Outre les caractéristiques du fertilisant organique, plusieurs paramètres interviennent dans la dissémination des poussières dont le mode d'épandage, avec ou sans incorporation dans le sol, la température, le taux d'humidité, les turbulences, la vitesse et la direction du vent au cours de l'épandage. Il s'avère donc très difficile de définir une distance à faible risque entre le site d'épandage et la position des espèces animales sensibles.

Les effluents de volailles sont particulièrement incriminés dans la dispersion des spores et formes végétatives de *C. botulinum*. Une observation récente en France a montré le développement de la maladie chez des vaches dans une stabulation ouverte située à une distance de 150 à 250 mètres d'une zone d'épandage d'un fertilisant assez pulvérulent d'origine avicole.

Une distance supérieure à 400 m de la source d'émission des matières particulières est conseillée pour minimiser le risque de contamination de l'environnement des élevages.

L'incorporation immédiate du fertilisant dans le sol diminue (sans les supprimer) les émissions de poussières et aérosols et peut permettre de réduire d'un facteur de 10 à 100 la quantité de micro-organismes émise. Il est alors suggéré de privilégier certains équipements pour ces épandages, comme par exemple l'utilisation de rampes munies d'injecteurs ou de sabots, l'utilisation de rampe d'épandage équipée de tapis caoutchoutés pour plaquer le produit au sol ou l'utilisation de jupes en toile pour les épandeurs à disque.

Le respect des bonnes pratiques d'épandage en tenant compte des conditions météorologiques (épandages aux périodes de temps calme) est également essentiel pour limiter le risque botulique.

3.8.2.« Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »

Les humains exposés aux *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C (et leur toxine) présents dans les poussières et les aérosols émis durant l'épandage des fertilisants organiques sont d'abord les exploitants réalisant des épandages (exposition professionnelle), puis, en fonction des distances par rapport aux zones d'épandage et des conditions météorologiques, les riverains (exposition accidentelle). La voie de contamination est essentiellement liée aux possibilités d'inhalation, avec une probabilité de contamination de [1-7], en fonction du type d'effluent. Le risque de contamination des opérateurs exposés professionnellement est réduit par le port de vêtements de protection adaptée, et notamment de masques anti-poussières. Le risque de contamination des riverains diminue avec la distance par rapport au site d'épandage, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour les animaux d'élevage (distance supérieure à 400 m de la source d'émission des matières particulières). À cet égard les distances minimales entre sites d'épandage et résidence des riverains imposées par la réglementation ICPE notamment pour réduire les nuisances consécutives à l'émission des odeurs (au plus 100 m pour les effluents liquides épandus avec un matériel à palette ou à bus) sont insuffisantes pour prévenir tout risque de contamination.

Toutefois le risque de contamination des humains par *C. botulinum* du groupe III doit être relativisé en raison du mode d'exposition (exposition par inhalation et non par ingestion) et du

fait de la très faible sensibilité des êtres humains aux neurotoxines C, D, mosaïques C/D et D/C. Ainsi, le risque de développement de la maladie reste très limité.

3.8.3.« Lors de l'épandage du fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

La contamination des végétaux produits sur un sol où ont été épandus des fertilisants organiques ou contaminés par des poussières émises lors d'un épandage à proximité peut résulter, soit du dépôt de *C. botulinum* en surface de la plante, soit de son internalisation dans certaines parties de la plante. La possibilité d'une internalisation, déjà décrite avec certaines bactéries pathogènes, et bien qu'envisagée pour des *C. botulinum* du groupe III, reste à démontrer dans les conditions de terrain. Ainsi, les experts du GT ont considéré uniquement la probabilité de contamination en surface des parties consommées du végétal. C'est le cas des parties aériennes directement exposés au fertilisant en cas d'épandage sur la culture ou des parties racinaires, dont la rhizosphère peut constituer un environnement favorable à la persistance de certaines bactéries pathogènes. Leur contamination peut être aussi consécutive à la persistance de terre sur les bulbes et racines après déterrage ou, à la suite d'un fauchage trop ras par exemple, sur les feuilles. Une contamination en surface des végétaux par des poussières contenant l'agent pathogène lors de la récolte peut être aussi incriminée.

Le risque pour la consommation animale de ces végétaux a été précédemment présenté. Il est plus significatif, en élevage bovin, pour les fourrages produits sur des surfaces traitées avec des fertilisants issus d'élevages avicoles.

Les probabilités de contamination des consommateurs humains ont été estimées de [0] pour les produits issus de grandes cultures (cultures céréalières, oléagineux, betteraves sucrières, etc.) à [1-4] pour les productions maraîchères. Dans ce dernier cas, certaines conditions de fertilisation réduisent le risque de contamination, à savoir : la préférence pour les composts, l'apport des fertilisants plusieurs mois avant semis avec enfouissement et l'absence d'apport sur légumes feuilles ou légumes fruits dans les semaines précédant la récolte, ainsi que les modalités de préparation des produits (lavages).

La probabilité de contamination la plus élevée concerne les conserves de végétaux en cas de défaut de maîtrise du procédé (par exemple dans le cas de productions familiales ou artisanales). En effet, la germination des spores, la croissance des bactéries et la production de toxines peuvent survenir en cas de non-respect des barèmes de stérilisation, de fermentations lactiques insuffisamment acides ou lorsque des végétaux sont inclus dans des préparations insuffisamment chauffées et/ou non réfrigérées. Malgré tout, comme précédemment indiqué, la faible sensibilité des humains aux toxines de type C, D, mosaïques C/D ou D/C rend le risque de développement de la maladie très limité.

3.9. Conclusions du groupe de travail

En France, les foyers de botulisme identifiés ces 20 dernières années dans les élevages bovins (une dizaine de foyers détectés chaque année) et aviaires (une trentaine de foyers par an) sont exclusivement causés par des *C. botulinum* du groupe III, correspondant aux types toxiques C, D et mosaïques C/D et D/C. Un problème important rencontré dans la gestion de ces foyers concerne les possibilités de décontamination et de leur efficacité, en particulier vis-à-vis des effluents (déjections et eaux résiduaires) d'élevage contaminés.

Le GT souligne que les conclusions rapportées ici s'appuient sur les données peu nombreuses de la littérature scientifique, le résultat des investigations menées, notamment par le LNR (en appui aux équipes intervenant sur le terrain, à la suite de la détection des foyers de botulisme) et, pour l'évaluation des risques en rapport avec les épandages des effluents contaminés, sur une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale (Afssa,2008). L'interprétation des données est toutefois limitée par les difficultés, sources d'incertitudes, rencontrées pour la recherche de ces bactéries et leurs toxines dans les matrices environnementales, avec en plus, pour les *C. botulinum* du groupe III, y compris dans le cadre du diagnostic, l'absence de norme et consensus méthodologique pour leur détection et leur caractérisation. S'y ajoutent le fait que la plupart des données disponibles sont qualitatives et non quantitatives, ainsi que la méconnaissance des quantités de *C. botulinum* du groupe III et/ou de toxines devant être ingérées pour permettre le développement du botulisme, tant chez les animaux que chez les humains.

Les opérations de nettoyage-désinfection des locaux et matériels contaminés, si elles impliquent le choix d'un désinfectant dont l'activité sporicide est validée dans le contexte d'une utilisation en élevage, la réalisation de deux opérations de désinfection successives et des contrôles d'efficacité montrant la disparition de la bactérie, pourraient être assez bien maîtrisés. Le GT attire toutefois l'attention sur le fait qu'au moment de la rédaction du rapport, il n'y a pas de produit disposant d'une AMM pérenne qui revendique une activité sporicide dans le domaine vétérinaire (TP3), ce qui complique le choix des produits à utiliser pour la désinfection dans les élevages atteints de botulisme.

Le GT souligne que la question de la décontamination des effluents d'élevage (élimination des formes sporulées de *C. botulinum*) est encore plus problématique. En effet, les études disponibles montrent que ni un stockage prolongé, ni le compostage, ni la méthanisation (y compris lorsque les effluents sont soumis à l'étape d'hygiénisation/pasteurisation) ne permettent d'obtenir un assainissement complet des effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme animal.

Quant aux procédés chimiques, le seul pour lequel des données d'efficacité sont disponibles est le traitement à la chaux par la méthode du « mille-feuilles », préconisé notamment pour le fumier contaminé. Cette méthode permet de diminuer le volume de l'effluent traité par effet de combustion, diminuant ainsi indirectement la quantité de *C. botulinum* sans toutefois l'éliminer totalement. En cas d'épandage d'effluents contaminés pour la fertilisation des sols, il est donc nécessaire d'en évaluer le risque en découlant pour les animaux et les humains exposés, soit à la suite de l'ingestion de végétaux cultivés sur les zones d'épandage, soit après exposition à des poussières ou aérosols émis lors de ces épandages.

Il ressort d'abord, sans sous-estimer l'impact éventuel des effluents contaminés d'origine bovine, que les fumiers, fientes et lisiers issus des foyers de botulisme aviaire sont les effluents les plus à risques, par leur charge plus élevée en *C. botulinum*, et pour les effluents solides, par leur taux d'humidité plus faible et leur structure plus propice à l'émission de poussières et aérosols. Il faut garder aussi à l'esprit que les bovins sont particulièrement sensibles à certains types toxiques, comme le type mosaïque D/C auxquels certaines volailles (*Gallus gallus* en particulier) sont peu ou pas sensibles, et de ce fait peuvent être révélateurs d'une circulation inapparente de *C. botulinum* dans un élevage avicole. Dans ce double contexte, les bovins en élevage mixte bovin-aviaire sont particulièrement exposés. Ainsi, afin de limiter le risque de contamination croisée, les experts soulignent l'importance d'un nettoyage et d'une désinfection systématiques des matériels utilisés dans le transport et la manipulation des effluents.

Les évaluations du GT indiquent une probabilité élevée de contamination, estimée avec une incertitude « faible », des bovins mis à l'herbe sur une pâture fertilisée avec des produits organiques issus d'élevages avicoles contaminés, et également des bovins exposés aux poussières et aérosols émis lors d'épandages sans enfouissement immédiat ou injection de ces produits dans le sol. De ce fait, le risque de développement du botulisme chez ces animaux est important. Ce risque diminue lorsque les bovins sont alimentés avec des fourrages récoltés et conservés dans de bonnes conditions. En aviculture, les évaluations indiquent une probabilité élevée, estimée avec une incertitude « faible », de contamination des volailles sur parcours, qu'elle résulte d'un apport sur les sols de fertilisants organiques contaminés ou d'une exposition à des poussières et aérosols véhiculant la bactérie. La probabilité de contamination liée à l'alimentation des animaux, bovins ou volailles par des végétaux issus des grandes cultures est la plus faible, en particulier : (i) si les fertilisants ont été épandus avec enfouissement avant réalisation des semis ou plantations, (ii) si les végétaux ont été récoltés en limitant l'apport de terre et (iii) en recherchant en particulier pour les productions à la ferme, des conditions de stockage des produits végétaux propres à réduire les risques de contamination secondaire (par l'avifaune notamment) et à limiter les possibilités de germination des spores botuliques éventuellement présentes.

La probabilité de contamination des humains peut être assez élevée pour des opérateurs et riverains exposés aux poussières et aérosols émis durant les épandages (en particulier s'il s'agit de fertilisants issus d'élevages avicoles contaminés). Par ailleurs, du fait des pratiques culturales, la probabilité de contamination est très faible pour les consommateurs de produits maraîchers crus cultivés sur des sols fertilisés avec des effluents d'animaux d'élevage contaminés par *C. botulinum*.

Le risque de développement du botulisme humain demeure très limité en raison de la faible sensibilité de l'être humain au *Clostridium* de type C, D et mosaïque C/D et leurs toxines, et de la faible possibilité de développement du botulisme par inhalation.

Toutefois, le GT considère que la faible sensibilité des humains aux *C. botulinum* du groupe III ne peut justifier l'épandage de fertilisants reconnus comme contaminés par ces agents pathogènes sur des cultures légumières.

3.10. Recommandations du groupe de travail

En réponse aux questions de la saisine et en cas de foyer de botulisme, les experts du GT rappellent l'importance de respecter les exigences de la réglementation environnementale, et recommandent en particulier :

- de réaliser une décontamination renforcée des élevages foyers avec l'utilisation des produits adaptés ;
- de ne pas considérer les épandages comme un moyen d'élimination acceptable des effluents lorsque le risque lié à leur contamination par certains agents pathogènes ne peut être maîtrisé. En effet, les épandages des effluents d'élevage doivent être des actes réfléchis tenant compte de leur valeur fertilisante, du niveau de fertilité des sols et des besoins des cultures (qui diffèrent selon les végétaux et leur stade de croissance) ;
- si la solution de l'épandage des effluents issus du foyer de botulisme est retenue :
 - de choisir un matériel d'épandage adapté (pour réduire les émissions de poussières et aérosol), et de privilégier l'injection dans le sol ou l'enfouissement immédiat des effluents contaminés ;

- de respecter des distances suffisantes (au moins 400 mètres pour les effluents d'origine avicole) par rapport aux pâtures et parcours fréquentés par les animaux d'élevage ou aux stabulations bovines ouvertes ainsi qu'aux habitations et zones d'activité humaines ;
- de proscrire les épandages par vent fort ;
- de privilégier les épandages sur des grandes cultures et d'en exclure les prairies (y compris si cela est possible les prairies de fauche) et les parcours ;
- de ne pas épandre de fertilisants reconnus comme contaminés par *C. botulinum* sur des cultures légumières même si le risque pour l'être humain est très limité ;
- d'encourager la vaccination des bovins dans les élevages mixtes et dans toute situation où ils sont exposés.

À ces recommandations s'ajoute la nécessité du port de masque anti-poussières pour les opérateurs réalisant les épandages.

En complément de ces recommandations et avant de privilégier les solutions qui pourraient être disproportionnées et coûteuses telles que l'incinération ou une transformation par stérilisation sous pression prévues par le règlement n°1069/2009/CE, il convient :

- de pallier le manque de données en favorisant les recherches afin de préciser les niveaux de contamination des différents types d'effluents issus d'élevages contaminés par les *C. botulinum* du groupe III et leurs toxines ;
- de mieux connaître le devenir de ces bactéries dans les sols agricoles à la suite des épandages (dans le sens des études actuellement menées dans le cadre du projet BOTUSOL) ;
- de définir des concentrations bactériennes maximales admissibles au-delà desquelles les épandages devraient être exclus ;
- de mieux étudier les méthodes de décontamination de ces effluents.

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail endosse les conclusions des CES SABA, BIOCIDES, BIORISK et EAUX et du GT « Botulisme décontamination ».

La décontamination de locaux d'élevage contaminés peut être efficacement réalisée par l'application d'une procédure renforcée de nettoyage et de désinfection, s'appuyant sur au moins deux opérations de désinfection successives, la réalisation de contrôles de leur efficacité et l'utilisation d'un désinfectant sporicide adapté. Toutefois, à ce jour, aucun produit biocide sporicide, dont l'activité aurait été validée dans le contexte d'une utilisation en élevage (TP3), ne dispose d'une AMM pérenne. L'Agence recommande que des actions soient menées vers les metteurs sur le marché des produits biocides en TP3 pour éviter une situation d'impasse à terme.

Par ailleurs, ni le stockage, ni le compostage, ni la méthanisation (y compris avec l'étape d'hygiénisation/pasteurisation), ni le traitement à la chaux ne permettent la décontamination des effluents d'élevage, des spores de *C. Botulinum* pouvant persister à l'issue de la mise en œuvre de ces procédés d'inactivation.

Les effluents issus d'un foyer de botulisme présentent un risque réel de contamination par *C. Botulinum* et leur épandage ne devrait être envisagé que dans des conditions particulières

et n'être mis en œuvre que dans le respect des bonnes pratiques de l'épandage, comme souligné dans cet avis. Un tel épandage gagnerait à être encadré, notamment par une limite supérieure en concentration bactérienne dans les effluents. Néanmoins les données disponibles ne permettent pas de définir les concentrations bactériennes maximales au-delà desquelles une telle interdiction serait nécessaire.

L'agence recommande la mise en place de projets de recherche afin de générer des données quantitatives sur les niveaux de concentrations en formes végétatives ou sporulées de *C. botulinum* de type C, D et mosaïques C/D et D/C ou en toxine botulique dans les effluents issus des élevages foyers de botulisme. Elle recommande également que ces projets de recherche soient menés en vue d'évaluer les doses infectantes et la forme de contamination (spores, cellules végétatives, toxine) vis-à-vis des bovins, des volailles ou de l'être humain.

Dr Roger Genet

MOTS-CLÉS

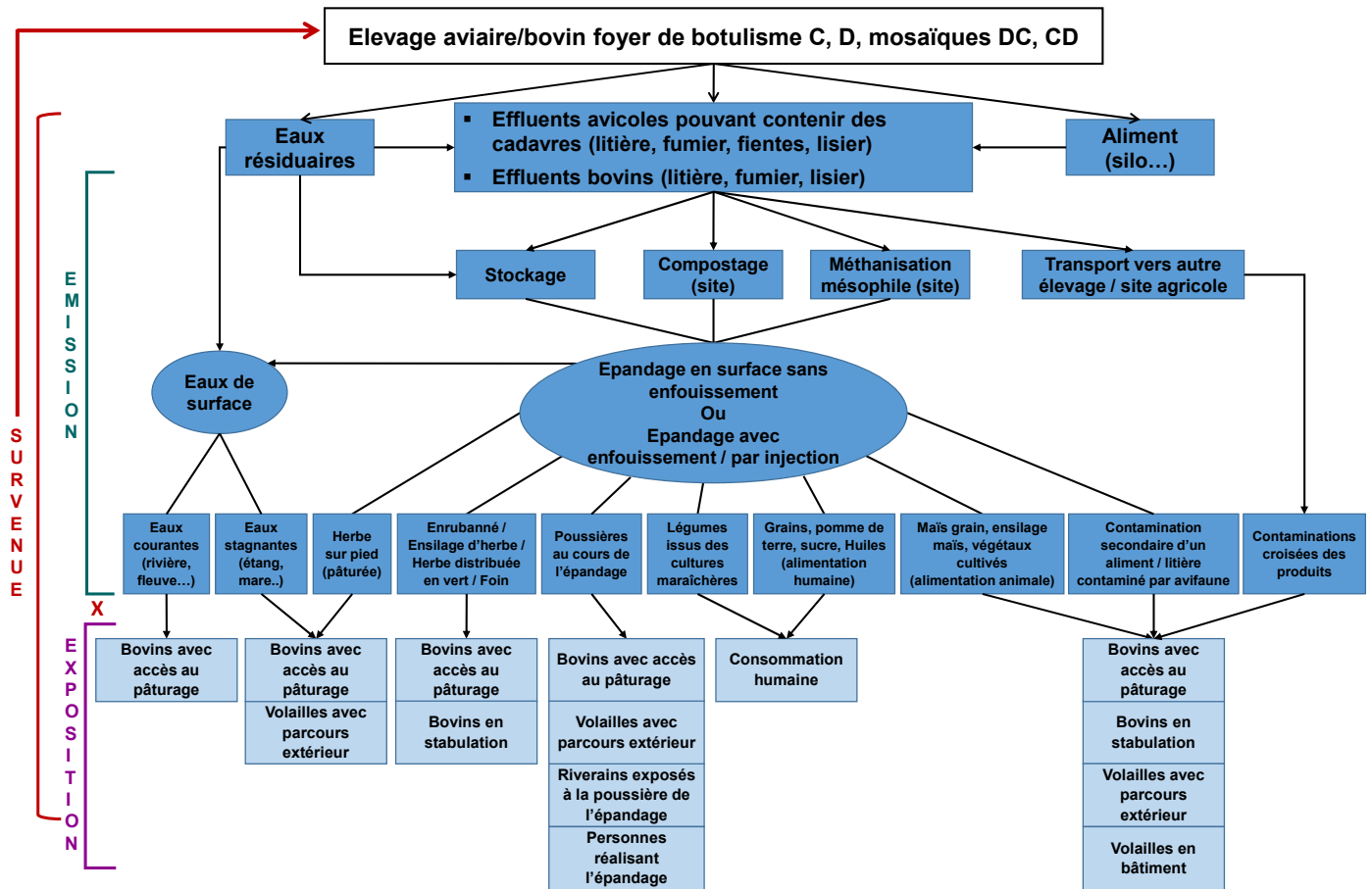
Botulisme, *C. botulinum* du groupe III, bovins, volailles, sous-produits animaux, fertilisants organiques d'origine animale, bioaérosols, nettoyage, décontamination, désinfection, sporicides, évaluation qualitative de risque.

Botulism, C. botulinum group III, cattle, poultry, animal by-products, organic fertilizers of animal origin, bioaerosols, cleaning, decontamination, disinfection, sporicides, qualitative risk assessment.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2022). Avis relatif à l'évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire (saisine n°2019-SA-0113). Maisons-Alfort : Anses, 20 p. Cet avis est associé à un rapport d'expertise collective.

ANNEXE 1 : SCHEMA EVENEMENTIEL



Évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire

Saisine « 2019-SA-0113 »

Saisines liées n°2019-SA-0112 à 0115 (Rapport socle botulisme)

RAPPORT d'expertise collective

Comité d'experts spécialisé « Santé et bien-être des animaux »

Groupe de travail « Botulisme décontamination »

Mai 2022

Citation suggérée

Anses. (2022). Évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux lors des cas de botulisme bovin et aviaire. (saisine 2019-SA-0113). Maisons-Alfort : Anses, 155 p.

Mots clés

Botulisme, *C. botulinum* du groupe III, bovins, volailles, sous-produits animaux, fertilisants organiques d'origine animale, bioaérosols, nettoyage, décontamination, désinfection, sporicides, évaluation qualitative de risque.

Botulism, C. botulinum group III, cattle, poultry, animal by-products, organic fertilizers of animal origin, bioaerosols, cleaning, decontamination, disinfection, sporicides, qualitative risk assessment.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

GROUPE DE TRAVAIL

Président

M. Jean-Pierre GANIÈRE – Professeur retraité, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Microbiologie, biocides, maladies réglementées, évaluation des risques.

Membres

M. Matthieu FOURNIER – Maître de conférences – Université de Rouen, UMR CNRS M2C 6143 – Hydrogéologie, transfert biotique.

M. Alain HARTMANN – Directeur de recherche INRAE – Gestion des microflore bactériennes telluriques, écologie microbienne des sols.

M. Didier HILAIRE – Adjoint au chef de la division Biologie, Centre d'études du Bouchet – DGA (Direction générale de l'armement) – Bioterrorisme, toxinotype de *C. botulinum*, décontamination, aérobiocontamination.

Mme. Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU – Cheffe d'unité adjointe, unité Épidémiologie, Santé et Bien-être (EPISABE), Laboratoire de Ploufragan/ Plouzané/Niort Anses – Épidémiologie, analyse de données, santé travail.

Mme. Caroline LE MARÉCHAL-CONDY – Responsable du LNR botulisme aviaire, Ploufragan/Plouzané/Niort-Anses – Botulisme aviaire et bovin, diagnostic.

Mme. Anne-Marie POURCHER – Directrice de recherche INRAE, Unité OPAALE (Optimisation des Procédés en Agriculture, Agroalimentaire et Environnement) – Microbiologie sanitaire, eaux et environnement.

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire – Épidémiologie, biosécurité, zoonoses.

RAPPORTEURS

M. Frédéric CARLIN – Directeur de recherche INRAE, UMR408 Sécurité et Qualité des produits d'origine végétale – Université d'Avignon – *Clostridium*, produits végétaux, effets des procédés, microbiologie prévisionnelle.

COMITÉS D'EXPERTS SPÉCIALISÉS

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par les CES suivants :

- CES « Santé et bien-être des animaux » (SABA)

Président

M. Gilles MEYER – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse – Virologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants.

Membres

Mme Catherine BELLOC – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Infectiologie, approche intégrée de la santé animale, maladies des monogastriques.

M. Stéphane BERTAGNOLI – Professeur, École Nationale Vétérinaire de Toulouse – Virologie, immunologie, vaccination, maladies des lagomorphes.

M. Alain BOISSY – Directeur de Recherche INRAE Clermont-Ferrand, Theix – Bien-être animal.

M. Henri-Jean BOULOUIS – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Bactériologie, diagnostic de laboratoire, immunologie, vaccinologie.

M. Éric COLLIN – Vétérinaire libéral – Médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies vectorielles, maladies à prion, épidémiologie, maladies des ruminants.

M. Jean-Claude DESFONTIS – Professeur, Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes) – physiologie animale, bien-être animal, médicament vétérinaire.

Mme Maria-Eleni FILIPPITZI – Vétérinaire épidémiologiste, SCIENSANO (B) – Épidémiologie quantitative, évaluation de risque.

M. David FRETIN – Chef de service de bactériologie vétérinaire, SCIENSANO (B) – Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire, LNR tuberculose en Belgique.

Mme Emmanuelle GILOT-FROMONT – Professeur, VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon – Épidémiologie quantitative, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques, maladies réglementées.

M. Étienne GIRAUD – Chargé de recherche, INRAE Toulouse – Bactériologie, antibiorésistance, maladies des poissons.

M. Lionel GRISOT – Vétérinaire libéral – Médecine vétérinaire, médicament vétérinaire, maladies des ruminants.

Mme Nadia HADDAD – Professeur, École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Infectiologie, maladies réglementées, zoonoses.

Mme Viviane HENAU – Cheffe d'unité adjointe, Unité épidémiologie et appui à la surveillance, Anses Lyon – Epidémiologie quantitative, évaluation de risque.

Mme Elsa JOURDAIN – Chargée de recherche, INRAE Clermont-Ferrand, Theix – Zoonoses, épidémiologie, interface faune sauvage-animaux domestiques.

Mme Sophie LE BOUQUIN-LENEVEU – Cheffe d'unité adjointe, Unité épidémiologie, santé et bien-être, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – Épidémiologie, évaluation de risque, approche intégrée de la santé animale.

Mme Sophie LE PODER – Maître de conférences, École Nationale Vétérinaire d'Alfort – Virologie, immunologie, vaccinologie.

Mme Élodie MONCHATRE-LEROY – Directrice du laboratoire de la rage et de la faune sauvage, Anses Nancy – Virologie, épidémiologie, évaluation de risques, faune sauvage.

Mme Monique L'HOSTIS – Professeur retraitée, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Parasitologie, santé des abeilles.

M. François MEURENS – Professeur, Oniris (Ecole Nationale Vétérinaire de Nantes) – Virologie, immunologie, vaccinologie, pathologie porcine.

M. Pierre MORMEDE – Directeur de recherche émérite INRAE – Bien-être animal, stress.

Mme Carine PARAUD – Chargée de projet de recherche en parasitologie, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – Parasitologie, maladies des ruminants.

Mme Ariane PAYNE – Chargée d'étude, ONCFS – Épidémiologie, évaluation de risque, interface faune sauvage-animaux domestiques.

M. Michel PÉPIN – Professeur, VetAgro Sup – Campus vétérinaire de Lyon – Infectiologie, immunologie, vaccinologie, maladies des ruminants.

Mme Carole PEROZ – Maître de conférences, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Infectiologie, maladies réglementées, approche intégrée de la santé animale.

Mme Claire PONSART – Chef de l'unité des zoonoses bactériennes, Laboratoire de Santé Animale, Anses Maisons-Alfort – Bactériologie, zoonoses, diagnostic de laboratoire.

M. Claude SAEGERMAN – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Liège – Épidémiologie, évaluation de risque.

Mme Gaëlle SIMON – Cheffe d'unité adjointe, Unité virologie immunologie porcines, Anses Ploufragan-Plouzané-Niort – Virologie, immunologie, maladies des monogastriques.

M. Jean-Pierre VAILLANCOURT – Professeur, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal – Épidémiologie, biosécurité, zoonose, évaluation de risque.

■ CES « Évaluation des risques biologiques liés aux aliments » (BIORISK)

Président

M. Philippe FRAVALO – Professeur, Conservatoire National des arts et métiers – Hygiène et microbiologie des aliments, méthodes de détection, de quantification et de caractérisation des micro-organismes, écologie des écosystèmes microbiens en agro-alimentaire.

Membres

Frédéric AUVRAY – Ingénieur de recherche, École nationale vétérinaire de Toulouse – Biologie moléculaire, génétique microbienne, bactériologie.

M. Mickaël BONI – Vétérinaire en chef, Chef d'unité, Institut de recherche biomédicale des armées – Microbiologie, hygiène, salubrité et qualité des aliments, zoonose et infectiologie, sûreté sanitaire des aliments et de l'eau, inspection en sécurité sanitaire des aliments, traitement et contrôle sanitaire des EDCH.

M. Frédéric CARLIN – Directeur de recherche, INRAE – Bactéries sporulées, produits végétaux, microbiologie prévisionnelle.

Mme Catherine CHUBILLEAU – Praticien hygiéniste – Chef de service – Centre hospitalier de Niort – Épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, hygiène.

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – Professeur, AgroParisTech – Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation des micro-organismes au stress (conservateurs, désinfectants).

M. Steven DURET – Ingénieur de recherche, Irstea – Modélisation, génie des procédés, transfert thermique.

M. Michel FEDERIGHI – Professeur, Oniris (École Nationale Vétérinaire de Nantes) – Microbiologie, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers.

Mme Michèle GOURMELON – Chargée de recherche, IFREMER – Bactériologie, biologie moléculaire, écologie microbienne – *Campylobacter*, bactéries du continuum terre-mer et bactéries marines.

M. Michel GAUTIER – Professeur, Agrocampus Ouest – Microbiologie et hygiène des aliments, biologie moléculaire, bactériophages, aliments fermentés.

M. Stéphane GUYOT – Maître de conférences, AgroSup Dijon – Procédés de destruction des bactéries pathogènes, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux.

Mme Nathalie JOURDAN-DA SILVA – Chargée de projet scientifique, Santé publique France – Epidémiologie des maladies entériques et zoonoses.

M. Renaud LAILLER – Chef de projet, Laboratoire de sécurité des aliments, Anses – Surveillance, *Salmonella*, hygiène des aliments.

M. Bertrand LOMBARD – Chef de projet, Direction de la Stratégie et des Programmes, Anses – Analyse microbiologique des aliments, activités de référence, normalisation.

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Chargée de projet scientifique, Laboratoire de sécurité des aliments, Anses – Virologie, méthodes de détection.

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – Ingénieur de recherche, INRAE – Appréciation quantitative du risque microbiologique, statistiques appliquées.

M. Éric OSWALD – Professeur, CHU Toulouse – Infectiologie clinique, écologie microbienne, *Escherichia coli*.

M. Pascal PIVETEAU – Chercheur, INRAE – Écologie microbienne, écologie des bactéries pathogènes dans les agroenvironnements.

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Professeur, Université Montpellier – Mycologie, écologie microbienne, biotechnologie.

Mme Nalini RAMA RAO – Directrice de recherche, INRAE – Microbiologie, interaction hôte/pathogène, microbiote intestinal.

Mme Régine TALON – Directrice de recherche, INRAE – Microbiologie des aliments, écologie microbienne, aliments fermentés d'origine animale.

Mme Muriel THOMAS – Directrice de recherche, INRAE – Microbiote intestinal et santé humaine, physiologie.

Mme Isabelle VILLENA – Professeur, CHU Reims – Parasitologie, infectiologie.

■ CES « Substances et produits biocides »

Président

M. Georges DE SOUSA – Ingénieur de Recherche, INRAE – Toxicologie, méthodologie *in vitro*, perturbateurs endocriniens, cinétique.

Membres

M. Olivier ADAM – Dirigeant chez Hydrobio Conseil – Écotoxicologie, produits biocides TP8.

M. Alain AYMARD – Ingénieur et enquêteur retraité de la DGCCRF – Réglementation, classification et étiquetage.

M. Jean-Christophe CAHUZAC, vice-président – Ingénieur des Laboratoires du Ministère des Finances, Responsable de la section de produits chimiques, biocides et substances dangereuses – Physico-chimie, méthodes d'analyse, formulation, réglementation.

M. James DEVILLERS – Directeur de CTIS – Écotoxicologie, QSAR, entomologie, LAV.

M. Pierre GREVE – Professeur, Université de Poitiers – Perturbateurs endocriniens, différenciation sexuelle, reprotoxicité (faune), microbiologie, écotoxicologie des sols, tests comportementaux.

M. Philippe HARTEMANN – Professeur de Santé Publique retraité – Microbiologie, désinfectants, hygiène.

Mme Claire HELLIO – Professeur, Université de Bretagne Occidentale – Écologie, biotechnologie marine, biochimie marine.

Mme Dominique PESSEL – Chef d'unité, Fougères, Anses – Physico-chimie analytique, résidus médicaments vétérinaires, résidus de biocides désinfectants.

M. Vincent RICHARD – Ingénieur de recherche chez DIRECCTE Haute Normandie – Chimie, risque chimique, sécurité au travail, réglementation chimique.

M. Christophe SOUMET – Ingénieur de recherche, Chef d'unité AB2R, Fougères, Anses – Microbiologie, désinfectants, résistance.

■ CES « Eaux »

Président

M. Gilles BORNERT – Chef de service, Groupe vétérinaire des armées de Rennes – Microbiologie, réglementation, situations dégradées, water defense.

Vice-présidents

M. Jean-François HUMBERT – Directeur de recherche, UMR BIOENCO, INRAE, Paris – Microbiologie de l'eau dont cyanobactéries, écologie microbienne.

Mme Anne TOGOLA – Chef de projet de recherche, Bureau de recherche géologiques et minières (BRGM) – Micropolluants organiques, chimie analytique, eaux souterraines.

Membres

M. Jean BARON – Ingénieur de recherche, Responsable de département, Eau de Paris – Matériaux au contact de l'eau, produits et procédés de traitement de l'eau (filiales de traitement), corrosion.

M. Jean-Luc BOUDENNE – Professeur, Université Aix-Marseille, Laboratoire Chimie de l'environnement – Métrologie des eaux, chimie et qualité des eaux.

M. Nicolas CIMETIERE – Enseignant chercheur, École nationale supérieure de chimie de Rennes (ENSCR) – Analyse et traitement des eaux (EDCH, micropolluants organiques).

Bruno COULOMB – Maître de conférences, Université Aix-Marseille, Laboratoire Chimie de l'environnement – Contaminants chimiques, méthodes d'analyse, devenir des contaminants.

M. Christophe DAGOT – Professeur, Directeur de département, Université de Limoges, UMR Inserm 1092, RESINFIT – Antibiorésistance (intégrons, génie des procédés), qualité des effluents (antibiotiques et bactéries résistantes).

Mme Sabine DENOOZ – Expert process et qualité de l'eau, La société wallonne des eaux – Produits et procédés de traitement de l'eau (EDCH), plans de gestion de la sécurité sanitaire des eaux (PGSSE), expertise technique.

Mme Isabelle DUBLINEAU – Chargée de mission auprès du directeur de la radioprotection de l'Homme, habilité à diriger des recherches (HDR), Institut de radioprotection et de sûreté nucléaire (IRSN) – Toxicologie, radioéléments.

M. Frédéric FEDER – Directeur de l'unité « Recyclage et risque », Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement (CIRAD) – Géochimie, transfert des contaminants eau/sol/plante, évaluation des risques environnementaux, analyses des eaux, sols et végétaux, réutilisation des eaux usées traitées (REUT).

M. Matthieu FOURNIER – Maître de conférences HDR en Géosciences, Université Rouen Normandie – Hydrogéologie, hydrologie, EDCH, transfert et devenir des micro-organismes dans l'environnement, modélisation, risques sanitaires.

M. Stéphane GARNAUD-CORBEL – Chargé de mission recherche « Eau, biodiversité et aménagement urbain », Office français de la biodiversité (OFB) – Assainissement, gestion intégrée des eaux pluviales, traitement des boues, utilisation d'eaux non conventionnelles.

Mme Nathalie GARREC – Ingénieur recherche expertise, Centre scientifique et technique du bâtiment (CSTB) – Microbiologie de l'eau, pathogènes opportunistes, efficacité des biocides.

M. Johnny GASPÉRI – Chercheur, Université Gustave Eiffel – Micropolluants organiques, eaux urbaines, eaux de surface, traitements des eaux usées.

M. Julio GONÇALVÈS – Professeur, Centre européen de recherche et d'enseignement en géosciences de l'environnement (CEREGE), Aix en Provence – Hydrogéologie, ressources en eaux, transfert de contaminants dans les nappes, modélisation, recharge.

M. Jean-Louis GONZALEZ – Chercheur, HDR, Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer (IFREMER) – Milieu marin, contaminants chimiques, spéciation, modélisation, échantillonnages passifs.

M. Olivier HORNER – Directeur de la Formation, École nationale supérieure de chimie de Paris (ENSCP), Chimie ParisTech – Chimie de l'eau, traitement des eaux.

M. Michel JOYEUX – Professeur retraité – Médecine, toxicologie, évaluation quantitative du risque sanitaire, méthodes d'analyse des dangers, chimie de l'eau, produits et procédés de traitement des EDCH, santé environnement.

M. Jérôme LABANOWSKI – Chargé de recherche, CNRS, Université de Poitiers, UMR CNRS 7285 IC2MP, École Nationale Supérieure d'Ingénieurs de Poitiers – Qualité des effluents, biofilm en rivière, sédiments, devenir des contaminants effluents-rivière.

Mme Sophie LARDY-FONTAN – Chef de projet en métrologie, LNE, Paris – Métrologie, chimie analytique, micropolluants, ultratrace, assurance qualité/contrôle qualité (QA/QC).

Mme Françoise LUCAS – Enseignant-chercheur, Université Paris-Est Créteil – Virologie, écologie microbienne, indicateurs de contamination fécale, bactériophages, mycobactéries, virus entériques, eaux usées et pluviales.

M. Christophe MECHOUK – Chef de division « Études et construction », Service de l'eau de la ville de Lausanne – Ingénierie de l'eau (eau potable, eaux usées, eau de process, piscine), traitement de l'eau (procédés), physico-chimie et microbiologie de l'eau, micropolluants.

M. Laurent MOULIN – Responsable du département recherche et développement, eau de Paris – Microbiologie, virologie, traitements de désinfection, amibes.

M. Damien MOULY – Épidémiologiste, responsable d'unité en charge de surveillance des épidémies d'origine hydrique, Santé Publique France – Risques infectieux, risques chimiques, PGSSE, épidémiologie, évaluation des risques sanitaires, expologie, surveillance, alerte.

Mme Fabienne PETIT – Professeur, Université de Rouen, UMR CNRS M2C – Écologie microbienne, Evaluation du risque microbiologique dans les milieux aquatiques.

Mme Catherine QUIBLIER – Maître de Conférences HDR, Université Paris Diderot, Museum National d'Histoire Naturelle – Écologie et toxicité des cyanobactéries planctoniques et benthiques, surveillance.

Mme Pauline ROUSSEAU-GUEUTIN – Enseignante chercheuse, École des hautes études en santé publique (EHESP) – Hydrogéologie, hydrologie, transferts des contaminants, périmètres de protection de captage, PGSSE.

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT – Professeur, Université Clermont-Auvergne, Faculté de Pharmacie, Clermont-Ferrand – Santé publique et environnement, épidémiologie, évaluation de risques sanitaires.

Mme Michèle TREMBLAY – Docteur en médecine spécialiste en santé communautaire, Médecin conseil en santé au travail et en maladies infectieuses, Institut de santé publique du Québec, Direction de santé publique de Montréal – Santé travail, microbiologie de l'eau.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

Saisine transversale ayant impliqué les unités ci-dessous :

- Direction de l'évaluation des risques (DER) – Unité d'évaluation des risques liés au bien-être, à la santé et à l'alimentation des animaux, et aux vecteurs (UBSA_{2V})
 - Mme Charlotte DUNOYER – Cheffe d'unité jusqu'en décembre 2021
 - Mme Florence ETORE – Cheffe d'unité
 - M. Ali JAFFAL – Coordinateur scientifique
 - Mme Nibangue LARE – Coordinatrice scientifique jusqu'en décembre 2021
- DER – Unité d'évaluation des risques liés aux aliments (UERALIM)
 - Mme Pauline KOOH – Cheffe de projets scientifiques
- DER – Unité d'évaluation des risques liés à l'eau (UERE)
 - Mme Carole CATASTINI – Cheffe de projets scientifiques
- Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) – Unité d'évaluation de l'Efficacité des Biocides (U2EB)
 - Mme Nabila HADDACHE – Cheffe de projets scientifiques

Contribution scientifique

Mme Isabelle ATTIG – Cheffe d'unité – Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) – Unité d'évaluation de l'Efficacité des Biocides (U2EB).

M. Jean-Rémi DUMENIL – Référent Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Cultures – Direction de l'évaluation des produits réglementés (DEPR) – Unité de Coordination des Intrants du Végétal (UCIV).

Secrétariat administratif

M. Régis MOLINET – Anses

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

Direction Départementale en charge de la Protection des Populations des Côtes d'Armor

M. Yann VILLAGGI – Chef de service surveillance sanitaire et protection animales - DDPP Côtes d'Armor.

Direction Générale de l'Alimentation (DGAL)

Mme Christèle MATHONIERE – Chargée d'étude des sous-produits animaux au Bureau de la Prévention des Risques Sanitaires en Élevage (BPRSE) - DGAL.

GDS Bretagne

M. Grégoire KUNTZ – Vétérinaire-conseil (réfèrent technique botulisme) à GDS Bretagne et Innoval.

M. Félix MAHÉ – Réfèrent technique (aviculture et pisciculture et biosécurité en élevages) à GDS Bretagne et Innoval.

SOMMAIRE

Présentation des intervenants	3
Sigles et abréviations	14
Liste des tableaux	16
Liste des figures	17
1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise	18
1.1 Contexte	18
1.2 Objet de la saisine	19
1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation.....	19
1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts	20
2 Introduction : effluents d'élevage (définitions, réglementation)	21
2.1 Effluents d'élevage	21
2.1.1 Déjections des animaux, avec ou sans litière	21
2.1.2 Eaux résiduaires des élevages.....	22
2.2 Réglementation environnementale et sanitaire relative aux effluents	23
2.2.1 Réglementation environnementale	23
2.2.2 Réglementation sanitaire.....	26
3 Caractéristiques, méthodes de détection et présence dans l'espace agricole des <i>Clostridium botulinum</i> des types C, D, mosaïques C/D et D/C	30
3.1 Principales caractéristiques	30
3.1.1 Position taxonomique	30
3.1.2 Place des souches de <i>C. botulinum</i> du groupe III au sein du génospecies <i>Clostridium novyi sensu lato</i>	33
3.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse	34
3.2.1 Formes végétatives et croissance	34
3.2.2 Spores, sporulation et germination	35
3.2.3 Toxines, toxinogénèse et spectre d'activité	36
3.3 Détection et caractérisation dans l'environnement.....	39
3.3.1 Les méthodes d'échantillonnage	39
3.3.2 Méthode de détection de <i>C. botulinum</i> et de la toxine botulique	40
3.3.3 Caractérisation des souches de <i>C. botulinum</i> du groupe III.....	43
3.3.4 Indicateurs biologiques de l'efficacité d'un traitement.....	44
3.4 Présence, persistance et croissance de <i>C. botulinum</i> types C, D, mosaïques C/D, D/C dans l'espace agricole.....	45
3.4.1 Distribution et prévalence dans les sols en France.....	45
3.4.2 Persistance et croissance dans les élevages et leurs effluents	46
3.4.3 Persistance et croissance dans les prairies et autres surfaces agricoles.....	49

3.4.4	Persistance dans les poussières et aérosols	51
3.4.5	Contamination des végétaux destinés à l'alimentation animale et humaine.....	54
4	Opérations de décontamination en élevage : procédés applicables et efficacité vis-à-vis de <i>Clostridium botulinum</i>.....	58
4.1	Décontamination des supports inertes	59
4.1.1	Description des procédés	59
4.1.2	Efficacité des procédés	62
4.2	Traitement des produits organiques, notamment les effluents d'élevages (litières, fumiers, lisiers eaux résiduaires) et aliments contaminés	73
4.2.1	Description des procédés	73
4.2.2	Efficacité des procédés applicables aux effluents et aux aliments contaminés	79
4.3	Traitement des matrices environnementales.....	85
4.3.1	Traitement des parcours de volailles	85
4.3.2	Traitement des surfaces agricoles contaminées.....	86
5	Évaluation qualitative de risque lié à l'épandage des matières issues d'un foyer de botulisme bovin/aviaire.....	89
5.1	Description de la méthode d'évaluation	89
5.2	Identification du danger.....	90
5.3	Schéma évènementiel	90
5.4	Probabilité d'émission du danger	93
5.4.1	Probabilité brute d'émission dans un foyer déclaré	94
5.4.2	Appréciation de la probabilité primaire d'émission	95
5.4.3	Probabilité secondaire d'émission	98
5.5	Probabilité d'exposition au danger	103
5.6	Probabilité de contamination.....	103
5.7	Résultats et discussion	103
5.7.1	Appréciation du risque en santé animale.....	104
5.7.2	Appréciation du risque en santé humaine.....	110
5.7.3	Incertitudes	113
6	Réponses aux questions de la saisine.....	114
6.1	Question 1 : actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de <i>C. botulinum</i> , ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols.	114
6.2	Question 2 : le traitement du fumier et de la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ? 116	
6.3	Question 3 : la conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C/1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ?.....	117

6.4	Question 4 : quels risques en santé publique et en santé animale lors d'épandage de fertilisants organiques contaminés ?.....	118
7	Conclusions du groupe de travail	124
8	Recommandations.....	126
9	Bibliographie.....	128
	Annexe 1 : Lettre de saisine	143
	Annexe 2 : Impact des traitements thermiques sur <i>C. botulinum</i>.....	145
	Annexe 3 : Perte d'activité des toxines botuliques de types C et D dans différents milieux et en fonction de la température	147
	Annexe 4 : Estimation qualitative de la probabilité de survenue de l'évènement indésirable (contamination) résultant du croisement entre la probabilité d'émission et la probabilité d'exposition	148
	Annexe 5 : Probabilités de survenue de l'évènement indésirable (contamination) résultant du croisement des probabilités d'émission et des probabilités d'exposition	149

Sigles et abréviations

ADN	: Acide désoxyribonucléique
AFNOR	: Association française de normalisation
Afssa	: Agence française de sécurité sanitaire des aliments
AMM	: Autorisation de mise à disposition sur le marché
Anses	: Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ANSM	: Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé
ARN	: Acide ribonucléique
Astee	: Association scientifique et technique pour l'eau et l'environnement
BoNT	: Neurotoxines botuliques
CE	: Comité européen
CES	: Comité d'experts spécialisés
CEN	: Comité européen de normalisation
CMR	: Cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction
CNR	: Centre national de référence
DDPP	: Directions départementales de la protection des populations
DGAL	: Direction générale de l'alimentation
ELISA	: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EN	: <i>European Norm</i>
GT	: Groupe de travail
Ha	: Hémagglutinines
ICPE	: Réglementation relative aux installations classées pour la protection de l'environnement
ISO	: Organisation internationale de normalisation
LNR	: Laboratoire national de référence
MBA	: <i>Mouse bioassay</i>
MLD	: <i>Mouse Lethal Dose</i>
MLVA	: <i>Multi Locus VNTR Analysis</i>
MOT	: Micro-organismes et toxines
MS	: Matières sèches
MUS	: Mission des urgences sanitaires
NF	: Norme Française
NPP	: Nombre le plus probable
NTNH	: Non toxique Non Hémagglutinante
OiEau	: Office International de l'Eau
PBS	: <i>Phosphate-buffered saline</i>
PCR	: <i>Polymerase Chain Reaction</i>

PNISU	: Plan national d'intervention sanitaire d'urgence
PTC	: <i>Progenitor Toxin Complex</i>
PVC	: Polychlorure de vinyle
RMQS	: Réseau de mesure de la qualité des sols
RSD	: Règlement sanitaire départemental
SNARE	: <i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptor</i>
SPAn	: Sous-produits animaux
STEU	: Station de traitement des eaux usées
TIAC	: Toxi-infections alimentaires collectives
TP	: Type de produit
TPGY	: <i>Trypticase peptone-glucose-yeast extract</i>
UFC	: Unité formant colonie

Liste des tableaux

Tableau 1 : Seuils conditionnant l'affiliation des élevages de bovins et de volailles au règlement sanitaire départemental (RSD) ou à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE).....	24
Tableau 2 : Distances d'épandage et délais d'enfouissement des effluents d'élevage (élevages relevant des ICPE) vis-à-vis des habitations habituellement occupées par des tiers et des zones de loisirs.....	26
Tableau 3 : Classification et caractéristiques physiologiques de <i>C. botulinum</i> et des espèces de <i>Clostridium</i> neurotoxigènes en conditions de laboratoire.....	32
Tableau 4 : Familles de substances actives notifiées/ approuvées dans le cadre du règlement biocides ainsi que leur activité sporicide d'après Russell (1990).....	63
Tableau 5 : Correspondance entre l'échelle ordinale et les qualificatifs utilisés pour caractériser les probabilités en évaluation qualitative du risque.....	89
Tableau 6 : Critères d'attribution des qualificatifs utilisés pour caractériser les incertitudes	94
Tableau 7 : Probabilités brutes d'émission du danger dans les effluents issus d'un foyer déclaré	94
Tableau 8 : Probabilités primaires d'émission du danger.....	97
Tableau 9 : Probabilités d'émission du danger dans diverses matrices suite à un épandage d'effluents de volailles	99
Tableau 10 : Probabilités d'émission du danger dans les diverses matrices suite à un épandage d'effluents de bovins	100
Tableau 11: Argumentaire et incertitudes pris en compte dans l'estimation des probabilités secondaires.....	101

Liste des figures

Figure 1 : Schéma de la structure des neurotoxines botuliques C, D, mosaïques C/D et D/C, d'après Woudstra <i>et al.</i> (2012)	36
Figure 2 : Évaluation de la contamination des sols français par <i>C. botulinum</i> (Le Maréchal, 2020 – projet BOTUSOL)	46
Figure 3 : Schéma évènementiel	92

1 Contexte, objet et modalités de réalisation de l'expertise

1.1 Contexte

Le botulisme est une maladie neurologique humaine et animale, le plus souvent d'origine alimentaire, provoquée par l'action de neurotoxines bactériennes (toxines botuliques) produites par la bactérie *Clostridium botulinum* et qui se manifeste par une paralysie flasque pouvant aller jusqu'à la paralysie respiratoire et l'arrêt cardiaque. Neuf types¹ toxiques, répartis en une quarantaine de sous-types, sont actuellement connus.

En France, le botulisme animal affecte essentiellement les oiseaux (sauvages et domestiques) et les bovins. Chez les volailles, on recense annuellement vingt à trente foyers, majoritairement dus aux types mosaïque C/D (élevages de poulets de chair et de dindes) suivi de D et mosaïque D/C (uniquement dans les élevages de dindes). Chez les bovins, l'incidence sur les 10 dernières années est en moyenne d'une dizaine de foyers par an et les épisodes de botulisme sont dus aux types mosaïque D/C (majoritaire), C, mosaïque C/D et rarement D.

Les pertes en élevage liées à ces foyers et les interrogations sur leurs conséquences dans le domaine de la santé publique ont amené les pouvoirs publics à réglementer le botulisme animal en l'intégrant dans la liste des dangers sanitaires de première catégorie pour les espèces animales (arrêté du 29 juillet 2013)². Aujourd'hui, cette maladie figure dans une liste des maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime (arrêté du 03 mai 2022)³. Pour autant, aucune mesure de police sanitaire de portée générale n'a été édictée à ce jour pour gérer les foyers de botulisme animal, et chacun est géré au cas par cas par la direction départementale en charge de la protection des populations (DDPP) concernée, et par la Mission des Urgences Sanitaires (MUS) de la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL).

Jusqu'à présent, ces services se sont appuyés sur : un rapport sur le botulisme animal publié par l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa 2002) et un avis rendu en janvier 2009 sur un projet (par la suite abandonné) d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire (Afssa 2009b). Afin de pouvoir disposer de données actualisées et déterminer des mesures de gestion adaptées aux particularités du botulisme des type C, D et mosaïques C/D ou D/C, la DGAL a saisi l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) à la fin du mois de juin 2019 via quatre saisines (saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115)⁴.

¹ Le terme toxinotype peut être utilisé et a la même signification.

² Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales. Cet arrêté, aujourd'hui abrogé, était devenu obsolète depuis l'entrée en application, au 21/04/2021, du règlement (UE) 2016/429 du Parlement européen et du Conseil (« *animal health law* » ou « Loi santé animale »), qui définit une liste de maladies animales transmissibles vis-à-vis desquelles s'appliquent les mesures de surveillance, de prévention et/ou de lutte prévues par ce règlement. Or, le botulisme animal n'a pas été retenu dans cette liste.

³ Arrêté du 03 mai 2022 listant les maladies animales réglementées d'intérêt national en application de l'article L. 221-1 du code rural et de la pêche maritime. Le botulisme animal figure dans l'annexe II de cet arrêté. Cette annexe destinée à être abrogée, réunit des maladies dont les mesures de surveillance, de prévention et/ou de lutte ne sont que transitoirement placées sous l'autorité de l'Etat.

⁴ 2019-SA-0112 : évaluation des mesures de maîtrise en filière bovine lors de la détection de cas de botulisme; 2019-SA-0113 : décontamination et gestion des sous-produits d'élevage lors des cas de botulisme bovin et aviaire; 2019-SA-0114 : évaluation des mesures de maîtrise en filière avicole lors de la détection de cas de botulisme; 2019-SA-0115 : mesures de gestion de cas de botulisme dans la faune sauvage.

1.2 Objet de la saisine

La présente saisine porte sur l'évaluation des risques relatifs aux mesures de décontamination et de gestion des sous-produits animaux (SPAn) dans les foyers de botulisme bovin et aviaire. Les demandes et questions posées par la DGAL dans sa lettre de saisine sont les suivantes :

- « Actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols ».
- « Le traitement du fumier et de la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ? »
- « La conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C/1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ? »
- Dans l'hypothèse de matière non assainie :
 - « L'épandage des eaux résiduaires voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-elles ? »
 - « Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »
 - « Lors de l'épandage du fumier à proximité, ou sur des sols destinés à des cultures, et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

Après contact et discussion avec la DGAL, l'appellation « eaux résiduaires » fait référence à des eaux issues d'un élevage identifié comme foyer de botulisme animal, non relié au réseau de collecte des eaux usées et sans station de traitement des eaux usées (STEU) propre. Les abattoirs et autres établissements agroalimentaires ne sont pas concernés.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'instruction de cette saisine au groupe de travail « Botulisme décontamination », rattaché aux comités d'experts spécialisés SABA, BIOCIDES, BIORISK et EAUX.

Dans un premier temps, Le GT a décidé de travailler sur une actualisation des données sur la résistance et la persistance de *C. botulinum* types C, D, mosaïques C/D, D/C dans l'espace agricole ainsi que sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* et l'appréciation de leur efficacité. Ce travail a été réalisé en s'appuyant sur la mise à jour des connaissances effectuée par le GT « Groupe socle botulisme » (Anses 2021a), complétée par une recherche bibliographique. Dans un second temps, les questions relatives à l'évaluation de risque ont été traitées selon la méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale développée par l'Afssa (2008).

Les travaux d'expertise du groupe de travail ont été présentés régulièrement aux CES (tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques) : SABA (12 octobre, 14 décembre 2021, 8 février, 5 avril et 10 mai 2022) ; BIORISK (12 octobre 2021 et 6 avril 2022) ; BIOCIDES (31 mars 2022) et EAUX (11 janvier et 5 avril 2022). Ils ont été adoptés par le CES SABA réuni le 10 mai 2022. Le rapport produit par le groupe de travail tient compte des observations et éléments complémentaires transmis par les membres des CES.

Ces travaux sont ainsi issus d'un collectif d'experts aux compétences complémentaires. L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – prescriptions générales de compétence pour une expertise (mai 2003) ».

1.4 Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

2 Introduction : effluents d'élevage (définitions, réglementation)

Les questions posées dans la présente saisine concernent les mesures de gestion des effluents des élevages de volailles et de bovins atteints de botulisme, et l'évaluation des risques sanitaires liés à leur épandage sur les sols, en tant que fertilisants organiques⁵.

Il apparaît donc nécessaire de rappeler ce que recouvre l'appellation « effluents d'élevage », et de présenter succinctement la réglementation relative au stockage et à l'épandage de ces effluents.

2.1 Effluents d'élevage

Dans la réglementation relative aux installations classées pour l'environnement (ICPE) (voir section 2.2.1.1), les « effluents d'élevage » sont définis comme les déjections liquides ou solides, les fumiers, les eaux de pluie qui ruissellent sur les aires découvertes accessibles aux animaux, les eaux usées et les jus (d'ensilage par exemple) issus de l'activité d'élevage.

En conformité avec cette définition, au sein des effluents d'élevage dans ce travail, le GT a distingué : les déjections animales (excréments et/ou urines) avec ou sans litière et les eaux résiduaires.

2.1.1 Déjections des animaux, avec ou sans litière

En élevage bovin, on distingue :

- les fumiers compacts, très pailleux, obtenus notamment en cas de stabulation sur litière accumulée ;
- les fumiers mous obtenus après raclage des bouses sur les aires d'exercice sans caillebottis, évacués sur fumière avec récupération des jus (purins) ;
- le purin, mélange d'urine et d'eau qui s'écoule du fumier lors de son stockage ou des aires d'exercice bétonnées non couvertes, en particulier lors d'événement pluvieux ;
- le lisier qui correspond à un mélange liquide d'excréments et d'urines des animaux, éventuellement associés à des eaux résiduaires (par exemple eau de lavage de salle et de matériel de traite), des débris d'aliments et de litière non paillée (par ex. sciure, extrait sec de phase solide de lisier recyclé), obtenu notamment en cas de stabulation sur caillebottis.

En élevage avicole, on distingue, selon les catégories de volailles et le mode d'élevage :

- le fumier (de poulets, dindes, pintade, etc.), qui correspond au mélange des déjections des animaux et de leur litière (paille, copeaux de bois, etc.) sorti des locaux d'élevage après le départ des volailles vers un établissement d'abattage ;
- les fientes de poules pondeuses, humides à sèches selon que l'élevage dispose ou non d'un procédé de séchage (les fientes composées de plus de 65 % de matières sèches

⁵ On distingue habituellement les amendements, minéraux basiques et organiques, qui exercent une action sur les propriétés physiques, chimiques et biologiques du sol, et les engrais, destinés à améliorer l'alimentation des cultures et renfermant des éléments nutritifs majeurs (azote, phosphore, potassium), secondaires (soufre, magnésium, calcium et sodium) et mineurs (ou micro- ou oligoéléments).

(MS) étant considérées comme sèches) ; les éleveurs peuvent se limiter à un pré-séchage, le séchage pouvant être effectué dans un autre établissement ;

- le lisier de canards ou de poules pondeuses (effluent liquide).

On notera que dans le règlement n°1069/2009/CE⁶, le « lisier » est défini comme « tout excrément et/ou urine d'animaux d'élevage autres que les poissons, avec ou sans litière ». En pratique, il est habituel de considérer comme lisier les déjections animales comportant au moins 85 % de liquide, ou sur le plan réglementaire, les déjections liquides avec ou sans litière qui peuvent être pompées.

La diversité des types d'effluents est un point important. En effet, les spécificités de chaque type (quantités de carbone et d'azote, de phosphore, de potassium, teneur en eau, etc.) ont des conséquences sur leurs modalités de stockage ; elles conditionnent aussi leur emploi comme fertilisants en fonction du besoin des cultures et selon les zones d'épandage (voir section 2.2.1.2). Certains de ces effluents peuvent être convertis en biogaz et en résidus (digestats) valorisables en agriculture. Par ailleurs, les fumiers peuvent être également transformés en compost.

2.1.2 Eaux résiduares des élevages

Les eaux résiduares⁷, en sens commun, désignent les eaux usées, dont l'origine peut être domestique, industrielle ou agricole.

Les eaux résiduares (ici les eaux usées agricoles) correspondent en élevage à diverses catégories d'effluents :

- au mélange des eaux de lavage de la salle de traite (dites « eaux vertes ») et du matériel de traite (dites « eaux blanches ») ;
- au mélange de déjections et d'eau de pluie qui ruissellent sur des aires non couvertes accessibles aux animaux (dites « eaux brunes ») ;
- ainsi qu'aux eaux provenant du lavage/nettoyage des locaux d'élevage et du matériel (dites « eaux grises »).

Les eaux résiduares doivent normalement être évacuées et collectées dans des ouvrages de stockage et de traitement conformes à la réglementation (voir section 2.2.1). Dans les bâtiments équipés d'un sol bétonné (par exemple en élevage bovin : les aires de raclage des bouses, aires d'alimentation, etc.), les eaux de lavage peuvent être assez aisément repoussées vers les fosses de stockage des autres effluents liquides (lisiers, purins, etc.) de l'exploitation avec lesquelles elles sont mélangées. Lors d'élevage sur caillebotis (bovins par exemple), elles sont collectées dans les fosses à lisier sous les caillebotis. En l'absence de fosse de stockage, ce qui est le cas de nombreux élevages de volailles sur litière, les eaux de nettoyage des surfaces bétonnées issues des opérations de nettoyage-désinfection réalisées en fin de bande peuvent être dirigées vers un dispositif de stockage provisoire. En revanche, si le sol est en terre battue, les eaux sont difficilement récupérables car elles s'infiltrent dans le sol.

⁶ Règlement (CE) n° 1069/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et abrogeant le règlement (CE) n° 1774/2002 (règlement relatif aux sous-produits animaux).

⁷ Définitions tirées du « Glossaire eau, milieux marins et biodiversité » édité sur le site « www.glossaire-eau.fr » créé et géré par l'Office International de l'Eau (OiEau) :

http://www.glossaire-eau.fr/sites/default/files/glossaire_eau_biodiv_fr_20210324.pdf?v=1616582636

Même lorsqu'elles ne sont pas mélangées à d'autres effluents, les eaux résiduaires peuvent être épandues comme fertilisant, en tenant compte de leur charge en matière organique. Dans certaines exploitations, les eaux résiduaires peuvent aussi être évacuées vers le réseau d'assainissement communal (sous réserve de l'autorisation de la collectivité gérant les ouvrages d'assainissement).

2.2 Réglementation environnementale et sanitaire relative aux effluents

Le stockage ou l'épandage des effluents issus d'élevages bovins et aviaires pour la fertilisation des sols, doivent répondre à une réglementation environnementale et une réglementation sanitaire.

2.2.1 Réglementation environnementale

2.2.1.1 Définition du cadre réglementaire

En France, les conditions de stockage et d'épandage des effluents d'élevages sont soumises aux prescriptions du Règlement Sanitaire Départemental (RSD) pour les plus petites exploitations et, pour les autres, à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE)⁸. Les objectifs principaux étant la protection de la ressource en eau et des tiers (voisinage), les exploitations relevant de ce cadre réglementaire sont soumises à déclaration, enregistrement ou autorisation, selon le type d'élevage et le nombre maximum d'animaux présents simultanément sur l'exploitation agricole (Tableau 1).

En application de la directive européenne concernant la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole⁹, des programmes d'action (nationaux et régionaux) sont définis et rendus obligatoires sur les zones où la pollution des eaux par le rejet direct ou indirect de nitrates d'origine agricole et d'autres composés azotés susceptibles de se transformer en nitrates menace la qualité des milieux aquatiques et plus particulièrement l'alimentation en eau potable, dites « vulnérables ». Cette réglementation¹⁰ s'applique pour tout élevage (RSD ou ICPE) situé en zone vulnérable.

⁸ Arrêtés du 27/12/13 relatifs, respectivement, aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous les rubriques nos 2101-1, 2101-2, 2101-3, 2102 et 2111, aux installations relevant du régime de l'enregistrement au titre des rubriques nos 2101, 2102 et 2111 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement, et aux installations relevant du régime de l'autorisation au titre des rubriques n° 2101, 2102, 2111 et 3660 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement.

⁹ La directive européenne n° 91/676/CEE du 12 décembre 1991, dénommée « directive nitrates », vise à protéger les eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole. Elle impose aux États Membres de fixer des programmes d'actions applicables dans les zones vulnérables.

¹⁰ Arrêté du 19 décembre 2011 modifié relatif au programme d'actions national à mettre en œuvre dans les zones vulnérables afin de réduire la pollution des eaux par les nitrates d'origine agricole.

Tableau 1 : Seuils conditionnant l'affiliation des élevages de bovins et de volailles au règlement sanitaire départemental (RSD) ou à la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE)

Élevages		RSD	ICPE		
			Déclaration	Enregistrement	Autorisation
Bovins	Vaches laitières	< 50*	50 à 150	151 à 400	> 400
	Vaches allaitantes	< 100	≥ 100	-	-
	Veaux de boucherie Bovins d'engraissement	< 50	50 à 400	401 à 800	> 800
Volailles	Équivalents animaux ou nombre d'emplacements	< 5 000 (Emplacements)	5 000 à 30000 (Équivalents animaux)**	30 001 à 40 000 (Emplacements)	> 40 000 (Emplacements)

* : nombre maximum d'animaux présents simultanément sur l'exploitation agricole

** : Selon le cas, les volailles sont comptées soit en animal-équivalent (les poules, poulets, faisans, pintades comptent pour un animal-équivalent, les canards pour 2 animaux-équivalents, les dindes et oies pour 3 animaux-équivalents) soit en emplacements (1 animal = 1 emplacement)¹¹.

2.2.1.2 Principales prescriptions applicables aux exploitations bovines et aviaires

Ces prescriptions concernent les bâtiments d'élevage et leurs annexes, la collecte et le stockage des effluents d'élevage ainsi que leur épandage et leur traitement.

Nous retiendrons, les obligations de distance de l'implantation des locaux d'élevage qui sont de 100 mètres de lieux occupés par des tiers et de zones de loisirs (stades, terrains de camping, etc.) ; de 35 mètres des puits, sources, rivières ou toute installation de stockage d'eaux, destinées à la consommation humaine ou à l'arrosage des cultures maraîchères. Diverses dispositions relatives aux constructions (nature des sols des bâtiments d'élevage, pentes et étanchéité des caniveaux ou canalisations, etc.) visent à limiter les infiltrations des effluents dans le sol, y compris les eaux de nettoyage nécessaires à l'entretien des bâtiments et des annexes, et les eaux susceptibles de ruisseler sur les aires bétonnées. Ces dispositions visent à faciliter l'évacuation de ces eaux résiduaires vers les équipements de stockage et de traitement. Pour l'élevage de volailles en parcours, toutes les précautions doivent être prises pour éviter l'écoulement direct de boues et d'eau polluée vers les cours d'eau, le domaine public et les terrains des tiers.

Dans les zones vulnérables, des normes renforcées s'appliquent aux fumières, aux fosses à lisier, à la récupération des eaux résiduaires et au stockage en champ.

Hors zone vulnérable, la capacité minimale de stockage, y compris de la fosse, sous les animaux dans les bâtiments sur caillebotis et, le cas échéant, sur une parcelle, doit permettre de stocker la totalité des effluents produits pendant 4 mois minimum. Cette capacité minimale de stockage est augmentée dans les zones vulnérables. À cet égard, les effluents sont différenciés selon leur contenu en matière organique (évalué par le rapport entre les quantités de carbone et d'azote C/N). Les fertilisants organiques de type I (C/N > 8) concernent les fumiers de ruminants et les composts, alors que les fertilisants de type II (C/N ≤ 8) concernent les fumiers de volailles, les déjections animales sans litière (lisiers et fientes de volailles), les eaux résiduaires et les digestats bruts de méthanisation. Les périodes d'épandage autorisées

¹¹ cf. Rubrique ICPE 2111. Volailles, gibier à plumes (activité d'élevage, vente, etc.), à l'exclusion d'activités spécifiques visées à d'autres rubriques.

sont plus restreintes pour les fertilisants de type II (en raison de leur teneur importante en azote), exigent donc des capacités plus importantes de stockage (jusqu'à 7 mois pour les effluents de volailles).

Hors zone vulnérable, les fumiers compacts non susceptibles d'être sujets à des écoulements peuvent être stockés ou compostés¹² sur une parcelle d'épandage, après un stockage préalable de deux mois sous les animaux (litière accumulée) ou sur une fumière. Les fumiers avicoles non susceptibles d'écoulement et les fientes de volailles de plus de 65 % de MS peuvent être directement stockés au champ, en étant couverts par une bâche. Ces conditions sont renforcées en zone vulnérable : le volume du dépôt doit être adapté à la fertilisation des îlots culturels récepteurs ; le tas ne doit pas être présent au champ du 15 novembre au 15 janvier (sauf sur prairie ou dans certaines conditions¹³). La durée de stockage au champ est limitée à dix mois (neuf mois en zone vulnérable) et le retour sur un même emplacement ne peut intervenir avant un délai de 3 ans. Le stockage des fumiers en bord de champ doit respecter les obligations de distance, en particulier avec les habitations des tiers (100 mètres) ou avec les puits, sources, rivières (35 mètres).

Les normes relatives à l'épandage sur des terres agricoles des effluents d'élevage, bruts ou traités, concernent la période d'épandage et les distances à respecter vis-à-vis de tiers et autres éléments de l'environnement (points de prélèvements d'eau, cours d'eau, etc.). Pour les élevages soumis à enregistrement ou autorisation, ces épandages doivent respecter un plan d'épandage établi après une étude d'impact.

L'épandage est néanmoins interdit dans les situations suivantes : sur sol non cultivé¹⁴, sur les cultures de légumineuses sauf exceptions¹⁵, sur les sols inondés ou détrempés, sur les sols à pente importante pendant les périodes de fortes pluviosités (sauf s'il est mis en place un dispositif prévenant tout risque d'écoulement et de ruissellement vers les cours d'eau). L'épandage par aéro-dispersion est aussi interdit, sauf pour les eaux issues du traitement des effluents d'élevage.

Dans les zones vulnérables, les apports azotés organiques ou minéraux doivent tenir compte de la nature des terrains, de la rotation des cultures et correspondre aux besoins de celles-ci. À l'échelle annuelle et pour chaque exploitation, l'apport d'azote par épandage d'effluents d'élevage doit tenir compte de référentiels régionaux définis par arrêté préfectoral. Des programmes d'actions régionaux définissent ainsi un calendrier des périodes d'épandage qui doit être respecté. Ainsi les fertilisants organiques de type II ne peuvent pas être épandus entre le 15 novembre et le 15 janvier sur une prairie permanente, et entre le 1^{er} octobre et le 31 janvier sur les cultures semées à l'automne ou en fin d'été (autres que colza).

Les distances d'épandage et les délais d'enfouissement sont fixés en fonction des catégories d'effluent et de la localisation des habitations habituellement occupées par des tiers et des zones de loisirs (Tableau 2). Des distances sont aussi définies par rapport aux cours d'eau

¹² Les fumiers compacts peuvent être compostés en bord de champ, en respectant certaines prescriptions (retournements, relevé de températures...). Au-delà d'une certaine quantité, cette activité doit être déclarée, enregistrée ou autorisée au titre des ICPE (rubrique 2780). Les composts sont élaborés, préalablement à leur épandage, dans les conditions suivantes : les andains font l'objet d'un minimum deux retournements ou d'une aération forcée, et la température des andains est supérieure à 55°C pendant quinze jours ou à 50°C pendant six semaines.

¹³ Si le tas est déposé sur un lit d'environ 10 centimètres d'épaisseur de matériau absorbant dont le rapport C/ N est supérieur à 25 (comme la paille) ou en cas de couverture du tas.

¹⁴ Sols non cultivés : les sols non cultivés sont des surfaces non utilisées en vue d'une production agricole. Toute surface qui n'est ni récoltée, ni fauchée, ni pâturée pendant une campagne culturale est considérée comme un sol non cultivé.

¹⁵ La fertilisation azotée est autorisée sur luzerne et sur les prairies d'association graminées-légumineuses.

permanents et aux plans d'eau (35 m pour les ICPE, réduits à 10 m si une bande tampon enherbée de 10 m est en place), ainsi qu'aux puits, forages et captages d'eau (50 m pour les ICPE).

Tableau 2 : Distances d'épandage et délais d'enfouissement des effluents d'élevage (élevages relevant des ICPE) vis-à-vis des habitations habituellement occupées par des tiers et des zones de loisirs.

Catégories d'effluents	Distances minimales d'épandage	Délais d'enfouissement
Composts	10 m	Aucun
Fumiers de bovins (et porcins) compacts stockés au minimum depuis 2 mois	15 m	24 h
Autres fumiers, fientes	50 m	12 h
Lisiers et purins Effluents d'élevage après traitement atténuant les odeurs Digestats de méthanisation Eaux blanches et vertes	50 m (rampe, pendillards) 15 m (injection directe) 100 m (matériel à palette ou à buse)	12 h
Autres cas	100 m	12 h

Notons que les épandages sur terres nues doivent être suivis d'un enfouissement dans les vingt-quatre heures pour les fumiers de bovins (et de porcs) compacts non susceptibles d'écoulement, dans les douze heures pour les autres effluents d'élevage (effluents avicoles, par exemple) ou les matières issues de leur traitement. Ces prescriptions ne s'appliquent pas aux composts.

2.2.2 Réglementation sanitaire

2.2.2.1 Définition du cadre réglementaire

Les « lisiers », définis comme « les excréments et/ou urines d'animaux d'élevage avec ou sans litière » sont identifiés dans le règlement n°1069/2009/CE (complété par le règlement n° 142/2011/CE¹⁶) comme des « matières de catégorie 2 »¹⁷. Ces SPAn sont, à ce titre, soumis à des règles sanitaires destinées à prévenir ou à minimiser les risques qu'ils comportent pour la santé publique et la santé animale, notamment en vue de préserver la sécurité de la chaîne alimentaire, y compris lors d'usage pour la fertilisation des sols. Ces dispositions sont reprises

¹⁶ Règlement (CE) n° 142/2011 de la Commission du 25 février 2011 portant application du règlement (CE) n° 1069/2009 du parlement européen et du Conseil établissant des règles sanitaires applicables aux sous-produits animaux et produits dérivés non destinés à la consommation humaine et portant application de la directive 97/78/CE du Conseil en ce qui concerne certains échantillons et articles exemptés des contrôles vétérinaires effectués aux frontières en vertu de cette directive.

¹⁷ Les matières de catégories 2 correspondent aux cadavres de monogastriques, cadavres de ruminants non suspects ou non atteints d'EST (encéphalopathies spongiformes transmissibles) ne contenant pas de matières à risque spécifié, tissus et organes saisis pour motifs autres que les EST, matières contenant des résidus de médicaments vétérinaires ; pouvant véhiculer de maladie transmissible à l'Homme ou l'animal et sous-produits d'animaux écartés de la consommation humaine pour motif autre que sanitaire, sous-produits de ruminants négatifs aux tests de dépistage EST. Les lisiers et le contenu de l'appareil digestif des animaux sont rattachés aux matières de catégorie 2.

et précisées sur le plan national dans l'arrêté ministériel du 9 avril 2018¹⁸. On notera que le règlement n°1069/2009/CE ne s'applique pas aux eaux résiduaires.

2.2.2.2 Principales prescriptions applicables aux exploitations bovines et aviaires

Le règlement n°1069/2009/CE impose des conditions pour l'élimination et l'utilisation des « matières de catégorie 2 ». Ainsi, après leur transformation par une stérilisation sous pression¹⁹, elles peuvent être (i) incinérées ou enfouies comme déchets dans une décharge autorisée, ou (ii) utilisées pour la fabrication d'engrais organiques, comme amendements, ou encore (iii) converties en compost ou biogaz.

En revanche, les « lisiers » (ce terme dans le présent chapitre étant utilisé au sens du règlement n°1069/2009/CE) peuvent, sans transformation préalable, être utilisés directement pour la fertilisation des sols en tant qu'engrais ou amendement, sous réserve d'un accord préalable de l'autorité compétente qui évalue le risque de propagation d'une maladie transmissible (donc sans préjudice de mesures de restrictions sanitaires qui seraient déterminées par voie d'arrêté ministériel ou préfectoral ou par d'autres voies). Ces lisiers peuvent aussi être convertis en compost dans une usine de compostage agréée, ou en biogaz dans une usine de production de biogaz agréée (le résidu produit, appelé « digestat » pouvant être utilisé comme fertilisant). Le lisier utilisé seul (sans autre sous-produit animal ou produit dérivé) peut être soumis à une « maturation aérobie »²⁰, à un séchage ou à toute autre opération sur l'exploitation d'origine ou dans un établissement enregistré par la DDPP.

Des exigences minimales s'appliquent aux usines agréées pour la conversion des lisiers en compost ou en biogaz. Les paramètres de conversion normalisés définis dans le règlement n° 142/2011/CE correspondent à l'étape dite de « pasteurisation/hygiénisation » qui doit précéder la digestion anaérobie, dans le cas d'une usine de production de biogaz, et qui intervient au cours du processus de compostage dans le cas d'une usine de compostage. À cet égard, ces établissements doivent garantir le maintien d'une température minimale de 70°C de toutes les matières pendant au moins 60 min. Les composts et digestats dont la production a été soumise à ces paramètres de conversion sont des produits dérivés transformés.

Des dérogations à ces exigences (permettant seulement une mise sur le marché français des résidus de digestion et composts produits) peuvent être accordées par la DDPP à des installations de conversion des lisiers en biogaz ne disposant pas d'une unité de « pasteurisation/hygiénisation » (cas de nombreuses installations de méthanisation agricole individuelles ou collectives). Elles sont aussi possibles pour les installations de compostage n'appliquant pas les paramètres de conversion normalisés, mais des paramètres nationaux (55°C/14 j, 60°C/7 j ou 65°C/3 j, ou autres couples temps/température dont la valeur pasteurisatrice a été démontrée comme équivalente) (Arrêté du 9 avril 2018)¹⁸. Les composts et digestats produits dans ces conditions sont des produits dérivés non transformés. Ils doivent respecter certaines dispositions, notamment des exigences microbiologiques (paramètres

¹⁸ Arrêté du 9 avril 2018 fixant les dispositions techniques nationales relatives à l'utilisation de sous-produits animaux et de produits qui en sont dérivés, dans une usine de production de biogaz, une usine de compostage ou en « compostage de proximité », et à l'utilisation du lisier. Les dispositions de cet arrêté sont détaillées dans l'instruction technique DGAL/SDSPA/2020-41 du 21/01/2020.

¹⁹ Le traitement des sous-produits animaux ayant subi une réduction en particules de 50 mm au maximum à une température à cœur de plus de 133 °C pendant au moins vingt minutes sans interruption, à une pression absolue d'au moins 3 bars.

²⁰ D'après [l'instruction Technique DGAL/SDSPA/2020-41 du 21/01/2020](#)

« *Enterococcaceae* »²¹ ou *Escherichia coli* et *Salmonella* spp.), attestant d'une maîtrise minimale du procédé lors de leur production.

S'ils sont conformes aux exigences des réglementations environnementales et sanitaires, les digestats et composts peuvent être appliqués dans les sols. Leur utilisation sur des pâturages ou sur des terres productrices de fourrages nécessite le respect d'une période d'attente de 21 jours²² avant la remise des animaux en pacage ou le fauchage des herbes pour leur alimentation. Dans le cas de matières premières constituées de déjections de volailles ou autres oiseaux captifs avec ou sans litière, l'exploitant respecte le délai de 60 jours minimum entre la sortie des déjections de volailles du bâtiment d'élevage et l'épandage du digestat (le cas échéant, fraction liquide et solide)²³. Ces conditions, destinées à garantir une maîtrise adéquate des risques pour la santé publique et animale, ne s'appliquent pas au lisier.

Il est enfin obligatoire de nettoyer et désinfecter les contenants amenant sur site les matières non traitées, lisier inclus.

2.2.2.3 Autres mesures de restrictions sanitaires applicables aux exploitations bovines et aviaires

Lorsqu'il existe un risque de propagation d'une maladie grave transmissible, les étapes de transport, stockage et épandage des effluents d'élevage peuvent être soumises à des restrictions sanitaires adaptées à chaque type de danger. Ces mesures, subordonnées aux possibilités d'assainissement des matrices contaminées, sont déterminées par arrêtés du ministère en charge de l'agriculture, pour la plupart des maladies animales réglementées, et adaptées localement par arrêté préfectoral dans le cadre des mesures de police sanitaire. Par exemple, afin de prévenir le risque de diffusion des maladies des volailles et des oiseaux (notamment de l'influenza aviaire)²⁴, l'épandage en surface du lisier, des fientes sèches et du fumier non assainis est interdit. Ces effluents sont considérés assainis à l'issue d'une durée de stockage suffisante pour permettre la disparition de l'agent pathogène (cette procédure d'assainissement est alors définie comme « naturelle ») ou d'un traitement comme un compostage. Le délai d'un assainissement naturel pour le lisier ou pour les fientes sèches est de soixante jours, et de quarante-deux jours pour le fumier mis en tas et laissé exposé à sa propre chaleur. Par dérogation, un enfouissement dans les sols à une profondeur de 10 à 15 cm est possible, afin que la faune et notamment les oiseaux ne puissent y accéder.

Dans le cas du botulisme animal, on notera que faute de données scientifiques suffisantes pour déterminer des mesures de gestion proportionnée des foyers de botulisme C, D, mosaïques C/D, D/C, aucune mesure n'a été définie jusqu'ici pour lutter contre cette maladie sur le plan national. Concernant le devenir des effluents des élevages, il est cependant indiqué dans une instruction technique de la DGAL²⁵, que la dérogation à la transformation préalable par stérilisation/hygiénisation sous pression ne pourra pas être accordée si l'application directe dans les sols doit être interdite et si la pasteurisation/hygiénisation s'avère insuffisante pour

²¹ Dans l'arrêté du 9 avril 2018 le terme « enterococcaceae » est utilisé pour désigner « les entérocoques intestinaux »

²² Période d'attente visée à l'article 11, paragraphe 1, point c), du règlement (CE) n° 1069/2009

²³ Arrêté du 13 juin 2017 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricoles en tant que matières fertilisantes.

²⁴ Arrêté du 29 septembre 2021 relatif aux mesures de biosécurité applicables par les opérateurs et les professionnels liés aux animaux dans les établissements détenant des volailles ou des oiseaux captifs dans le cadre de la prévention des maladies animales transmissibles aux animaux ou aux êtres humains.

²⁵ Instruction Technique DGAL/SDSPA/2020-41 du 21/01/2020 relative à la mise en œuvre de l'arrêté du 9 avril 2018.

assainir ces sous-produits. Ainsi, un lisier qualifié de « manifestement contaminé par la toxine botulique ou par des spores de *Bacillus anthracis* ou provenant d'animaux malades ou morts suite à contamination par ces agents pathogènes ou leurs toxines » ne devrait pas recevoir cette dérogation.

Les effluents d'élevage sont constitués par les déjections des animaux (leurs excréments et/ou urines) avec ou sans litière, et les eaux résiduaires, incluant notamment les eaux de lavage des bâtiments d'élevage et de leurs équipements. Ils peuvent être directement valorisables en agriculture en tant que fertilisants organiques, transformés en compost (cas des fumiers) ou convertis en biogaz.

Leur épandage doit tenir compte de leur valeur fertilisante, du niveau de fertilité des sols et des besoins des cultures qui diffèrent selon les végétaux et leur stade de croissance. Le stockage et les épandages doivent être pratiqués dans le respect des réglementations environnementales en vigueur, notamment la réglementation des installations classées pour la protection de l'environnement (ICPE), qui vise principalement la protection de la ressource en eau et la protection des tiers (voisinage), et la réglementation relative à la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole. On retiendra en particulier que dans les élevages relevant de la réglementation ICPE : (i) les obligations de distances des locaux d'élevage par rapport aux tiers ou aux ressources en eau, (ii) les dispositions constructives visant à limiter les risques d'infiltration des effluents dans le sol, (iii) les normes applicables au stockage des effluents et celles relatives à leur épandage (périodes d'interdiction, distances à respecter vis-à-vis des habitations, des cours d'eau, etc.), renforcées dans les zones vulnérables délimitées dans le cadre de la protection des eaux contre la pollution par les nitrates d'origine agricole.

Les excréments et/ou urines des animaux d'élevage avec ou sans litière sont considérés par le règlement n°1069/2009/CE comme des SPAn de catégorie 2. De ce fait, ils peuvent être utilisés directement dans les sols en tant qu'engrais organique ou amendement. Lors de conversion de ces effluents en compost (cas des fumiers) ou en biogaz (sauf dérogation accordée par le DDPP), le règlement n°1069/2009/CE impose que ces matières soient soumises pendant au moins 60 min à une température minimale de 70°C (« pasteurisation/hygiénisation »), pour prévenir ou minimiser les risques pour la santé publique et la santé animale.

En outre, des restrictions sanitaires peuvent être spécifiquement définies par arrêté ministériel ou préfectoral, visant à prévenir tout risque de propagation d'une maladie grave transmissible lors d'usage des effluents d'élevage pour la fertilisation des sols.

En tout état de cause, l'épandage des effluents d'élevage ne peut être considéré comme un moyen d'élimination acceptable si les risques liés à leur contamination par un agent pathogène (comme *C. botulinum* par exemple) ne sont pas maîtrisés.

3 Caractéristiques, méthodes de détection et présence dans l'espace agricole des *Clostridium botulinum* des types C, D, mosaïques C/D et D/C

Les foyers de botulisme détectés ces vingt dernières années dans les élevages bovins et aviaires sont essentiellement dus aux types toxiques C, D, mosaïques C/D ou D/C.

Ce chapitre vise à présenter les principales connaissances relatives à ce groupe bactérien²⁶, les différents types toxiques de *C. botulinum*, les difficultés liées à sa détection dans les matrices environnementales et sa dispersion dans l'espace agricole.

Dans l'ensemble du rapport, l'emploi du terme « *C. botulinum* » désigne la bactérie sous toutes ses formes (spores et cellules végétatives) sans distinction. Dans certains cas précis où l'une des deux formes a été ciblée en particulier, celle-ci est précisée. Dans le cas où seules les toxines sont en cause, cela est également précisé dans le texte.

3.1 Principales caractéristiques

Les bactéries du genre *Clostridium* sont des bacilles à Gram positif, de grande taille (20 µm x 0,6 µm). Leur capacité à sporuler permet aux souches de perdurer dans des conditions environnementales impropres à la survie des formes végétatives.

Ce sont des bactéries chimio-organotrophes, anaérobies strictes qui fermentent, les produits terminaux de ce métabolisme étant des acides de type acétique, butyrique ou propionique. Dépourvus des enzymes de détoxification des effets délétères de l'oxygène, certaines espèces peuvent cependant se développer en présence de faibles concentrations en oxygène.

3.1.1 Position taxonomique

C. botulinum appartient au genre *Clostridium* qui est affilié à la famille des *Clostridiaceae*, ordre des *Clostridiales*, classe des *Clostridia* et division des *Firmicutes* (Le Maréchal *et al.* 2016; Hodowanec et Bleck 2015; Cruz-Morales *et al.* 2019).

Le genre *Clostridium* est constitué d'environ 200 espèces dont une quinzaine synthétisent des toxines entraînant des maladies chez l'être humain et/ou l'animal (Poulain et Popoff 2019). Parmi ces espèces, comme l'indique le Tableau 3 ci-après, les souches de *C. botulinum* sont classées en 3 groupes (I à III) en fonction de leurs propriétés biochimiques et plus particulièrement en fonction de leurs propriétés protéolytiques. Cette classification initiale de *C. botulinum* a été confirmée par des études phylogénétiques basées sur la comparaison des séquences d'ADN et de leur niveau d'homologie ainsi que des séquences du gène codant l'ARNr 16S des différentes clostridies. On inclut également dans ces groupes des espèces de *Clostridium* biochimiquement très proches, mais qui se distinguent des précédentes par l'absence de production de neurotoxine botulique. Les souches du groupe I ne produisant pas de toxine botulique sont identifiées comme *C. sporogenes*, celles du groupe II comme *C. taeniosporum* et celles du groupe III comme *C. novyi* ou *C. haemolyticum*. D'autres souches

²⁶ Une grande partie des données présentées sont issues du rapport Anses (2021) « *Clostridium botulinum* : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïques C/D et D/C et E. Saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115. Maisons-Alfort : Anses, 170 p. ».

du genre *Clostridium*, autres que *C. botulinum*, produisent aussi des toxines botuliques et constituent les groupes IV²⁷, V et VI des *Clostridium* producteurs de toxine botulique.

Les *C. botulinum* sont aussi classés en fonction du type de toxine qu'ils produisent. Neuf types de neurotoxines botuliques ont été identifiés (A, B, C, D, E, F, G, H et X), dont seuls sept types (A à G) sont pris en compte pour leur classification (les toxines de type H et X sont co-produites avec un autre type de toxine qui est majoritaire).

De façon générale, la classification liée au type de la toxine produite est la plus employée. Certaines souches (du groupe I notamment) sont capables de produire simultanément deux ou trois types de toxine botulique, le plus souvent avec des taux de production différents selon les toxines (Barash et Arnon 2014; Zhang *et al.* 2018; Poulain et Popoff 2019). Il existe aussi, au sein du groupe III, des *C. botulinum* dits mosaïques de type C/D et D/C qui, suite à des recombinaisons génétiques (Woudstra *et al.* 2012), synthétisent des neurotoxines botuliques qui sont des hybrides des toxines de types C et D (voir section 3.2.3).

Ces dernières années, l'évolution de la biologie moléculaire, en particulier du séquençage, a permis une meilleure connaissance des séquences des gènes codant la neurotoxine botulique. Au sein d'un même type, des différences de séquences ont été mises en évidence et ont conduit à une sous-classification en sous-types qui est appliquée à la fois aux toxines et aux souches productrices (Barash et Arnon 2014; Peck *et al.* 2017; Zhang *et al.* 2018; Poulain et Popoff 2019).

²⁷ L'espèce *C. argentinense* du groupe IV était initialement nommée *Clostridium botulinum*.

Tableau 3 : Classification et caractéristiques physiologiques de *C. botulinum* et des espèces de *Clostridium* neurotoxigènes en conditions de laboratoire (adapté de Peng Chen *et al.* (2012) , Lund et Peck (2013), Popoff (2017), Moore et Lacey (2019), Anses (2020a))

	Groupe I <i>C. botulinum</i> Protéolytique	Groupe II <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe III <i>C. botulinum</i> Non protéolytique	Groupe IV <i>C. argentinense</i> Protéolytique	Groupe V <i>C. butyricum</i> Non protéolytique	Groupe VI <i>C. baratii</i> Non protéolytique
Type de toxines Sous types de toxines	A, B, F A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7, A8, B1, B2, B3, B5, B6, B7, B8, bivalent B (Ba, Bf, Ab), F1, F2, F3, F4, F5, F8, X	B, E, F E1, E2, E3, E6, E7, E8, E9, E10, E11, E12, B4 ou non protéolytique B, F6 ou non protéolytique F	C, D C, mosaïque C/D, D, mosaïque D/C	G G	E E4, E5	F F7
Support des gènes codant les toxines botuliques	Chromosome/plasmide	Chromosome/plasmide	Prophage	Plasmide	Plasmide	Plasmide
Bactéries apparentées ne produisant pas de toxine botulique	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. taeniosporum</i>	<i>C. novyi</i> <i>C. haemolyticum</i>	<i>C. subterminale</i> <i>C. proteolyticus</i> <i>C.</i> <i>schimacherense</i>	<i>C. butyricum</i>	<i>C. baratii</i>
Protéolyse	+	-	-	+	-	-
Saccharolyse	-	+	-	-	+	+
Conditions de croissance						
Température optimale (°C)	35-40	25-30	37-40	37	30 -37	30-45
Température minimale (°C)	10	2,5	15	/	12	10
pH minimum	4,6	5	5,1	4,6	4,8	3,7
a _w minimum	0,94	0,97	0,97	0,94	ND	ND
% NaCl inhibant la croissance	10	5	5	10	ND	8,5

Légende : « + » : présence ; « - » : absence ; ND : non déterminé ; / : pas de données ; aw : activité de l'eau (water activity)

3.1.2 Place des souches de *C. botulinum* du groupe III au sein du géospecies *Clostridium novyi sensu lato*

Le géospecies *Clostridium novyi sensu lato* a été récemment proposé pour regrouper les espèces *C. botulinum* du groupe III, *C. novyi sensu stricto* et *C. haemolyticum* (Skarin *et al.* 2011; Skarin et Segerman 2014).

Cette proposition s'appuie sur des études phylogénétiques (Skarin *et al.* 2011) confirmées par le séquençage complet des génomes de ces trois espèces bactériennes. Elles montrent que leur génome chromosomique est très conservé et que leurs différences sont attribuables aux éléments génétiques mobiles (plasmides, prophages) qu'elles possèdent et qui supportent les gènes codant pour les toxines qu'elles produisent (Skarin et Segerman 2014; Le Gratiet *et al.* 2020).

A la différence de *C. botulinum*, les deux autres espèces bactériennes ne produisent pas de toxine botulique, mais produisent d'autres toxines responsables de leur pouvoir pathogène.

C. novyi est une bactérie ubiquitaire retrouvée dans le sol et les fèces. Il en existe trois types (A, B, C) différenciés en fonction de quatre toxines majeures (alpha, beta, gamma et epsilon). Les types A et B sont les seuls à produire la toxine alpha. Le type A est impliqué dans des gangrènes gazeuses chez l'animal et parfois chez les humains (Junior *et al.* 2020). Le type B est l'agent étiologique de l'hépatite nécrotique infectieuse (« *black disease* ») typiquement observée chez les ovins, les bovins et les porcins (Brazier *et al.* 2002). Les souches de type C sont généralement considérées comme non pathogènes.

C. haemolyticum (antérieurement identifié comme *C. novyi* type D), dont le pouvoir pathogène est dû à la production d'une phospholipase C (beta-toxine similaire à celle produite par *C. novyi* B) fortement nécrotique et hémolytique, est la cause de de l'hémoglobinurie bacillaire chez les bovins et ovins (Eklund *et al.* 1976).

Au sein des *C. botulinum* du groupe III, les gènes codant les toxines C, D et mosaïques C/D et D/C sont localisés sur un prophage non intégré au chromosome. La perte de ce prophage rend les souches de *C. botulinum* C, D et mosaïques indifférenciables des souches de *C. novyi* ou *C. haemolyticum*. En revanche, l'acquisition du prophage peut permettre à des souches de *C. novyi* ou *C. haemolyticum* de produire la toxine botulique (Eklund *et al.* 1974; Oguma 1976; Le Gratiet *et al.* 2020).

Clostridium botulinum, regroupe un ensemble hétérogène de souches bactériennes dont le point commun est la capacité à synthétiser une toxine botulique. Ce sont des bactéries à Gram positif, anaérobies strictes, sporulées, naturellement présentes dans l'environnement. Les souches de *C. botulinum* sont classées en trois groupes (I à III) en fonction de leurs caractéristiques biochimiques (notamment protéolytiques) et génétiques. La classification basée sur le type de toxine produite (neuf types différents : A à H, X) est actuellement la plus employée. Les souches de *C. botulinum* productrices des toxines C, D et mosaïques C/D et D/C (groupe III) sont responsables des foyers de botulisme affectant les élevages aviaires et bovins en France, et sont donc principalement ciblées dans la présente saisine. Sur le plan génomique, elles sont phylogénétiquement proches de *C. novyi* et *C. haemolyticum* (bactéries ne produisant pas de neurotoxine botulique). Ainsi, l'ensemble de ces souches a été regroupé dans le géospecies *Clostridium novyi sensu lato*. La perte des prophages supportant les gènes codant les neurotoxines botuliques rend les souches de *C. botulinum* C, D et mosaïques indifférenciables de *C. novyi* et *C. haemolyticum*.

3.2 Conditions et mécanismes de croissance, de sporulation et de toxinogénèse

C. botulinum sous formes sporulée ou végétative, de même que ses toxines, sont naturellement présents dans l'environnement. Les spores, qui assurent sa pérennité dans le milieu extérieur, sont détectées dans une grande variété de milieux naturels, au sein desquels les sols et sédiments apparaissent comme le réservoir et la source primaire de contamination pour de nombreuses espèces animales sensibles au botulisme.

3.2.1 Formes végétatives et croissance

Comme déjà indiqué, les souches de *C. botulinum* sont toutes anaérobies, le plus souvent strictes, certaines étant capables de se développer en conditions micro-aérophiles. La viabilité des cellules végétatives diminue graduellement en présence d'oxygène, de manière variable selon les souches. A contrario, les spores de *C. botulinum* peuvent survivre pendant de longues périodes à l'air et peuvent germer en présence d'oxygène (Lund et Peck 2013). Les températures de croissance de différents groupes de *C. botulinum* sont assez similaires (cf. Tableau 3), excepté pour le groupe II, pour lequel la température optimale de croissance est plus basse de quelques degrés et dont les souches sont capables de se multiplier au froid, c'est-à-dire dès 2,5°C. La température maximale de croissance est de l'ordre de 49°C pour le groupe I (pour une température optimale de croissance se situant entre 35 et 40°C). Un traitement de dix minutes à 70°C permet d'inactiver les formes végétatives. Un pH inférieur à 5 (4,7 pour le groupe I) inhibe en général la croissance et la toxinogénèse. La croissance de *C. botulinum* est inhibée par les fortes concentrations en NaCl (au-dessus de 5 %).

La germination des spores présentes dans les sols et la multiplication des formes bactériennes végétatives associée à la production de toxine sont conditionnées par les effets conjugués de différents facteurs abiotiques et biotiques (Palmer *et al.* 2019) : température, pH, disponibilité en eau (a_w), NaCl, potentiel redox, salinité, O₂, et matière organique. La tolérance au NaCl est plus faible pour *C. botulinum* de type C et D, que pour les types A, B ou E. Les souches de *C. botulinum* de types C et D sont particulièrement exigeantes en matières organiques, l'accumulation de celles-ci contribue à accentuer les conditions d'anoxie du milieu. La matière organique végétale (en particulier les résidus de culture qui sont enfouis dans les sols après récolte) peut constituer une source de substrats de croissance pour les bactéries du genre *Clostridium*. Aussi, l'apport de matières organiques d'origine animale (déjections et surtout cadavres d'animaux) aurait un rôle facilitant primordial pour ce groupe bactérien (Roberts et Gibson 1979). Il faut aussi tenir compte des compétitions bactériennes et de l'effet inhibiteur, observé dans des sédiments de marais et exercé par d'autres bactéries comme *Bacillus licheniformis*, *Bacillus mycoides* / *cereus*, *Streptococcus* spp. et *Clostridium* spp. sur *C. botulinum* de type C (Sandler *et al.* 1998; Smith 1975).

Une des propriétés fondamentales de *C. botulinum* est, en outre, sa capacité à germer et se multiplier dans les cadavres en putréfaction où il trouve les conditions anaérobies et les nutriments organiques nécessaires à sa croissance. Ce processus survient, quelles que soit la cause de la mort, lorsque les animaux hébergent des spores dans leur tube digestif. Il peut s'agir, soit d'espèces animales vertébrées (mammifères, oiseaux, poissons, etc.), ou d'espèces d'invertébrées (petits crustacés, mollusques, insectes, etc.), dont le cadavre représente un terrain optimal pour le développement bactérien et la production de toxines (Espelund et Klaveness 2014).

3.2.2 Spores, sporulation et germination

La formation de spores bactériennes est observée dans des environnements naturels ou anthropisés variés (Carlin 2011). En conditions de laboratoire, la sporulation chez les *Clostridia* commence durant la phase de transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire (Shen *et al.* 2019). La sporulation peut être régulée (négativement ou positivement) par différents facteurs. Elle est favorisée par des conditions anaérobies, une densité cellulaire élevée, un faible potentiel redox (croissance optimale autour de $Eh = -350$ mV), des températures supérieures à 20°C (avec un optimum proche des températures optimales de croissance de la bactérie), et un pH proche du pH optimum de croissance (*i.e.* autour de 7,0). *A contrario*, la sporulation est impactée négativement par des basses températures et un milieu inadapté en nutriments, aéré, fortement alcalin, acide ou à salinité élevée (Anses 2021a; Portinha *et al.* 2022).

Les spores bactériennes possèdent des capacités de résistance aux agents physiques (dessiccation, chaleur, lumière UV, radiations) ou chimiques sans commune mesure avec celles des cellules végétatives dont elles sont issues. Les spores bactériennes peuvent rester en dormance et sans activité métabolique pendant plusieurs années (Setlow 2014). Gessler et Böhnelt (2006) ont montré que la survie de spores de *C. botulinum* dépasse plus de trois ans dans les sols, en particulier si du compost est apporté en même temps. S'agissant des capacités de résistance des spores de *C. botulinum* aux agents physiques, la résistance à la chaleur est la plus étudiée du fait de son importance pour l'industrie alimentaire. La thermorésistance des spores varie entre les groupes et au sein des groupes entre les souches : les souches protéolytiques du groupe I possèdent ainsi les spores les plus thermorésistantes ($D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 0,21$ min)²⁸ tandis que les souches du groupe II ($D_{80^{\circ}\text{C}} = 0,6-1,25$ min) sont les plus thermosensibles et celles de groupe III ont une sensibilité intermédiaire ($D_{104^{\circ}\text{C}} = 0,8-1,12$ min). S'agissant des capacités de résistance aux agents chimiques, la spore se caractérise par une résistance accrue aux biocides, imposant l'emploi de formulations spécifiquement sporicides lors d'opérations de désinfection de foyers de botulisme.

De façon générale, la germination des spores peut être déclenchée, lorsque l'environnement est favorable à la croissance sous forme végétative, par des stimuli de nature diverse, dépendant majoritairement de l'espèce concernée. Dans les environnements naturels, les inducteurs de germination seraient généralement, comme décrit chez des bactéries du genre *Bacillus*, des molécules de petite taille, acides aminés, nucléosides et sucres, dont l'action peut être amplifiée par des co-facteurs (lactate, cations Na^+ ou K^+ , ou anions) (Setlow *et al.* 2017; Plowman et Peck 2002). La sensibilité aux inducteurs de germination et les mécanismes de germination des souches appartenant aux différents groupes toxiques de *C. botulinum* seraient relativement proches (Brunt *et al.* 2016). Lorsqu'il est enclenché, le processus de germination est irréversible (Johnstone 1994). La germination se traduit par une perte des propriétés de résistance de la spore et un retour à la vie végétative. *In vitro*, la germination peut être activée par un choc thermique (« *heat shock* ») sublétal, obtenu par exemple en soumettant la suspension de spores à une température de 60 à 70°C durant 15 min (Plowman et Peck 2002).

²⁸ D est le temps nécessaire, à la température indiquée, pour diviser par 10 la population du danger microbiologique initialement présente.

3.2.3 Toxines, toxinogénèse et spectre d'activité

Les neurotoxines botuliques (BoNT) constituent une famille de toxines ayant une structure chimique et des propriétés toxicologiques similaires mais qui se distinguent entre elles par leur degré de toxicité variable vis-à-vis des différentes espèces animales. Leur rôle physiologique n'est pas connu et leur présence n'est pas indispensable à la survie et à la croissance des souches qui les produisent (DasGupta 2006).

Selon les souches, le locus codant la toxine botulique est intégré dans le chromosome bactérien ou est porté par des éléments génétiques mobiles non intégrés (plasmides, prophages) ou intégrés : cas des transposons (Zhang *et al.* 2018). Le locus codant la toxine botulique des souches des groupes I et II est généralement localisé sur le chromosome mais peut être aussi porté par des plasmides. Chez les souches du groupe III, le locus est localisé sur un prophage, qui peut persister sous forme de plasmide circulaire, non intégré au chromosome (pseudolysogénie) (Oguma 1976; Le Gratiot *et al.* 2020; Sakaguchi *et al.* 2005).

La production de toxine, soumise à des mécanismes de régulation complexes proches de ceux qui interviennent dans la sporulation (Connan *et al.* 2013) et modulée par de nombreux facteurs physiques (température, pH, etc.) et nutritionnels, est possible dans une très large gamme de conditions environnementales. *In vitro*, la toxinogénèse est observée préférentiellement en fin de phase exponentielle et/ou au début de la phase stationnaire, et décline pendant la phase stationnaire. La température de toxinogénèse est généralement similaire à celle de la croissance. Si les conditions de température sont favorables, les cadavres en décomposition constituent un milieu très favorable à la toxinogénèse, en particulier pour les souches du groupe III (Ortiz et Smith 1994).

Les BoNT sont synthétisées simultanément avec d'autres protéines (NTNH : Non toxique Non Hémagglutinante, Ha : Hémagglutinines et Orf²⁹) avec lesquelles elles forment des complexes protéiques aussi appelés *Progenitor Toxin Complex* (PTC) qui diffèrent selon les types de toxines. Quels que soient leurs types, les toxines botuliques (protéines BoNT) sont initialement synthétisées sous forme d'une chaîne polypeptidique unique d'environ 150 kDa, qui aboutira à la toxine mature composée d'une chaîne légère (chaîne L; 50 kDa) et d'une chaîne lourde (chaîne H; 100 kDa) après action de protéases. La chaîne L et la chaîne H sont maintenues ensemble par une longue ceinture peptidique, des interactions non covalentes et une seule liaison disulfure inter-chaînes (Rossetto *et al.* 2014). Les BoNT des souches du groupe III ont une structure « mosaïque » : elles sont constituées de la chaîne légère de la toxine de type C et de la chaîne lourde de la toxine de type D notée alors toxine C/D ou de la chaîne légère de la toxine de type D et de la chaîne lourde de la toxine de type C alors noté D/C (Figure 1).

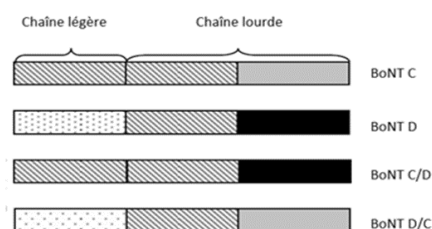


Figure 1 : Schéma de la structure des neurotoxines botuliques C, D, mosaïques C/D et D/C, d'après Woudstra *et al.* (2012)

²⁹ Les protéines Orf (1 à 3) sont synthétisées par les souches productrices de toxines BoNT/E et F et de certaines neurotoxines de sous-types A. Leur rôle physiologique est inconnu, mais il est supposé qu'elles pourraient jouer un rôle dans l'expression, le transport et la régulation de la BoNT (Hill *et al.* 2009).

➤ Mode d'action des BoNT

Les chaînes polypeptidiques constitutives des BoNT correspondent à des domaines différents, un domaine qui porte l'activité toxique et un domaine qui est responsable de la reconnaissance du récepteur cellulaire. Le clivage du pont disulfure reliant les deux chaînes de la neurotoxine est généré dans les neurones, par des protéases synthétisées par la bactérie productrice (cas généralement des souches protéolytiques), ou des protéases de l'hôte. La chaîne légère a une activité enzymatique endopeptidase de type métalloprotéase zinc dépendante et porte l'activité biologique de la neurotoxine. La chaîne lourde assure la liaison spécifique des BoNT aux récepteurs neuronaux (ganglioside et protéine vésiculaire).

La chaîne légère (domaine toxique) clive une protéine cible du complexe SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment receptor*) qui intervient dans la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. La perte d'activité des protéines du complexe SNARE provoque l'inhibition de la libération de l'acétylcholine (Lindström et Korkeala 2006; Tehran et Pirazzini 2018). La diminution du taux d'acétylcholine libérée se traduit par une baisse de la contraction musculaire et l'apparition d'une paralysie dite flasque. Selon son type, chaque neurotoxine a comme substrat une protéine spécifique du complexe SNARE et un site de clivage propre.

Les toxines botuliques sont les agents causaux du botulisme, une maladie qui affecte l'être humain et de nombreuses espèces animales vertébrées : mammifères, oiseaux et poissons. Les invertébrés, en revanche, sont insensibles aux toxines botuliques et peuvent les accumuler dans leurs tissus. Pour une espèce donnée, la toxicité de la toxine dépend du type toxinique, de la dose inoculée et de la voie d'inoculation. Dans les conditions naturelles, le botulisme est habituellement une maladie à porte d'entrée digestive.

- Les toxines botuliques de types A, B, E et plus rarement F sont généralement identifiées dans le botulisme humain (Snow *et al.* 2021). Dans l'espèce humaine, le type A est considéré comme le plus létal (pour ce type les doses létales sont estimées à $1 \mu\text{g.kg}^{-1}$ par voie digestive, 10 à 15 ng.kg^{-1} par voie inhalée et 1 à 2 ng.kg^{-1} par voie parentérale). Les cas de botulisme humain de types C, D, mosaïques C/D, D/C sont rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. La faible sensibilité de l'être humain à ces toxines est l'hypothèse privilégiée pour expliquer la quasi-absence de cas. Plus précisément, la faible sensibilité des humains à ces toxines serait due à leur moindre absorption intestinale car des essais *in vivo* réalisés par injection intradermique ont montré que ces toxines (particulièrement de type C) sont toxiques pour les humains (Eleopra *et al.* 1997). Par ailleurs, les résultats d'essais sur la toxine de type D suggèrent des modes d'action différents de ceux de la toxine de type A (Dressler *et al.* 2019).
- La sensibilité des animaux vertébrés varie selon leur espèce et le type toxinique. Les bovins sont particulièrement sensibles aux types C, D, mosaïques C/D, D/C, mais peuvent être aussi affectés par les types A et B. Les oiseaux sont particulièrement sensibles aux types mosaïque C/D et E et de façon plus variable aux types C et D, mais peuvent être également affectés par les types A. Le botulisme pisciaire est dû au type E, beaucoup plus rarement au type C. Les doses de toxines C, D, mosaïques C/D, D/C nécessaires pour déclencher la maladie après ingestion chez les bovins et les volailles n'ont jamais été définies, si ce n'est pour la toxine D pour les bovins chez lesquels elle a été estimée à $22,5 \text{ MLD}^{30}/\text{kg}$ (contre $2,2 \text{ MLD}/\text{kg}$ par voie sous-cutanée). La dose toxique de toxine C par voie IV a été estimée à $2,88 \text{ MLD}/\text{kg}$. Chez le poulet, la dose

³⁰ La toxicité est exprimée en doses létales de souris (MLD pour « *Mouse Lethal Dose* ») par kg de poids corporel de l'espèce considérée.

létale en IV des toxines mosaïque C/D, C et D a été évaluée respectivement à 5 600 MLD/Kg, 16 000 MLD/Kg et plus de 320 000 MLD/Kg.

- La stabilité des toxines botuliques (dont les données concernent surtout les substrats alimentaires) dépend beaucoup de la composition de la matrice dans laquelle elle se trouve, de la température et du pH (Roberts et Gibson 1979). De nature protéique, la toxine botulique est rapidement dégradée par les enzymes protéolytiques. Elle est en outre sensible à la lumière du soleil (Burrows et Renner 1999; SciCom 2017).
- Les études expérimentales ont surtout porté sur la thermorésistance de la toxine, notamment dans les aliments. Il apparaît que l'inactivation n'intervient pas de manière linéaire, ce qui ne permet pas les inter-comparaisons (Popoff 2017). Pour Siegel (1993), la valeur $D_{76,7}$ (temps de réduction décimale à 76,7°C) pour des toxines botuliques A et B (chaleur humide) varie de 1 à 8 min selon le pH et la composition de l'aliment. La pasteurisation (72°C, 15 sec) permet d'inactiver 99,9 % des toxines de types A et B dans le lait (Siegel 1993; Weingart *et al.* 2010). La toxine de type E est plus thermosensible que celles de types A et B, avec un temps d'inactivation de la toxine de 10 min à 58°C et de 5 min à 62°C, respectivement, en tampon phosphate à pH 7,2. Elle est plus stable en milieu acide. Dans une matrice alimentaire (préparation à base de saumon), 10 min à 74°C ou 5 min à 79°C sont nécessaires pour obtenir une inactivation (Popoff 2017). Les toxines C et D seraient en revanche plus résistantes à la chaleur que les toxines de types A, B et E, une température de 90°C devant être atteinte pendant 2 min pour détruire la toxine de type C, contre 2 min à 60°C pour le type A (Roberts et Gibson 1979).
- Les quelques études relatives à la persistance de la toxine dans l'environnement (sol, eau de lacs, boues, etc.) présentent des résultats souvent divergents en fonction, notamment, des conditions d'observation ou d'expérimentation (Graham *et al.* 1978; Roberts et Gibson 1979). On ne peut exclure une rémanence prolongée dans certains environnements. Une synthèse des données disponibles sur la stabilité des toxines C et D dans différents milieux est proposée dans l'Annexe 3.
- Il est démontré que les toxines peuvent être retrouvées plusieurs mois dans des carcasses putréfiées (et les larves de mouches présentes dans ces carcasses) dans lesquels elle est souvent présente en quantité importante. La concentration de la toxine de type C dans les tissus de souris ayant reçu 1300 à 2000 spores *per os* avant d'être euthanasiées atteint 2×10^5 MLD/g après conservation des cadavres durant 7 jours à 23°C (Smith et Turner 1989). Une étude de toxinogénèse sur des cadavres (conservés à 23°C) de souris euthanasiées après avoir été inoculées *per os* avec des spores de *C.botulinum* de type D a montré qu'il était possible d'y détecter la toxine au bout de 374 jours (Ortiz et Smith 1994). Dans cette étude, cependant, on ne fait pas la part entre une persistance de la toxine et son renouvellement par la bactérie au cours du temps. Enfin, la toxine de type C dans des larves et pupes de mouches (pouvant atteindre 10^5 MLD/g) récoltées dans des cadavres d'oiseaux et exposées en hiver à une température moyenne de 2,3°C, est encore présente à des concentrations élevées (jusqu'à 3200 MLD/g) au bout de 131 jours (Hubálek et Halouzka 1991).
- Sous forme aérosolisée, le taux de toxine botulique décroît de 1 à 4 % par minute en fonction des conditions (température, humidité, etc.). Les températures extrêmes et l'humidité dégradent les toxines, tandis que les aérosols fins finissent par se dissiper dans l'atmosphère. (Arnon *et al.* 2001).

C. botulinum est naturellement présent dans l'environnement, où elle peut être retrouvée sous formes sporulée et végétative. La germination des spores présentes dans les sols et la multiplication des formes bactériennes végétatives associées à la production de toxine sont conditionnées par les effets conjugués de différents facteurs abiotiques et biotiques (incluant notamment le degré d'anaérobiose, la température, le pH, la disponibilité en eau, le potentiel redox et la quantité de matière organique disponible, etc.). Les cadavres en putréfaction constituent à cet égard un milieu très favorable pour *C. botulinum*. Bien que des variations soient probables en fonction de la matrice, dix minutes à 70°C devraient permettre d'inactiver les formes végétatives. Un pH inférieur à 5 inhibe leur croissance et la toxinogénèse.

La sporulation, telle que constatée dans les conditions de laboratoire, intervient durant la phase de transition entre la phase exponentielle de croissance et la phase stationnaire. La sporulation de *C. botulinum* a été peu étudiée en particulier pour les souches de *C. botulinum* du groupe III, les facteurs de déclenchement de la sporulation ne sont pas clairement établis. Il en est de même pour les conditions de germination dans l'environnement. La résistance élevée des spores leur permet de persister des années dans le sol. Leur inactivation peut être obtenue avec certains biocides (dits « sporicides »). Les spores des *C. botulinum* du groupe III sont moins thermorésistantes ($D_{104^{\circ}\text{C}} = 0,8-1,12$ min) que celles des souches du groupe I ($D_{121,1^{\circ}\text{C}} = 0,21$ min).

La production de toxine par les cellules végétatives, du moins *in vitro*, se produit préférentiellement en fin de phase exponentielle et/ou au début de la phase stationnaire et décline pendant la phase stationnaire. La stabilité des toxines (plusieurs jours à plusieurs semaines) dépend de la composition de la matrice dans laquelle elles se trouvent, de la température et du pH. Ces toxines sont également sensibles à la lumière solaire et aux enzymes protéolytiques. Les toxines de types C et D sont plus résistantes à la chaleur que les toxines de types A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70°C suffit pour les inactiver, il faut atteindre 90°C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines C et D.

3.3 Détection et caractérisation dans l'environnement

Il faut rappeler que la manipulation des souches de *C. botulinum* et/ou des toxines botuliques sont soumises à la réglementation sur les micro-organismes et toxines (MOT)³¹ et nécessite la détention d'autorisations délivrées par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM).

3.3.1 Les méthodes d'échantillonnage

Aucune étude n'a été menée pour standardiser un protocole d'échantillonnage permettant la détection de *C. botulinum* dans l'environnement d'un élevage. Les conditions de prélèvement, de transport et de stockage des échantillons ne sont pas systématiquement précisées dans les études disponibles dans la littérature.

Cependant, comme pour toutes les investigations épidémiologiques et ceci quel que soit l'agent pathogène, il est important d'utiliser du matériel stérile et de changer de gants entre deux prélèvements pour éviter les contaminations croisées si plusieurs échantillons sont collectés lors de la même visite. Pour la détection de *C. botulinum* dans l'environnement des

³¹ Code de la santé publique, notamment ses articles L. 5311-1 (16o), L. 5139-1, L. 5139-2, L. 5139-3, R. 1335-2, R. 5139-18 et R. 5139-20, arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article L. 5139-1 du code de la santé publique et arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnées à l'article R. 5139-18 du code de la santé publique.

élevages, le LNR botulisme aviaire utilise des chiffonnettes imbibées de neutralisant pour la détection au niveau des surfaces (murs, matériel, bottes, roues, abreuvoirs, surface des tas de fumier, etc.), des pédichiffonnettes pour la détection au niveau des surfaces au sol (sol du bâtiment d'élevage, abords, parcelles, pâtures, etc.). Pour les autres matrices, le prélèvement est placé dans un sac ou un pot stérile (fumier, sol, aliment, insectes, etc.). La prise d'essai au laboratoire est en général de 25 g pour les solides et 100 g pour les liquides. Tous les échantillons sont congelés après collecte et avant analyse.

Pour le projet BOTUSOL³², un protocole d'échantillonnage a été établi en début de projet et est appliqué à l'ensemble des élevages investigués : le fumier est ainsi prélevé sur 12 points de collecte répartis sur l'ensemble du tas dans des pots stériles remplis aux 3/4, les prélèvements de sol sont réalisés sur l'ensemble de la parcelle à des points bien identifiés avant et un mois après épandage. Tous les échantillons sont congelés avant analyse.

3.3.2 Méthode de détection de *C. botulinum* et de la toxine botulique

Les méthodes de détection de *C. botulinum* (formes végétatives et/ou formes sporulées) et de la toxine botulique sont similaires pour les matrices environnementales à celles utilisées pour le diagnostic du botulisme animal. La détection de *C. botulinum* se fait par enrichissement préalable de l'échantillon puis détection de la présence de la bactérie par une méthode de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) ou par détection de la toxine botulique produite par la bactérie durant la phase d'enrichissement via les méthodes évoquées précédemment.

Les matrices environnementales sont plus complexes à analyser que les organes ou tissus des animaux et des ajustements méthodologiques sont parfois nécessaires. Les échantillons de sol peuvent par exemple contenir des inhibiteurs de PCR, rendant indispensable l'utilisation d'un protocole adapté. Une comparaison des kits d'extraction d'ADN en fonction des matrices à analyser a été menée par le LNR du botulisme aviaire et a montré que des kits différents devaient être utilisés en fonction de la nature de la matrice à analyser (Le Maréchal *et al.* 2018). Par ailleurs, les conditions de culture utilisées vont très fortement impacter le résultat obtenu (Le Maréchal *et al.* 2019c). Il n'y a pas en effet de milieu sélectif disponible. Les matrices environnementales analysées présentant systématiquement une flore annexe, cette dernière peut empêcher la croissance de *C. botulinum* lors de cette phase de culture et donc aboutir à un résultat faussement négatif. Le choix des conditions de culture en fonction des matrices à analyser est donc primordial (Le Maréchal *et al.* 2019c).

Pour la détection de la toxine botulique, trois approches sont possibles : les tests par injection à des souris (test historiquement de référence, très majoritairement utilisé dans les laboratoires et les publications), les tests ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), et les tests basés sur l'endopeptidase dont l'Endopep-MS. Ces deux dernières approches n'ont été développées et appliquées en routine que plus récemment.

Le GT souligne que les limites des méthodes utilisées dans certaines études expérimentales ont fortement impacté l'analyse objective de ces publications et l'interprétation des résultats. Il considère qu'il serait nécessaire d'établir une procédure standardisée au niveau international

³² BOTUSOL « Botulisme animal et épandage des effluents : devenir de *Clostridium botulinum* dans le sol » (2019-2023). Projet financé par France AgriMer. Coordination : Anses laboratoire de Ploufragan (HQPAP, EPISABE). Partenaires : INRAE Dijon (Agroécologie Equipe MERS), INNOVAL. Cette étude utilise le Réseau de Mesure de la Qualité des Sols (RMQS, GIS Sols) pour obtenir des échantillons de sols répartis sur l'ensemble du territoire national et représentatifs des différents modes d'usage des sols (grande culture, prairies, forêts, etc.) ainsi que des différentes pratiques culturales.

pour la détection de *C. botulinum* ou de la toxine pour les méthodes alternatives au test sur souris, y compris dans des échantillons de source environnementale.

3.3.2.1 Le test sur souris ou test « biologique » (*Mouse bioassay* ou MBA)

Cette méthode consiste à mettre en évidence la présence de la toxine botulique (quelle que soit la toxine) dans un échantillon par l'injection intrapéritonéale à des souris du surnageant de l'échantillon dilué et homogénéisé dans une solution tampon (après une étape de filtration pour éliminer les bactéries). Concrètement, afin de réduire le nombre de souris, les injections intrapéritonéales sont réalisées sur deux souris dans un premier temps, puis si ces souris meurent ou présentent des signes cliniques de botulisme, la séroneutralisation est réalisée pour identifier le type toxinique. Un titrage est possible par l'injection aux souris de dilutions sériées de la suspension.

Le test de séroneutralisation sur souris reste considéré comme la méthode de référence pour la détection de la toxine botulique. Il permet de détecter la toxine jusqu'à un minimum de 10 pg/mL.

Cette méthode présente certains inconvénients : les problèmes éthiques liés à l'utilisation des animaux pour réaliser ces tests, le délai d'obtention des résultats (2 à 4 jours) et la disponibilité de la méthode, qui n'est pratiquée en France que par le centre national de référence (CNR).

3.3.2.2 Les tests ELISA

Différents types de tests ELISA sont décrits et utilisés pour détecter soit la toxine botulique, soit les produits de dégradation de l'endopeptidase, soit plus rarement la bactérie elle-même. Il est nécessaire de vérifier pour chacun de ces tests ses caractéristiques et le protocole selon lequel il a été validé. Ainsi, Lindström et Korkeala (2006) notent plusieurs éléments limitants : les anticorps de haute qualité ne sont pas toujours disponibles, les extraits de fèces font baisser fortement la sensibilité des tests, il n'y a pas systématiquement d'information sur le protocole de validation des tests et peu de tests sont validés selon une norme standardisée (Worbs *et al.* 2015), les anticorps monoclonaux ne reconnaissent pas toutes les BoNT pour lesquelles le test a été *a priori* conçu. Ainsi, les performances en termes de sensibilités et spécificités sont variables, dépendantes du lot et de la qualité des composants, de leur assemblage, du fabricant.

Par ailleurs, lorsque le test utilisé dans une étude expérimentale a été spécifiquement développé pour les besoins de cette étude, les résultats obtenus ne peuvent pas être directement comparés avec ceux obtenus dans d'autres études utilisant des méthodes différentes. D'autres biais peuvent être observés : c'est le cas dans l'étude de Rulff *et al.* (2015), qui ne présente pas de témoins positif et négatif dans chaque plaque. Les résultats obtenus sont donc empreints d'une grande incertitude.

Compte tenu de ces éléments, il est recommandé de confirmer les résultats à l'aide d'autres méthodes plus spécifiques.

3.3.2.3 Le test ENDOPEP-MS

La détection de l'endopeptidase est basée sur les propriétés enzymatiques de chaque type de toxine botulique. La détection et l'identification des produits de dégradation du substrat (un peptide synthétique spécifique pour chaque type toxinique) permettent de déterminer le type toxinique (voir section 3.2.3). La possibilité de détecter ces produits par spectrométrie de masse (HPLC-ESI/MS/MS et MALDI-TOF/MS) a été démontrée : à chaque type de toxine

correspond un peptide « substrat » et la spécificité est assurée par le point de clivage du peptide et la masse connue des produits attendus (Barr *et al.* 2005). Les spectromètres de masse sont apparus dans les laboratoires médicaux et vétérinaires depuis 2009 et équipent actuellement de nombreux laboratoires de bactériologie. Ne demandant pas de compétences spécifiques en spectrométrie de masse et protéomique, cette technique est rapide (après toutefois 4 ou 16 h d'incubation pour que le substrat réactionnel soit dégradé), plus sensible que le MBA et réalisable en série. Cette méthode n'est cependant pas encore utilisée en routine en France.

3.3.2.4 Détection des acides nucléiques

La détection des souches de *C. botulinum* peut se faire par une détection moléculaire du gène codant la toxine botulique par PCR. Une étape d'enrichissement est nécessaire avant l'étape d'extraction d'ADN, la quantité de bactéries présentes dans la matrice à analyser étant en général faible et donc non détectée par PCR sans cette étape préalable d'enrichissement. Il n'existe pas de norme pour la détection de *C. botulinum* du groupe III, ni de consensus méthodologique. Chaque étude propose donc son protocole et plusieurs amorces pour les PCR sont présentées dans la littérature.

Il est possible de distinguer les formes végétatives des formes sporulées en traitant thermiquement l'échantillon avant l'étape d'enrichissement. Ce traitement thermique (en général 70°C pendant 10 minutes) permet d'éliminer les formes végétatives et de ne conserver que les formes sporulées. Dans ce rapport, lorsque cela n'est pas précisé, par défaut, le terme *C. botulinum* désigne l'ensemble des formes de la bactérie c'est-à-dire à la fois la forme végétative et la forme sporulée sans distinction.

3.3.2.4.1 *Méthode de PCR (Polymerase Chain Reaction) utilisée par le LNR pour les échantillons issus de l'environnement*

Le LNR utilise l'approche suivante : dilution au 1/10 de la matrice (prise d'essai de 25g) dans du TPGY (*trypticase peptone-glucose-yeast extract*) régénéré dans un *BagFilter*, homogénéisation à l'aide d'un *Pulsifier* (Microgen, Surrey, UK) pendant 15 secondes puis incubation pendant 18 à 24 heures en conditions anaérobies. Pour les chiffonnettes et pédichiffonnettes, la procédure est la même, un volume de 250 mL de TPGY est ajouté. Pour les écouvillons, un volume de 5 mL est ajouté. Pour les analyses d'eau, la prise d'essai est de 100 mL, additionnée à 100 mL de TPGY concentré deux fois. Dans cette approche, aucun traitement thermique n'est appliqué.

Une comparaison des conditions de culture (présence ou absence de traitement thermique, temps d'incubation de 24 h, 4 jours, 10 jours) a été réalisée sur des matrices « intrants » et « digestats » de méthanisation. Six protocoles ont ainsi été comparés pour 30 échantillons naturellement contaminés (15 lisiers et 15 digestats) provenant de 5 méthaniseurs. Le protocole sans traitement thermique avec le temps d'incubation de 24 h était celui qui permettait de détecter le plus grand nombre d'échantillons positifs (16 positifs /30 contre 6/30 pour le protocole le moins performant) (Le Maréchal *et al.* 2019c).

Après l'étape d'incubation, l'extraction d'ADN est réalisée à partir d'1 mL d'enrichissement avec le kit *PowerSoil* (Qiagen®) pour toutes les matrices environnementales sauf pour les matrices type fumiers ou digestats pour lesquelles le kit *Nucleospin-Soil* (Macherey-Nagel®) est utilisé (Le Maréchal *et al.* 2018).

La PCR est ensuite réalisée selon Le Maréchal *et al.* (2019b). Il s'agit d'une PCR en temps réel basée sur des amorces et sondes ciblant 4 zones différentes des toxines C, D, C/D et

D/C. Le type toxinique est déduit en fonction des amplifications obtenues pour ces 4 cibles. Un contrôle est réalisé en routine pour garantir l'absence d'inhibiteurs de PCR dans l'échantillon.

Les matrices qui ont été testées via cette approche sont très variées : sols, effluents, insectes, chiffonnettes, aliments, algues, végétaux, mollusques, etc.

Le seuil de détection de la méthode n'a pas été déterminé pour ces matrices. Seule la méthode de détection de *C. botulinum* de type C, D, mosaïque C/D, mosaïque D/C et E dans les foies d'origine aviaire a été validée par le LNR botulisme aviaire selon la Norme NFU 47-600-1 et 2³³ pour laquelle le laboratoire est accrédité.

3.3.2.4.2 Détection des acides nucléiques (ARN et ADN) sans étape préalable d'enrichissement

Une méthode de détection des acides nucléiques (ARN et ADN) codant les toxines de types C, D, mosaïques C/D et D/C directement après une élution de l'échantillon (sédiments, eau, asticots) dans du PBS (*phosphate-buffered saline*) sans étape préalable d'enrichissement a été développée très récemment (Masters et Palmer 2021).

3.3.2.5 Dénombrement de *C. botulinum* de type C, D, C/D et D/C dans les matrices environnementales

Comme précisé précédemment, il n'existe pas de milieu sélectif permettant d'isoler *C. botulinum* ; il n'est donc pas possible de procéder à un dénombrement de cet agent selon les méthodes classiques de microbiologie. Le dénombrement de *C. botulinum* dans les matrices peut être réalisé par une approche NPP (Nombre le Plus Probable) (Le Maréchal *et al.* 2019a). L'approche consiste à réaliser des dilutions sériées de la matrice préalablement diluée dans le milieu d'enrichissement (au minimum trois réplicats pour chaque dilution), puis à incuber ces dilutions et à détecter *C. botulinum* dans chacune d'entre elles (en utilisant l'une des méthodes présentées précédemment, le plus souvent une méthode basée sur extraction d'ADN suivie d'une PCR). Des tables statistiques sont ensuite utilisées pour déduire le dénombrement dans l'échantillon de départ à partir des résultats de détection/non détection obtenus pour chaque dilution.

3.3.3 Caractérisation des souches de *C. botulinum* du groupe III

L'isolement des souches de *C. botulinum* du groupe III est très difficile. En effet, il n'existe pas de milieu sélectif adapté ; l'enjeu revient donc à identifier les colonies des souches d'intérêt au milieu d'un tapis bactérien (constitué de bactéries anaérobies présentes dans les matrices analysées). De plus, cette bactérie est peu compétitive, certaines souches cultivant difficilement en milieu solide. Enfin, le gène codant la toxine botulique, porté par un prophage, est perdu très rapidement lors du processus d'isolement (Woudstra *et al.* 2012; Franciosa *et al.* 1996). Un protocole a été optimisé par le LNR en 2019 et améliore l'isolement de *C. botulinum* du groupe III à partir des foies de volailles contaminées (Le Gratiot *et al.* 2020). Cependant, cette méthode ne permet pas d'isoler les souches de façon simple à partir des matrices environnementales.

³³ AFNOR. NF U47-600-1. Méthodes d'analyse en santé animale PCR (réaction de polymérisation en chaîne) Partie 1: exigences et recommandations pour la mise en œuvre de la PCR en santé animale 2015.
AFNOR. NFU 47-600-2. Méthodes d'analyse en santé animale PCR (réaction de polymérisation en chaîne) Partie 2: exigences et recommandations pour le développement et la validation de la PCR en santé animale 2015.

Ce verrou méthodologique explique en grande partie l'absence d'outils de typage pour caractériser les souches de *C. botulinum* du groupe III et le faible nombre de génomes disponibles dans les bases de données (actuellement 58). Une méthode MLVA (*Multi Locus VNTR Analysis*) a été développée dans le cadre du projet ANIBOTNET et appliquée récemment à une étude de cas (Souillard *et al.* 2021). Cette méthode présente l'avantage de permettre de comparer les souches détectées dans les échantillons sans passer par l'étape d'isolement.

Il faut également rappeler, autre difficulté, que *C. botulinum* du groupe III ne se différencie pas du cluster *C. novyi sensu stricto* et *C. haemolyticum* (taxospecies). On notera que *C. novyi sensu stricto* est assez couramment détecté dans l'environnement.

3.3.4 Indicateurs biologiques de l'efficacité d'un traitement

Parmi les bactéries indicatrices de l'efficacité d'un traitement (thermique, chimique ou physique) sur une population bactérienne présente dans une matrice, *Escherichia coli*, les entérocoques et *Clostridium perfringens* sont classiquement utilisés, notamment pour le contrôle des aliments. Parmi ces 3 indicateurs, *C. perfringens*, bactérie à Gram positif sporulante, apparaît comme le plus représentatif de *C. botulinum* du groupe III. Cependant, il existe peu de données permettant de savoir si *C. perfringens* présente bien des propriétés de résistance aux procédés similaires à celles de *C. botulinum*, ce qui rend très délicate l'extrapolation à *C. botulinum* des résultats obtenus pour *C. perfringens*. Dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité des procédés de décontamination sur *C. botulinum*, notamment dans les matrices alimentaires, c'est la bactérie *Clostridium sporogenes* qui est classiquement utilisée comme modèle de *C. botulinum* du groupe I. En raison de leur proximité génétique, les bactéries du groupe *C. novyi sensu lato* (*C. novyi* et *C. haemolyticum*) qui ne produisent pas de toxine botulique sont plus appropriées pour *C. botulinum* du groupe III.

D'autres bactéries sporulées peuvent être utilisées comme substituts à *C. botulinum* telles que *Geobacillus stearothermophilus* et *Bacillus subtilis*. *G. stearothermophilus* est actuellement la bactérie produisant la spore connue la plus résistante au traitement thermique, à ce titre ses spores sont proposées comme indicateur commercial prêt à l'emploi³⁴ pour valider l'efficacité des barèmes de stérilisation par autoclavage. Des coupons commerciaux (disques en acier inoxydable) artificiellement contaminés avec différentes charges de spores de *G. stearothermophilus* sont également proposés pour valider l'efficacité des décontaminations par voie aérienne. L'utilisation de cet indicateur constitue la sécurité ultime mais peut engendrer des coûts supplémentaires à la décontamination.

Le mode de préparation des indicateurs biologiques commerciaux ou décrits dans la littérature scientifique est à prendre en compte pour la transposition des résultats. La présence ou l'absence d'interférents lors des essais menés (matières organiques type matières fécales par exemple) importe également. Par exemple, dans le cas de l'évaluation de l'activité d'un produit biocide, il sera nécessaire de vérifier que les essais ont été menés en conditions de saleté³⁵.

³⁴ Ampoules contenant 10⁵ ou 10⁶ spores et le milieu de culture avec un indicateur coloré qui vire en cas de croissance de la bactérie.

³⁵ D'après la norme NF EN 14885 : conditions représentatives de surfaces qui présentent, ou sont susceptibles de présenter des résidus organiques et/ou inorganiques.

Les méthodes de détection de *C. botulinum* et de la toxine botulique à partir de matrices environnementales (sol, sédiments, effluents, végétaux) sont les mêmes que celles utilisées pour le diagnostic du botulisme animal. Elles nécessitent cependant des adaptations méthodologiques pour tenir compte des particularités des matrices (effluents divers, échantillons de sol, etc.). Leur nature polymicrobienne rend très difficile l'utilisation des méthodes de détection classiques fondées sur les techniques d'isolement bactérien, faute de disposer de milieux sélectifs et en raison des difficultés de culture propres aux *C. botulinum* du groupe III.

En France, la méthode développée par le LNR pour la détection de *C. botulinum* (spores et/ou cellules végétatives) et la détermination du type toxinique dans ces matrices, repose sur une étape d'enrichissement avec ou sans traitement thermique préalable suivie d'une étape de détection moléculaire du gène codant la toxine botulique (PCR en temps réel), permettant de caractériser spécifiquement les souches productrices de toxines C, D, mosaïques C/D ou D/C. Cependant, le GT rappelle l'absence de norme pour la détection de *C. botulinum* du groupe III, qui s'explique par une absence de consensus méthodologique.

En l'absence d'utilisation en routine en France de tests ELISA et ENDOPEP-MS, la détection et la détermination de la toxine reposent sur le test sur souris (*Mouse bioassay* ou MBA), réalisé uniquement par le CNR.

La manipulation de *C. botulinum* nécessite la détention d'autorisations délivrées par l'ANSM et peut représenter un danger pour le manipulateur ou l'environnement du fait de la présence de la toxine botulique. Du fait de leur proximité génétique et phénotypique, *C. novyi sensu stricto* pourrait ainsi représenter une bactérie indicatrice appropriée pour la réalisation des tests d'efficacité d'un traitement assainissant (pas besoin d'autorisation pour sa manipulation, pas de production de toxine botulique).

3.4 Présence, persistance et croissance de *C. botulinum* types C, D, mosaïques C/D, D/C dans l'espace agricole

3.4.1 Distribution et prévalence dans les sols en France

C. botulinum est une bactérie tellurique présente sur tous les continents dans les sols, sédiments marins et lacustres, zones humides, rivières et lacs. Les études font cependant ressortir une certaine variabilité en fonction des pays, régions et environnements, et les variations dans la distribution géographique des types de *C. botulinum* ont été bien documentées par Espelund et Klaveness (2014). Tous les types botuliques sont présents en Europe. Le type B prédomine dans les sols, contrairement au type A qui y est assez rarement détecté (Smith 1978; Smith et Young 1980). Le type E, responsable du botulisme pisciaire, est surtout présent dans les zones septentrionales où il est étroitement associé aux écosystèmes aquatiques marins et côtiers, alors qu'il devient plus rare à l'intérieur des terres où prédomine le type B, comme l'a montré Huss (1980) au Danemark. Rarement isolés dans les sols agricoles, les types C, D et mosaïques sont principalement présents dans les marais et autres zones humides des régions d'Europe plus méridionales où ils ont été révélés lors d'épisodes de botulisme dans l'avifaune sauvage.

Il n'existe pas d'historique sur la distribution et la prévalence des divers types botuliques dans les sols en France. Les principales données émanent du projet BOTUSOL, toujours en cours de réalisation, qui vise à analyser la prévalence de *C. botulinum* dans les sols français. Cette

étude utilise le RMQS, GIS Sols pour obtenir des échantillons de sols frais (environ 500) répartis régulièrement sur l'ensemble du territoire national et représentatifs des différents modes d'usage des sols (grande culture, prairies, forêts, etc.) ainsi que des différentes pratiques culturales. Les premiers résultats portent sur 88 échantillons dont 46% s'avèrent positifs (Le Maréchal 2020). Les échantillons positifs se répartissent ainsi : type B seul dans 34% des échantillons, type A seul dans 6%, types B +A dans 2%, B+F dans 2%, B+E dans 1% et B+groupe III dans 1%. Pour 80 % des échantillons positifs des sols analysés, les concentrations en *C. botulinum* étaient inférieures à 8,1 NPP/g [2,6-25]. Ces résultats montrent la large prédominance du type B par rapport aux autres types détectés. Ils soulignent, en revanche, la faible prévalence des types C, D, mosaïques C/D, D/C, lesquels ne représentent que 1% des types toxiques détectés dans les échantillons de sol. Ces données s'accordent avec celles provenant d'autres pays d'Europe qui montrent une prévalence généralement limitée dans les espaces agricoles (Gessler et Böhnelt 2006). La détection de ces spores dans le sol s'expliquerait par la présence d'animaux d'élevage, comme l'illustre une ancienne observation de Smith et Milligan (1979) qui rapportent la présence de spores botuliques, surtout du type B mais aussi des types C, D et E, dans 25 % des échantillons de sol d'un ancien marché aux bestiaux de Londres fermé depuis 1939 contre seulement 5,7 % dans d'autres zones de Grande Bretagne (Smith et Young 1980).

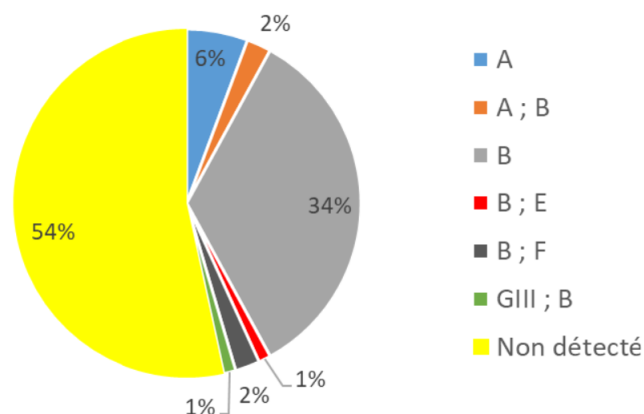


Figure 2 : Évaluation de la contamination des sols français par *C. botulinum* (Le Maréchal, 2020 – projet BOTUSOL)

Les résultats préliminaires obtenus en France dans le cadre du projet BOTUSOL indiquent une large répartition de *C. botulinum* sur le territoire national, qui est détecté dans 46 % des échantillons analysés, avec des concentrations le plus souvent faibles (<8,1 NPP/g [2,6-25]). La quasi-totalité des souches détectées sont de type B, et seulement 1 % des échantillons positifs renferment des souches du groupe III. Rappelons que les foyers détectés ces 20 dernières années dans les élevages de volailles et bovins sont dus à ces *C. botulinum* du groupe III.

3.4.2 Persistance et croissance dans les élevages et leurs effluents

3.4.2.1 Persistance dans les élevages (locaux, abords et parcours)

Actuellement, les données disponibles sont issues d'études menées après identification de foyers de botulisme de type C, D ou mosaïques en élevages aviaire et bovin. Elles concernent la persistance de la bactérie (formes sporulées et végétatives) dans les locaux d'élevage et leur environnement proche et le rôle des effluents d'élevages (litières, fumiers, lisiers ou eaux

résiduaire) dans la dissémination voire l'accumulation des bactéries dans ces milieux. En effet, les animaux, et notamment les volailles via leurs déjections, contribuent non seulement à un enrichissement du sol en matières organiques qui favorise la croissance de la bactérie (Palmer *et al.* 2019), mais aussi à la circulation de l'agent pathogène dans l'environnement et plus particulièrement à la contamination du sol (Popoff 1989).

Les données les plus nombreuses concernent les foyers de botulisme aviaire. Les zones de litières humides et riches en matières fécales (contaminées par les cadavres d'animaux s'ils ne sont pas rapidement éliminés et les fientes des volailles malades ou porteuses asymptomatiques) autour des abreuvoirs sont considérées comme des sites potentiels de multiplication bactérienne, auxquelles s'ajoutent les cadavres. Ces foyers (Souillard *et al.* 2017a; Souillard *et al.* 2017b; Souillard *et al.* 2014) se caractérisent par une large contamination des bâtiments d'élevage (sol et litières, murs, poussières, circuits de ventilation, circuits de distribution d'eau, locaux de conditionnement des œufs, bacs à cadavres d'animaux). Des insectes, notamment les ténébrions (*Alphitobius diaperinus*), des rongeurs et des oiseaux sauvages résidant dans les locaux et l'environnement proche (abords des bâtiments) peuvent contribuer à la dissémination des *C. botulinum*. La contamination du matériel d'élevage et son rôle dans la diffusion du botulisme est également à considérer : Souillard *et al.* (2021) montrent ainsi la présence de *C. botulinum* type mosaïque D/C sur le godet d'un tracteur, incriminé dans la contamination de vaches laitières d'une exploitation mixte, ce matériel ayant été utilisé pour retirer la litière après l'enlèvement des volailles (porteuses sans signe clinique), puis, sans avoir été désinfecté, pour transférer des aliments destinés aux bovins. Ces auteurs soulignent à ce propos le risque de contamination croisée entre filières et l'importance de la biosécurité dans la gestion du risque botulique.

La persistance de la bactérie dans des élevages de volailles contaminés est notamment démontrée par deux études longitudinales effectuées en France (Souillard *et al.* 2017a; Souillard *et al.* 2021). Un premier suivi longitudinal a été réalisé durant cinq mois dans un élevage de poules pondeuses au sol, après la survenue d'un épisode de botulisme de type mosaïque C/D. À la suite de cet épisode et en l'absence de décontamination, les poules (traitées durant 3 jours avec de la tylosine) ont été maintenues dans le local d'élevage. Ainsi, on a pu montrer la persistance de *C. botulinum* durant quatre mois au niveau des circuits de ventilation et durant tout le suivi chez les ténébrions, sur les murs, les pondoirs, les tapis de ponte et la surface des œufs pondus, bien que la bactérie ne soit pas retrouvée dans les fientes des poules et les écouillons cloacaux (Souillard *et al.* 2017b). Un second suivi a été réalisé durant sept mois dans un élevage de poulets de chair après le départ pour l'abattoir d'un lot reconnu *a posteriori* infecté par *C. botulinum* de type mosaïque D/C et la désinfection du local. Les prélèvements effectués à l'entrée et à la sortie de cinq lots successifs de poulets ont permis de révéler la persistance d'un portage sain dans les différents lots pendant plusieurs mois, tandis que la bactérie était toujours détectable au septième mois du suivi dans les circuits de ventilation du local d'élevage (Souillard *et al.* 2021).

Les données concernant les élevages bovins et leur environnement sont en revanche plus limitées. Elles relèvent essentiellement d'observations ou d'investigations qui, suite à la découverte de foyers de botulisme en lien épidémiologique avec des élevages avicoles, ont permis la détection de *C. botulinum* (types mosaïques C/D ou D/C) dans les pâturages, les bâtiments d'élevage (stalles) et le fumier ou le lisier (Souillard *et al.* 2017b; Souillard *et al.* 2015).

3.4.2.2 Persistance et croissance dans les litières et effluents

Outre la contamination des locaux d'élevage liée à la présence des animaux d'élevage porteurs asymptomatiques ou malades, il apparaît que le principal apport de spores botuliques dans les pâturages, prairies et terres agricoles tient, indépendamment du rôle des cadavres d'animaux, au devenir des litières, fumiers et lisiers ou eaux résiduelles contaminées et à l'usage qui en est fait dans le cadre des pratiques agricoles.

En aviculture, la présence de cadavres (et fragments de cadavres) est un point clef du cycle du botulisme de types C, D ou mosaïques. En effet, ils contribuent grandement à la contamination des litières et des effluents d'élevage (Smart *et al.* 1987) qui sont souvent incriminés dans la transmission de *C. botulinum* aux ruminants domestiques (y compris pour les types D ou mosaïque D/C dont les volailles peuvent être porteuses asymptomatiques) (Popoff 1989; Souillard *et al.* 2017b; Souillard *et al.* 2015; Souillard *et al.* 2021).

Les règles de biosécurité applicables aux établissements détenant des volailles (arrêté du 29 septembre 2021) imposent aux éleveurs une surveillance quotidienne dans les bâtiments et parcours afin de vérifier l'état de santé des volailles et d'évacuer les éventuels oiseaux morts, dont les cadavres doivent être collectés et stockés dans un équipement adapté permettant leur conservation en attendant leur enlèvement par l'équarrisseur. En cas de non-respect de ces prescriptions, les cadavres ou parties de cadavres évacués avec les litières et déposés sur les tas de fumier ou laissés sur les parcours seraient accessibles à diverses espèces animales. Le déplacement des cadavres de volailles, notamment par des chiens, dans des prairies avoisinantes, a été incriminé dans la contamination d'élevages bovins (Popoff 1989).

La présence de *C. botulinum* de type C, D ou mosaïques et leur persistance dans les effluents d'élevage est démontrée en particulier par les investigations portant sur les fumiers de volailles. C'est le cas dans l'étude rapportée par Souillard *et al.* (2020) et portant sur 10 élevages (poulets de chair, poules pondeuses ou dindes) touchés par un épisode de botulisme aviaire de type mosaïques C/D ou D/C : deux séries de prélèvements (en surface et en profondeur) ont été collectées à deux mois d'intervalle (la première série étant effectuée deux semaines après l'enlèvement des litières des bâtiments contaminés) sur les tas de fumiers stockés en extérieur. Les analyses (détection par PCR en temps réel après enrichissement) ont montré la présence de *C. botulinum* dans 56,5 % (161/285) des échantillons prélevés sur les deux périodes. En outre, l'abondance d'échantillons positifs pour *C. botulinum* était significativement plus élevée à la seconde visite (65,8 % vs 49,7 %, $P < 0,01$), et dans les prélèvements de surface des tas (63,1 % dans les prélèvements de surface vs 50 % dans les prélèvements en profondeur, $P = 0,025$). Ces données soulignent la persistance de la contamination durant ce temps de stockage et suggèrent la possibilité d'une multiplication de la bactérie. Elles complètent les observations épidémiologiques identifiant le fumier de volaille (issu de lots infectés - malades ou non - par *C. botulinum*) comme l'une des principales sources de contamination à l'origine des foyers de botulisme bovin de type C ou D (Popoff 1989; Payne *et al.* 2011; Relun *et al.* 2017; Souillard *et al.* 2017a; Souillard *et al.* 2021).

Dans le cadre du projet BOTUSOL, il a été observé une persistance de *C. botulinum* d'au moins 7 mois, dans un fumier de bovins traité à la chaux, et d'au moins 3 mois dans le lisier, dans des élevages bovins infectés (Le Maréchal, communication personnelle, 2021).

L'ensemble de ces observations souligne l'importance des effluents d'élevage dans la dispersion de *C. botulinum* et la contamination de l'espace agricole.

Le développement d'un foyer de botulisme en élevage bovin ou aviaire, de même que le portage asymptomatique (types D et mosaïque D/C en particulier) dans des élevages aviaires s'accompagnent d'une large dissémination de la bactérie dans les locaux (surfaces et équipements en contact avec les animaux ou leurs déjections, comme les circuits de ventilation ou les tapis de ponte en élevage avicole) et leurs abords. Des études longitudinales dans les foyers aviaires ont montré, en l'absence de décontamination, la persistance de *C. botulinum* au moins durant les 5 à 7 mois correspondant à la durée du suivi.

Les effluents, issus de ces foyers, en particulier les matières fécales et urines (avec ou sans litière) sont largement contaminés (en particulier lorsqu'ils sont d'origine aviaire). Leur suivi, jusqu'à sept mois dans du fumier de bovins (pourtant traité à la chaux) montre la persistance de *C. botulinum*, et des études de tas de fumier de volailles stockés sans traitement durant deux mois suggèrent (données à confirmer) une possibilité de multiplication. Ces données montrent qu'un assainissement naturel par simple stockage ne peut être envisagé.

3.4.3 Persistance et croissance dans les prairies et autres surfaces agricoles

Peu de données sont disponibles sur le devenir des *C. botulinum* du groupe III, suite à l'épandage d'effluents d'élevages bovins et aviaires contaminés, sur des prairies ou des surfaces cultivées. La partie ci-dessous s'intéresse au devenir de cette bactérie dans le sol, l'aspect concernant la contamination éventuelle des végétaux produits sur ces surfaces étant traitée plus loin dans ce rapport (Section 3.4.5).

3.4.3.1 Persistance et croissance après épandage sur les prairies

Il est reconnu depuis longtemps que la mise au pâturage de bovins dans des prairies sur lesquelles des effluents provenant d'élevage de volailles ont été épandus est un facteur de risque de développement de foyers de botulisme (Popoff 1989). La contamination peut être objectivée par la détection de l'agent pathogène sur le sol, soit dans des échantillons de terre, soit dans des prélèvements réalisés en surface avec des pédichiffonnettes, comme l'ont montré Souillard *et al.* (2017a) en identifiant *C. botulinum* de type mosaïque D/C dans des pâtures contaminées du fait de leur proximité avec des élevages de volailles infectées.

Une publication de Smart *et al.* (1987) relative au suivi d'un élevage bovin dont les animaux avaient contracté le botulisme (type C) une dizaine de jours après épandage de litière de volailles sur leur pâture, mentionne la réapparition de la maladie chez un bovin réintroduit sur la pâture deux mois après l'épandage. En revanche, aucun cas n'a été signalé chez des moutons et des bovins remis sur cette pâture, respectivement sept et huit mois après l'épandage. Par ailleurs, l'ensilage réalisé à partir d'herbe collectée sur cette parcelle trois à quatre mois après épandage n'a pas occasionné de résurgence de botulisme.

Dans leur étude, Souillard et Kuntz (2020) ont suivi une parcelle enherbée après épandage avec enfouissement d'un fumier stocké sous bâche durant deux mois après un épisode de botulisme de type mosaïque C/D dans un élevage de dinde. Le fumier était contaminé (17 échantillons positifs sur les 20 analysés), et *C. botulinum* a été détecté (2 pédichiffonnettes positives sur les 2 analysées) après épandage sur une parcelle initialement non contaminée. Après cinq mois la bactérie était toujours détectée sur le sol (1 pédichiffonnette positive sur 2 et dans 3 échantillons de terre sur 12).

Nous citerons enfin un suivi effectué par Notermans *et al.* (1981) après identification d'un foyer de botulisme bovin consécutif à la distribution aux animaux de grains de brasserie (malt)

contaminés par une souche de *C. botulinum* de type B protéolytique. Les auteurs ont observé le développement d'un cycle initié par l'épandage (en hiver et début du printemps) du fumier contaminé à partir des fèces des bovins, suivi d'une contamination de l'ensilage d'herbes récoltées sur ces terrains et d'une excrétion de la bactérie dans les fèces des bovins nourris l'hiver avec cet ensilage et fréquentant les pâturages l'été. Dans cette étude, les spores étaient encore présentes dans le sol des pâtures 2,5 années plus tard, avec une augmentation significative de la concentration de spores détectées dans les échantillons de sol par rapport aux contrôles initiaux (130 NPP/g [50-130] versus < 0,2 NPP/g [<0,1-1]). Il est cependant difficile de définir si ces observations portant sur *C. botulinum* de type B protéolytique (groupe I) sont transposables aux cas de contamination par *C. botulinum* du groupe III.

3.4.3.2 Persistance et croissance après épandage sur des sols cultivés

Les effluents d'élevage sont largement utilisés pour la fertilisation organique des sols voués aux productions végétales, qu'elles soient à vocation alimentaire (cultures fourragères, céréalières, légumières, etc.) ou non.

Il existe très peu de travaux sur le devenir des *Clostridium* après l'épandage d'effluents sur des sols cultivés. Dans une étude menée sur dix années en Ontario (Canada), Scott *et al.* (2018) ont comparé les concentrations en *Clostridium* sp. dans des échantillons de sols prélevés sur des parcelles cultivées avec du maïs et fertilisées ou non avec trois types de compost (compost de biodéchets, de déchets de jardins ou de lisier de porc). Alors qu'ils n'étaient pas détectables (< 20 UFC³⁶/g masse sèche) dans la majorité des parcelles témoins (sans compost) ou amendées avec les composts de biodéchets et de déchets de jardins, les *Clostridium* ont été retrouvés régulièrement à des concentrations comprises entre 5.10² et 1,3.10³ UFC/g (masse sèche) dans les sols des parcelles fertilisées avec du compost de lisier porcin, démontrant ainsi le rôle de l'apport d'effluents d'élevage sur la présence de *Clostridium* dans les sols agricoles.

Quelques investigations concernent spécifiquement la recherche de *C. botulinum* dans des parcelles fertilisées avec des effluents issus d'élevages atteints de botulisme. Une étude réalisée dans le cadre du projet BOTUSOL (Le Maréchal, communication personnelle, 2021) portait sur la fertilisation (épandage avec enfouissement précédant le semis) avec un lisier de bovins atteints de botulisme de type mosaïque D/C (concentration dans le lisier inférieure à 8,1 NPP/g [2,6-25]) : les échantillons prélevés sur le sol en surface immédiatement après épandage se sont avérés tous positifs, mais étaient négatifs un mois plus tard alors que dans l'étude de Souillard et Kuntz (2020) présentée précédemment les échantillons de sols étaient encore positifs cinq mois plus tard.

Des expérimentations ont été enfin réalisées sur des sols fertilisés avec des composts inoculés artificiellement avec *C. botulinum* ou *C. sporogenes* (utilisé notamment comme substitut de *C. botulinum* du groupe I).

Girardin *et al.* (2005), en fertilisant des parcelles avec un compost de fumier de bovin inoculé avec des spores de *C. sporogenes*, ne constatent qu'une faible diminution du nombre de spores dans le sol (inférieure à 0,7 log) et détectent la présence des spores à un niveau encore élevé (4,7 log UFC / g de sol (masse sèche)) seize mois plus tard.

Une étude de Gessler et Böhnelt (2006) menée en plein champ indique que les spores de *C. botulinum* de type D sont encore détectables au-delà de 2,5 ans dans un sol amendé avec un compost de biodéchets contaminé artificiellement à raison de 10⁵ spores / g (soit un apport de

³⁶ Unité formant colonie.

3×10^8 spores par m^2). Dans ce cas, un transfert en profondeur (entre 10 et 30 cm) est observé aux plus fortes concentrations. Avec une dose d'inoculum plus faible évaluée à 10^3 spores/g, les spores sont seulement retrouvées dans la partie superficielle (0 à 3 cm) et ne sont plus détectables au bout de deux ans.

Il faut rappeler, à propos de ces observations, que le devenir de *C. botulinum* en termes de croissance et de survie est fortement dépendant des caractéristiques des sols et de l'effet des différents facteurs abiotiques et biotiques que la bactérie y rencontre (Palmer *et al.* 2019). En outre, il existe une forte association entre la présence des spores de type C ou D et les teneurs élevées en matières organiques (Espelund et Klaveness 2014). Les observations précédemment citées montrent donc la possibilité d'une persistance prolongée de *C. botulinum* après épandage d'effluents, notamment lorsqu'ils sont fortement contaminés comme c'est le cas dans les études dans lesquelles les sols ont été expérimentalement inoculés avec des quantités importantes de bactéries. Pour des contaminations faibles, les recherches se heurtent aux problèmes d'échantillonnage et aux limites de détection de la bactérie.

D'une manière générale, la capacité des spores de *C. botulinum* à survivre de manière extrêmement prolongée dans le sol ou les amendements organiques apportés aux cultures (Gessler et Böhnelt 2006; Palmer *et al.* 2019) induit un risque de contamination des végétaux produits et, par leur intermédiaire, celui d'une contamination des animaux et humains les consommant.

La connaissance du devenir de *C. botulinum* dans le sol après épandage d'effluents d'élevages bovins et aviaires contaminés sur des prairies ou des terrains cultivés souffre d'un manque de données, lié au peu d'études disponibles.

Dans le cas des prairies, la principale étude disponible (Notermans *et al.* 1981), suite à un épisode de botulisme bovin de type B protéolytique (groupe I), relève un accroissement de la quantité détectable de bactéries dans le sol par rapport aux contrôles initiaux et la présence de *C. botulinum* 2,5 années plus tard. Les études (données essentiellement qualitatives) réalisées après épandage d'effluents d'élevage contaminés par des souches de *C. botulinum* du groupe III dans le sol des pâtures dépassent rarement quelques mois. L'une d'entre elles relève un cas de botulisme lors de la mise à l'herbe de bovins deux mois après l'épandage, mais aucun cas après leur mise à l'herbe sept à huit mois après l'épandage (Smart *et al.* 1987).

Les quelques études de terrain portant sur la recherche de *C. botulinum* dans la terre, après épandage d'effluents naturellement contaminés sur des surfaces consacrées à des cultures, montrent que l'abondance et la durée de détection de la bactérie (ce qui doit être aussi le cas lors d'épandages sur prairies) paraissent dépendre du niveau de contamination du produit épandu. Ainsi, après épandage avec enfouissement d'un lisier de bovin contenant une charge en *C. botulinum* de type mosaïque D/C estimée à moins de 10 NPP/g en vue de fertiliser un terrain avant semis de colza, la bactérie devient indétectable dans des échantillons de terre prélevés un mois plus tard. La détection de la bactérie est en revanche prolongée après épandage de produits plus fortement contaminés, atteignant plusieurs années dans des parcelles recevant des fertilisants organiques expérimentalement inoculés avec des concentrations de *C. botulinum* atteignant au moins 10^5 UFC par gramme de matière sèche.

3.4.4 Persistance dans les poussières et aérosols

L'observation de cas répétés de botulisme dans des élevages bovins situés à proximité d'élevages aviaires ou de parcelles où des effluents d'élevages contaminés ont été stockés

ou épandus pose la question de la persistance de *C. botulinum* dans les poussières et aérosols et de leur rôle dans la contamination de ces animaux. La question se pose aussi d'un risque éventuel pour les riverains exposés.

Les poussières constituent le principal polluant atmosphérique en élevage intensif de porcs et de volailles (Cambra-López *et al.* 2010). Elles sont constituées d'un mélange de plusieurs types de composants organiques et inorganiques tels que des moisissures, des bactéries ou des virus, des mycotoxines et des endotoxines. Elles véhiculent également des gaz irritants (NH₃) et des produits chimiques tels que des désinfectants, des métaux lourds, des pesticides et des antibiotiques. Les fèces, particulièrement sèches en élevages avicoles, constituent une source importante des poussières générées.

Les agents pathogènes aéroportés, y compris les spores bactériennes, peuvent causer de nombreuses maladies, notamment le botulisme (Bhardwaj *et al.* 2021). Ils se disséminent par l'air *via* les poussières, les aérosols et les gouttelettes. Ils sont souvent associés à des particules comme des fragments de sol ou des agglomérats d'autres cellules microbiennes. Du fait de leur faible taille (les bioaérosols bactériens ont un diamètre inférieur à 10 µm (Li *et al.* 2011)), les bactéries peuvent rester en suspension dans l'atmosphère pendant quelques jours et peuvent être transportées sur de très longues distances (plusieurs milliers de km) (Després *et al.* 2012).

3.4.4.1 Aérosolisation des bactéries dans ou à proximité des élevages.

Des quantités de matières particulaires élevées sont mesurées près des bâtiments d'élevage (McEachran *et al.* 2015), en particulier dans les élevages de volailles (jusqu'à 200 fois plus élevés que dans l'air ambiant), suivis par les élevages porcins, les élevages laitiers émettant des quantités de poussières dans l'air les plus faibles parmi les trois productions (Aarnink et Ellen 2007; Winkel *et al.* 2015; Lai *et al.* 2014). Les quantités de particules dans l'air varient selon le type d'élevage. Ainsi, une étude menée en France dans des installations commerciales d'élevage de poules pondeuses a permis de montrer une concentration de poussières ambiantes respirables (≤ 4 µm) nettement supérieure dans des volières en comparaison d'élevages au sol ou en cages. Le type de logement et la présence de litière ont un effet prépondérant sur la qualité de l'air. Les concentrations de poussières dans les bâtiments d'élevage en cages étaient influencées par la conception des cages et les pratiques d'élevage, tandis que la gestion de la litière, l'âge des poules et le contrôle de la température étaient des facteurs déterminants pour les niveaux de poussières dans les logements au sol (Le Bouquin *et al.* 2013).

Dans les élevages au sol, la litière représente la principale source de poussières organiques. Les bioaérosols de poussières peuvent contenir des bactéries appartenant à de nombreux genres tels que *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Pasteurella*, *Vibrio*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Brucella*, *Leptospira*, *Haemophilus*, *Mycoplasma*, *Yersinia*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Micrococcus*, *Pantoea*, et *Sarcina* (Sieminski 2001), provenant du sol, de l'aliment, de la litière ou des oiseaux (Lonc et Plewa 2010).

Les *Firmicutes* et *Actinobacteria* sont les *phyla* prédominants identifiés dans la poussière des élevages bovins, *Staphylococcus*, *Romboutsia*, *Corynebacterium* et *Paenibacillus* étant les genres les plus abondants (Martikainen *et al.* 2021). Le genre *Clostridium* est également détecté mais son abondance relative est plus faible (Martikainen *et al.* 2021).

Dans la salle de traite, les poussières sont générées par les matières fécales et la peau des animaux (Roque *et al.* 2016) et mises en suspension dans l'air par les mouvements de ces derniers. La voie aéroportée constitue une source de contamination du lait (Piessens *et al.*

2011; Vacheyrou *et al.* 2011; Bayle *et al.* 2021). Les genres bactériens prédominants identifiés dans des prélèvements d'air dans les salles de traite sont *Curtobacterium*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, *Aerococcus*, *Staphylococcus* et *Pseudomonas* (Vacheyrou *et al.* 2011). Les agents pathogènes anaérobies n'ont pas été recherchés dans ces études.

3.4.4.2 Détection de *C. botulinum* dans les poussières

La poussière est considérée comme un des composants du réservoir naturel de *C. botulinum* au même titre que le sol. *C. botulinum* a pu être détecté dans des poussières lors d'investigations menées dans le cadre d'épisodes de botulisme infantile (Arnon *et al.* 1979; Nevas *et al.* 2005; Derman *et al.* 2014).

En ce qui concerne la contamination des poussières dans les élevages, une étude menée en Allemagne dans 49 élevages de bovins n'a permis de détecter des spores de *C. botulinum* que dans un échantillon de poussière d'un élevage laitier et uniquement du type B (Schmid *et al.* 2013). (Schmid *et al.* 2013).

Lors d'épisodes cliniques de botulisme en élevage de volailles, la détection de *C. botulinum* via des chiffonnettes au niveau des murs des bâtiments ou dans les circuits de ventilation montre la présence de la bactérie dans les poussières (Souillard *et al.* 2014).

La dissémination de *C. botulinum* par l'air a été suggérée pour expliquer la contamination d'une pâture située à une centaine de mètres d'un bâtiment de volailles (Souillard *et al.* 2017a).

3.4.4.3 Dissémination par voie aérienne lors de l'épandage des effluents

Du fait du faible taux d'humidité (caractère pulvérulent) des fumiers de volaille, l'épandage de ces derniers est propice à l'aérosolisation de matières particulaires (mélange complexe de particules liquides et solides en suspension dans l'atmosphère) (Kabelitz *et al.* 2020). L'épandage de fumier de volaille frais (taux d'humidité de 30 à 50 %) permet de réduire l'aérosolisation des matières particulaires et la dispersion microbienne au cours des opérations d'épandage. Au contraire, un stockage prolongé en été ou un séchage du fumier sans granulation³⁷ est à éviter pour prévenir une trop forte aérosolisation de matières particulaires et indirectement des agents microbiens pathogènes lors de l'épandage. Le traitement idéal des effluents d'élevage pour minimiser l'aérosolisation des matières particulaires et des bactéries est le compostage tant que le taux de matière sèche reste inférieur à 70 % (Kabelitz *et al.* 2021). Une distance d'au moins 150 m et de manière optimale supérieure à 400 m de la source d'émission des matières particulaires, déterminée à partir d'une étude portant sur *C. difficile*, est conseillée pour minimiser le risque pour la santé publique (Kabelitz *et al.* 2021).

Une étude récente a montré que lors des opérations d'épandage, les bactéries présentes dans le fumier de volailles sont facilement aérosolisées, ce qui pourrait être lié à leur attachement aux particules du fumier de faible densité. Les émissions de bactéries d'origine fécale sont beaucoup plus faibles lorsque l'épandage est réalisé avec enfouissement dans le sol. Cette technique réduit ainsi le risque d'infection par voie aérienne des travailleurs lors des opérations d'épandage. Le dénombrement des entérocoques après épandage sans enfouissement a par exemple été estimé à $2,9 \cdot 10^5$ entérocoques dans 1 m^3 d'air contre $9,4 \cdot 10^3$ avec enfouissement (Thiel *et al.* 2020).

Des épisodes de botulisme bovin ont déjà été rapportés chez des animaux situés à plusieurs centaines de mètres des champs dans lesquels du fumier de poulets contaminé était stocké

³⁷ La granulation consiste à comprimer la matière en granulés par pressage.

ou épandu. Une des voies de contamination suspectée est la dissémination par le vent de *C. botulinum* et/ou de la toxine botulique présentes dans le fumier (Hogg *et al.* 2011).

L'analyse³⁸ d'un produit pulvérulent issu de litières de volailles et incriminé dans le développement d'un foyer de botulisme de type mosaïque D/C dans un élevage bovin situé à une distance de 150 à 250 mètres du lieu d'épandage, a montré une absence de toxine à un niveau détectable et une quantité de *C. botulinum* détectée après enrichissement par PCR en temps réel de 15 NPP / g après traitement thermique (inactivant les formes végétatives), contre 35 NPP / g sans traitement thermique (présence de spores et formes végétatives) (Le Maréchal, communication personnelle, 2021). Cette observation souligne les capacités des formes végétatives à se maintenir sous forme viable au contact de l'air dans un tel substrat.

C. botulinum peut être détectée dans les circuits de ventilation et au niveau des parois des bâtiments dans les élevages contaminés, suggérant fortement sa dissémination par les poussières. Le rôle des poussières entraînées par le vent lors d'épandage d'effluents contaminés ou à partir de tas de fumiers de volailles a fait l'objet de nombreuses constatations épidémiologiques suite à l'éclosion de foyers de botulisme bovin. A cet égard, les fumiers de volaille, du fait de leur teneur en matières sèches élevée (faible teneur en eau) et de la faible taille des particules, sont plus propices à l'émission de matières particulaires que les fumiers de bovin. Des études portant sur *C. difficile* dans des effluents de volailles ont montré que la bactérie pouvait être ainsi propagée sur 150 à 400 mètres du site d'épandage.

3.4.5 Contamination des végétaux destinés à l'alimentation animale et humaine

3.4.5.1 Contamination des végétaux par des bactéries pathogènes pour les animaux et les humains

La quasi-totalité des connaissances sur la contamination des végétaux par des bactéries pathogènes résulte d'études initiées pour tenter d'expliquer le développement de TIAC³⁹ consécutives à la consommation de végétaux crus. Elles portent notamment sur *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* ou *Listeria monocytogenes*, bactéries retrouvées notamment dans les rejets fécaux d'origine animale et véhiculées dans les fertilisants organiques (Heaton et Jones 2008; Park *et al.* 2012; Kłapeć *et al.* 2016; Jo et Park 2019).

Le devenir de ces bactéries est notamment étudié lorsqu'elles sont déposées par aspersion sur les feuilles (salades, épinards, etc.) ou mises en contact avec les racines lorsque la plante se développe dans un substrat inoculé avec l'agent pathogène.

Déposées sur les feuilles et bien qu'exposées à une forte dose d'UV et à des fluctuations de température et d'humidité qui peuvent altérer leur viabilité (Heaton et Jones 2008), certaines bactéries, notamment si elles expriment des facteurs d'adhésion, peuvent rencontrer, dans des microsites, un écosystème favorable leur permettant de persister (une quinzaine de jours par exemple pour certaines souches d'*Escherichia coli*) sur les surfaces foliaires de certaines plantes (Fett 2000; Macarisin *et al.* 2013).

³⁸ Mesures réalisées sur des triplicats avec une prise d'essai initiale de 25 g.

³⁹ Les toxi-infections alimentaires collectives ou TIAC correspondent à l'apparition d'au moins deux cas similaires d'une symptomatologie, en général gastro-intestinale, dont on peut rapporter la cause à une même origine alimentaire.

Certaines bactéries entéro-pathogènes (telles que *E. coli* O157:H7 et des salmonelles) en contact des plantes peuvent pénétrer dans les tissus végétaux (Jo et Park 2019) à partir des feuilles (pénétration par les stomates, par exemple) et/ou des racines. Au niveau des racines, la rhizosphère représente un écosystème microbien complexe influencé par les sécrétions racinaires (Narula *et al.* 2012) au sein duquel il est possible d'isoler des bactéries pathogènes (Kłapeć *et al.* 2016) et à partir duquel elles peuvent éventuellement pénétrer dans les tissus de la plante et devenir des bactéries endophytes (Wright *et al.* 2017).

Peu d'études portent sur la persistance ou la colonisation de végétaux par des *Clostridium*. Malgré un taux de détection élevé (87,6 %) dans des échantillons de terre collectés à partir de la rhizosphère de différents végétaux (laitues, aneth, radis, carottes et betteraves, avec des concentrations atteignant parfois 4 log₁₀ UFC /g de matière sèche), Kłapeć *et al.* (2016), dans une étude réalisée en Pologne, ne détectent *C. perfringens* que dans une faible fraction des végétaux analysés (2 sur 35 analysés, soit 5,7 %).

Par ailleurs, Zeiller *et al.* (2015), en plantant du trèfle dans un substrat stérilisé co-inoculé avec des spores de *C. sporogenes* ou *C. botulinum* type D et *Rhizobium leguminosarum* (1 mL de suspension contenant pour moitié 10⁵⁻⁷ spores par mL de *C. botulinum* type D et 10⁷ UFC par mL de *Rhizobium leguminosarum* déposé à la base de chaque plant de trèfle), constatent les concentrations les plus importantes dans la rhizosphère des plantes, notamment en surface racinaire, dans l'espace intercellulaire de la partie corticale de la racine et des jeunes pousses. Toutefois, cette unique étude disponible a été réalisée à partir de concentrations bactériennes élevées sans rapport avec les concentrations habituellement détectées dans les effluents épandus, et dans un substrat stérilisé éliminant les compétitions microbiennes. Ces conditions ne correspondent pas à celles normalement observées dans le sol et les résultats ne sont pas corroborés par des études de terrain ou sur des végétaux récoltés pour l'alimentation animale ou humaine. Ainsi, si cette étude estime possible une internalisation de *C. botulinum* dans certains végétaux et pour certaines conditions, elle ne permet pas de conclure à une réelle colonisation de la plante, ni de juger de l'importance de ce phénomène *in situ*.

3.4.5.2 Contamination des végétaux destinés à l'alimentation animale

Les observations sur la contamination éventuelle de végétaux dédiés à l'alimentation animale se limitent, suite à la découverte de foyers de botulisme aviaire ou bovin, à la détection précédemment évoquée de *C. botulinum* en surface de pâtures contaminées à la suite d'épandage ou exposées à des poussières ou aérosols véhiculant la bactérie et/ou sa toxine. Popoff (1989) a recensé (avec détection de la bactérie et/ou sa toxine) différents végétaux (foin, luzerne, betteraves fourragères, grains) incriminés comme véhicules de contamination des bovins. Il est cependant impossible dans la majeure partie de ces cas de définir si les végétaux étaient contaminés avant, pendant leur récolte (présence de terre contaminée, notamment lors d'un fauchage trop ras du sol, présence du cadavre d'un petit animal broyé par l'ensileuse, etc.), durant leur stockage (présence de cadavres de rongeurs, oiseaux, reptiles, etc.) ou après transformation (préparation à la ferme des aliments du bétail).

Les observations de terrain ne semblent pas corroborer l'hypothèse d'une multiplication de *C. botulinum* sur ou dans les végétaux avant leur récolte, mais soulignent l'importance de leur contamination à partir des spores ou formes végétatives présentes ou apportées dans le sol lors des opérations de fertilisation organique. Le mode de conservation des fourrages joue un rôle important en cas de contamination (hors présence d'un cadavre de petit mammifère, oiseau ou reptile), le risque de multiplication bactérienne et de production de toxine étant très

faible dans le foin sec, important dans le cas d'un fourrage enrubanné trop humide ou d'un ensilage dont le pH est trop élevé.

3.4.5.3 Contamination des végétaux destinés à l'alimentation humaine (cultures maraîchères...)

La capacité de *C. botulinum* à se multiplier sur des fruits et légumes frais est hautement improbable. Cette question avait été particulièrement examinée pour les salades prêtes à l'emploi conditionnées en emballage sous atmosphère modifiée. C'est seulement à des températures élevées (> 20°C) et dans des atmosphères modifiées (conditions proches de l'anaérobiose) que la multiplication et la production de toxine ont pu être mises en évidence sur diverses espèces végétales de légumes frais découpés (ICMSF 2010). Les niveaux de contamination observés dans les fruits et les légumes frais résultent exclusivement de l'environnement de culture, des transferts depuis le sol et des conditions de la récolte. Par exemple, la contamination en spores de *C. sporogenes* s'établissait entre < 100 et 1000 spores/g de plante sur du persil cultivé sur un sol inoculé avec 10⁶ spores/g de sol (Girardin *et al.* 2005). Il est à noter que dans cette étude les charges de spores inoculées sont très importantes et que dans des conditions normales il faut s'attendre à un niveau de contamination des végétaux beaucoup plus faible.

D'une manière générale, le risque majeur de contamination est lié à la capacité des spores à persister longtemps dans le sol ou dans les amendements organiques contaminés apportés aux cultures (Gessler et Böhnelt 2006; Palmer *et al.* 2019). Ce risque peut aussi découler d'une irrigation des cultures avec des eaux contaminées (eaux résiduaires par exemple). Mais si la présence de *C. botulinum* sur des fruits et légumes frais est établie par plusieurs enquêtes, des contaminations supérieures à 1 spore /g sont exceptionnelles (Notermans 1993 ; Carlin *et al.* 2004). En outre, si la contamination par des spores botuliques de végétaux fraîchement récoltés pour la consommation humaine a été mise en évidence, cet événement semble rare, comme l'a démontré une étude réalisée en France avec seulement 2 échantillons positifs sur 316 analysés (carottes et haricots verts) (Sevenier *et al.* 2012). Dans ce type d'études, réalisées en dehors du contexte de fertilisation avec des effluents issus d'élevages infectés, le type B est le plus communément détecté en Europe, et le seul retrouvé dans l'étude française.

Le GT rappelle que les foyers de botulisme alimentaire décrits dans la littérature sont souvent liés aux toxines botuliques de types A et B. Les produits végétaux incriminés sont des conserves de légumes, suite au non-respect des barèmes de stérilisation, et non des légumes frais (Anses 2021a).

Les connaissances relatives à une contamination des végétaux (productions légumières notamment) découlent essentiellement d'études expérimentales sur la persistance en surface et les possibilités d'internalisation dans la plante de bactéries entéro-pathogènes apportées par des fertilisants organiques, et incriminées dans des TIAC (salmonelles, *E. coli*, etc.). Une expérimentation de Zeiller *et al.* (2015) portant sur des plants de trèfle, mis en culture dans un substrat stérilisé inoculé avec des spores de *C. sporogenes* ou *C. botulinum* type D avec une co-inoculation des *Rhizobium*, a montré que ces bactéries trouvaient dans la rhizosphère de la plante un environnement favorable (susceptible de permettre leur croissance) à partir duquel elles pouvaient pénétrer dans la racine. Les conditions particulières de cette expérimentation

et les fortes concentrations microbiennes utilisées ne permettent pas cependant, de statuer sur la réalité d'une internalisation et sur son importance dans les conditions naturelles.

Aucune observation de terrain, en alimentation animale ou humaine, ne semble corroborer l'hypothèse d'une multiplication de *C. botulinum* sur ou dans les végétaux avant leur récolte. Le risque découle de la persistance de l'agent pathogène en surface (feuilles et/ou racines) après que le végétal ait été directement en contact avec l'effluent (épandage sur prairie par exemple) ou contaminé à partir des bactéries présentes dans le sol.

En alimentation animale, la contamination des végétaux par *C. botulinum* est principalement décrite à la suite d'épandages sur prairies. À cet égard, le délai de trois à cinq semaines au minimum après épandage habituellement conseillé avant la mise à l'herbe des ruminants ou la récolte des végétaux destinés à leur alimentation, est insuffisant pour prévenir le développement de la maladie.

Si la contamination par des spores botuliques de végétaux fraîchement récoltés pour la consommation humaine peut être mise en évidence, elle s'avère généralement rare, avec des niveaux très faibles : les concentrations supérieures à 1 spore de *C. botulinum* / g sont exceptionnelles.

4 Opérations de décontamination en élevage : procédés applicables et efficacité vis-à-vis de *Clostridium botulinum*

La présence et la persistance de *C. botulinum* de types C, D et mosaïques dans les élevages atteints soulignent l'importance des mesures de décontamination à mettre en œuvre afin de prévenir les résurgences et le développement de nouveaux foyers en lien épidémiologique avec les précédents.

La décontamination⁴⁰, est définie⁴¹ comme la série d'opérations, comprenant notamment des actions de nettoyage et de désinfection, visant à obtenir l'élimination ou la réduction du nombre d'agents pathogènes jusqu'à un niveau ne permettant plus leur dissémination.

Comme l'ont montré les différentes études présentées dans le chapitre précédent, les sites et matrices sur ou dans lesquels persistent ces bactéries, et donc à prendre en considération lors de la détection d'un épisode de botulisme en élevage, peuvent être classés en trois catégories :

- Les supports inertes représentés par les bâtiments et matériels d'élevage, en incluant les véhicules (tracteurs, bennes...) ;
- Les produits organiques, notamment les effluents d'élevages (litières, fumier, lisier, eaux résiduaires) et aliments contaminés ;
- Les matrices environnementales, représentées notamment par les abords des locaux d'élevage, parcours, pâtures, etc.

Les cellules végétatives de *C. botulinum* n'étant pas connues comme particulièrement résistantes et la toxine botulique en elle-même pouvant être assez aisément détruite (Arnon *et al.* 2001), les spores de *C. botulinum* seront la cible privilégiée des procédés de décontamination, choisis et dimensionnés à dessein.

Le choix des procédés de décontamination, qu'ils soient physiques, chimiques ou biologiques, appliqués seuls ou en association, en fonction des supports et matrices considérés, est donc conditionné par leur activité sporicide. Cette activité peut être évaluée sur les spores botuliques de types C, D ou mosaïques ou, à défaut, sur des spores d'autres espèces bactériennes (micro-organismes d'essais), dont le caractère de résistance est jugé au moins équivalent et qui peuvent être recherchées à la place de *C. botulinum* en tant qu'indicateurs de traitement (voir section 0).

Il convient donc, pour répondre aux questions de la saisine, d'évaluer sur la base des connaissances disponibles, les résultats attendus des traitements envisageables dans les conditions du terrain permettant la destruction des spores de *C. botulinum*. Il faut en outre rappeler que la méconnaissance des doses infectieuses (quantités de spores et/ou de formes végétatives de *C. botulinum* du groupe III) et des doses toxiques (quantités de toxine de type C, D ou mosaïques) par voie orale, très variables d'une espèce à l'autre, sont méconnues, ce qui ne permet pas de définir une « dose acceptable » à atteindre pour évaluer l'efficacité des

⁴⁰ Dans le cadre du règlement biocide 528/2012/CE, la terminologie décontamination est liée aux moyens et mesures d'élimination du produit biocide des zones traitées ou en cas de rejet dans l'environnement. Dans le contexte de cette saisine, le terme décontamination est employé au sens d'un traitement (visant l'élimination de l'agent pathogène) par nettoyage et désinfection.

⁴¹ D'après le guide technique du plan national d'intervention sanitaire d'urgence (PNISU) dans le domaine de la santé animale sur la décontamination d'un élevage. DGAL, février 2021.

traitements de décontamination proposés. À cet égard, et compte tenu des méthodes analytiques disponibles pour ces contrôles (cf. section 3.3), **on considérera comme efficace tout traitement qui réduit à un niveau non détectable la présence de *C. botulinum* et de ses toxines, sur les supports ou dans les matrices considérés. C'est ce sens que nous donnerons dans ce document à un traitement assainissant et à la notion d'assainissement vis-à-vis de *C. botulinum*.**

Deux remarques s'imposent cependant. La première porte sur le sens donné à cet objectif ; la seconde est relative à la notion d'« hygiénisation » par rapport à celle d'« assainissement ».

- Faute de pouvoir atteindre l'objectif fixé dans certaines matrices (effluents par exemple), il pourrait être quand même satisfaisant de rechercher abattement significatif de la charge en *C. botulinum*. Cette possibilité se heurte néanmoins à la quasi-absence de données quantitatives sur la contamination de ces matrices et à l'impossibilité de définir un seuil à atteindre en deçà duquel le risque de contracter la maladie devient négligeable pour les animaux exposés. En effet, ni la dose toxique par ingestion des toxines de type C, D, mosaïques C/D et D/C, ni la dose infectieuse qui engendre une toxi-infection ne sont définies chez les bovins et les volailles. Un abattement de la charge bactérienne peut néanmoins contribuer à réduire la pression infectieuse et limiter le risque d'émergence d'un foyer de botulisme.
- Dans la terminologie utilisée pour qualifier le traitement des effluents (eaux résiduaires, boues d'épuration, lisiers, fumiers, etc.), il est habituel de parler d'« hygiénisation ». D'un point de vue sanitaire, ce terme peut être utilisé pour qualifier les effets d'un traitement (chauffage par exemple) ou d'un processus (compostage par exemple) qui réduit à un niveau non détectable certains agents pathogènes présents ou qui limite le risque biologique en réduisant la charge en agents pathogènes à des taux acceptables. En pratique l'hygiénisation cible des agents pathogènes d'origine fécale (salmonelles, entérovirus, œufs d'helminthes, etc.) éventuellement présents dans les effluents bruts dans le but d'en réduire la concentration et d'interrompre leur transmission.

Il convient enfin de rappeler que les différents procédés qui seront présentés et analysés dans ce chapitre ne sont pas forcément comparables. En effet, l'objectif premier des procédés chimiques est l'élimination des micro-organismes pathogènes, alors que celui des procédés biologiques appliqués aux effluents est en premier lieu une transformation de la matière organique. Dans le compostage, par exemple, la dégradation biologique de la matière organique permet d'obtenir un produit riche en composés humiques, stable, homogène et sans odeur (compost) valorisable en agriculture ; l'effet hygiénisant observé résulte principalement de l'augmentation de température provoquée lors de ce processus. Dans la digestion anaérobie, le but est la production du biogaz et non l'élimination des micro-organismes pathogènes, laquelle est surtout tributaire des pré- et/ou post-traitements réalisés.

4.1 Décontamination des supports inertes

La décontamination, lorsqu'elle s'adresse aux locaux d'élevages, se conçoit en l'absence des animaux et après élimination des cadavres.

4.1.1 Description des procédés

La liste des matrices et surfaces retrouvées en élevage révèle la complexité des traitements, inhérente d'une part à la diversité des milieux à traiter (surfaces métalliques, bois, etc.), et d'autre part à l'accessibilité et la capacité de nettoyer ces supports (gaines de ventilation par

exemple). En conséquence, les procédés de décontamination choisis devront être adaptés à ces contraintes.

Les procédés de décontamination applicables aux supports inertes en élevage sont physiques et/ou chimiques.

4.1.1.1 Procédés physiques

Cette voie de décontamination comprend des procédés mécaniques, des procédés thermiques et des procédés par rayonnements.

4.1.1.1.1 *Procédés mécaniques*

Les procédés mécaniques (balayage, brossage, dépoussiérage, raclage, nettoyage haute pression, etc.) sont utilisés lors des étapes de nettoyage du matériel et des bâtiments pour retirer le maximum de matière organique et ainsi maximiser l'efficacité des autres étapes de décontamination, notamment l'étape de désinfection. L'emploi de détergent en association avec le décapage est une étape essentielle pour éliminer la matière organique (voir section 4.1.1.2.1).

4.1.1.1.2 *Procédés thermiques*

Deux procédés de thermo-désinfection potentiellement actifs sur les spores de *C. botulinum* sont utilisables pour le traitement des surfaces en élevage : la flamme appliquée en continu et la projection de vapeur sous pression à haute température (140 à 150°C).

Dans les deux cas, l'efficacité de la désinfection est influencée par la conductibilité thermique des matériaux : la flamme, efficace pour du matériel métallique, l'est moins pour des surfaces en béton, et encore moins pour les sols en terre battue plus ou moins humides pour lesquels des températures de 1000 °C doivent être atteintes pour se rapprocher de l'efficacité obtenue par action de la chaux vive (Valancony *et al.* 2000). L'efficacité de la vapeur d'eau est altérée par son refroidissement rapide. Ce procédé peut convenir pour des surfaces limitées à sol bétonné (en particulier pour détruire les éléments parasitaires) mais n'est pas recommandé pour les grandes surfaces.

En outre, la mise en œuvre de la thermodésinfection, tout en nécessitant un matériel spécifique, est difficile et coûteuse pour l'éleveur.

4.1.1.1.3 *Procédés par rayonnement*

Ni l'utilisation de rayonnements émis par des lampes UV classiques (peu efficaces sur les spores), ni celle des générateurs d'UV à lumière pulsée (plus efficaces, et utilisés principalement pour la désinfection d'emballages et d'aliments) (Elmnasser *et al.* 2007) ne sont adaptées à la problématique de la décontamination des locaux d'élevages.

4.1.1.2 Les procédés chimiques

Cette voie de décontamination met en jeu des produits détergents (nettoyage, détersion) et des produits biocides (désinfectants) ayant une activité sporicide.

4.1.1.2.1 Produits détergents

Est considéré comme « détergent » toute substance ou mélange aux propriétés tensioactives destinés à des processus de lavage et de nettoyage. Leur commercialisation est encadrée par le règlement n° 648/2004/CE⁴².

L'emploi de détergent associé au décapage est une étape essentielle pour éliminer la matière organique. Suivant les surfaces à nettoyer, cette étape permet aussi de réduire la concentration de bactéries par un facteur 10 à 1000 en comparaison à un lavage avec eau mais sans détergent (Blondel *et al.* 2018; Misra *et al.* 2020).

4.1.1.2.2 Produits biocides

La mise sur le marché et l'utilisation des produits biocides sont encadrées par le règlement n° 528/2012/CE (dit Règlement Biocides)⁴³. Au sens de ce règlement, on entend par produit biocide « toute substance ou tout mélange, sous la forme dans laquelle il est livré à l'utilisateur, constitué d'une ou plusieurs substances actives, en contenant ou en générant, qui sont destinées à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique ». Les produits biocides destinés à être utilisés pour la désinfection des matériaux et surfaces associés à l'hébergement ou au transport des animaux, pour la désinfection des surfaces en contact avec les aliments pour animaux et pour la désinfection de l'eau potable destinée aux animaux, appartiennent au type de produit 3 (TP3) relatif à l'hygiène vétérinaire, au type de produit 4 (TP4) relatif aux surfaces en contact avec les aliments et au type de produit 5 relatif à l'eau potable.

Selon l'article 19 du règlement biocides, une des conditions d'octroi d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) est que le produit biocide doit être suffisamment efficace pour les usages revendiqués.

La désinfection, dans le cas des sites infectés par le botulisme, doit s'effectuer avec un produit dont l'efficacité sporicide est démontrée dans le cadre du règlement biocides sur l'une des souches modèles des normes CEN⁴⁴ applicables, en tenant compte des instructions données pour l'usage. Parmi les substances actives les mieux adaptées figurent les oxydants et les désinfectants chlorés. Le classement du désinfectant doit être pris en compte et les instructions d'emploi incluant des mesures de prévention visant à limiter l'exposition de l'homme et de l'environnement pour garantir l'absence d'effet nocif du produit lors de son utilisation doivent être mises en œuvre : port d'équipements de protection, désinfection hors présence humaine, en dehors de l'applicateur, et hors présence animale, gestion des effluents de produits, gestion du risque d'incendie, etc.

La désinfection peut s'effectuer :

- Par application directe sur les surfaces avec un produit biocide sporicide utilisé sous forme liquide (ou sous forme solide solubilisée dans un liquide), sous forme de gel ou de lingettes, par pulvérisation, aspersion, trempage, brossage, essuyage, etc.
- Par application par voie aérienne avec un produit biocide sporicide utilisé sous forme gazeuse ou sous forme de microgouttelettes (aérosol).

⁴² Règlement (CE) n° 648/2004 du parlement européen et du conseil du 31 mars 2004 relatif aux détergents.

⁴³ Règlement (CE) n° 528/2012 du parlement européen et du conseil du 22 mai 2012 concernant la mise à disposition sur le marché et l'utilisation des produits biocides.

⁴⁴ Comité Européen de Normalisation.

Dans tous les cas, il est essentiel de respecter les conditions d'utilisation définies dans le cadre de l'autorisation (concentration d'emploi, température, temps de contact, etc.) et de suivre les recommandations d'utilisation figurant sur l'étiquetage, pour une efficacité optimale des produits détergents et biocides. Ainsi, pour les biocides, l'utilisation d'une eau de dilution présentant un pH, une dureté ou une température inadaptés, le non-respect de la dose d'emploi, du mode d'application ou du temps de contact, ou encore le mélange de produits incompatibles entre eux sont autant de causes d'inefficacité.

4.1.2 Efficacité des procédés

Ce chapitre sera limité aux procédés chimiques, les procédés physiques, si on excepte la phase capitale de curage et nettoyage, étant peu applicables à la décontamination des locaux et matériels d'élevage, ainsi qu'aux véhicules.

4.1.2.1 Méthodes d'évaluation de l'efficacité désinfectante des produits biocides dans le cadre d'une autorisation de mise sur le marché dans le domaine vétérinaire

Les méthodes d'évaluation des activités microbicides des désinfectants chimiques ont fait l'objet, au niveau européen, d'une démarche de standardisation au sein du CEN TC 216⁴⁵ depuis le début des années 1990. Aujourd'hui, plus d'une trentaine de méthodes de laboratoire sont publiées ou en cours d'élaboration, et la liste de ces normes ainsi que les modalités de leur utilisation sont décrites dans la norme générale EN 14885⁴⁶. Outre les définitions nécessaires à la compréhension de ces documents, cette norme regroupe les méthodes utiles pour justifier des revendications biocides dans trois grands domaines : le domaine médical, le domaine vétérinaire et le domaine alimentaire, industriel, domestique et collectivité.

4.1.2.1.1 *Activité sporicide dans les normes CEN*

Dans le cadre du CEN TC 216, aucune norme spécifique au domaine vétérinaire n'a été publiée pour l'activité sporicide pour les applications directes des produits sur les surfaces.

La norme de base EN 14347⁴⁷ ainsi que la norme de suspension EN 13704⁴⁸ sont utilisées pour revendiquer une activité sporicide des produits dans les secteurs alimentaire, industriel, domestique et collectivité. Il existe depuis 2018 une norme de suspension (EN 17126⁴⁹) pour la désinfection des surfaces, des instruments et du textile dans le domaine médical. La norme EN 17272⁵⁰ (avril 2020) décrit une méthode d'essai permettant d'évaluer une activité désinfectante de procédés de désinfection des surfaces par voie aérienne. Elle est entre autres applicable à la démonstration de l'activité sporicide dans le domaine vétérinaire.

⁴⁵ *Technical committee 216 - « Antiseptiques et désinfectants chimiques »* du Comité Européen de Normalisation.

⁴⁶ NF EN 14885 Antiseptiques et désinfectants chimiques - Application des Normes européennes sur les antiseptiques et désinfectants chimiques.

⁴⁷ EN 14347 « Antiseptiques et désinfectants chimiques - Activité sporicide de base — Méthode d'essai et prescriptions (phase 1, étape 1) ».

⁴⁸ EN 13704 « Désinfectants chimiques – essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine de l'agro-alimentaire, dans l'industrie, dans les domaines domestiques et en collectivité – Méthode d'essai et prescription (phase 2, étape 1) ».

⁴⁹ EN 17126 « Désinfectants chimiques – essai quantitatif de suspension pour l'évaluation de l'activité sporicide des désinfectants chimiques utilisés dans le domaine médical – Méthode d'essai et exigences (phase 2, étape 1) ».

⁵⁰ EN 17272 « Antiseptiques et désinfectants chimiques – méthodes et désinfection des pièces par voie aérienne par des procédés automatisés – détermination de l'activité bactéricide, fongicide, levuricide, sporicide, tuberculocide, mycobactéricide, virucide et phagocide ».

En complément à ces listes de normes européennes spécifiques à chacun des trois domaines, la norme NF EN 14885 spécifie également que, lorsqu'il n'existe aucune norme appropriée pour une application (exemple : domaine vétérinaire), l'utilisation d'une norme d'un autre domaine est recommandée (exemple : domaine médical ou industriel), en adaptant les conditions d'essais au domaine ciblé.

➤ Micro-organismes d'essai

Le micro-organisme d'essai désigné dans la norme EN 13704 est la forme sporulée de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) avec comme possibilités d'utiliser des micro-organismes additionnels, des spores de *Bacillus cereus* (ATCC 12826) et des spores de *Clostridium sporogenes* (CIP 7939).

La norme médicale EN 17126 rend obligatoire une efficacité sporicide à la fois sur *Bacillus subtilis* et *Bacillus cereus* ; il est néanmoins possible de ne revendiquer que *Clostridioides difficile* (anciennement *Clostridium difficile*). Pour la désinfection des surfaces par voie aérienne (EN 17272), le micro-organisme d'essai utilisé est *Bacillus subtilis*.

➤ Méthodes d'essai

La recherche de l'activité sporicide dans les normes EN 13704 et EN 17126 est réalisée au moyen d'une suspension permettant d'apprécier une réduction bactérienne supérieure ou égale à 3 log₁₀ (EN 13704) et 4 log₁₀ (EN 17126) en 15 à 60 min, à 20°C, en présence de matière organique (conditions de propreté ou de saleté). Des conditions d'essai additionnelles sont également prévues portant sur le temps de contact (entre 15 et 60 min) et la température (entre 4 et 80°C).

Pour la désinfection des surfaces par voie aérienne (EN 17272), les conditions d'essai (température, temps de contact) sont fonction des revendications ; la réduction visée est dans ce cas supérieure ou égale à 3 log₁₀.

4.1.2.1.2 Revue de l'efficacité des substances actives biocides dans la littérature

Pour désinfecter des surfaces contaminées par des *C. botulinum*, il est impératif d'utiliser des produits biocides dont l'activité sporicide est reconnue (Tableau 4) car c'est sous sa forme sporulée que *C. botulinum* est le plus résistant à la désinfection. À noter que l'action sporicide d'une substance active peut être renforcée en fonction des co-formulants qui seront ajoutés dans le produit fini.

Les familles de substances actives notifiées / approuvées⁵¹ dans le cadre du règlement biocides et reconnues par types de produits (TP) destinés à l'hygiène vétérinaire (TP3), la désinfection des surfaces en contact avec les denrées alimentaires et les aliments pour animaux (TP4) et la désinfection des eaux de boisson (TP5) sont présentées dans le Tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4 : Familles de substances actives notifiées/ approuvées dans le cadre du règlement biocides ainsi que leur activité sporicide d'après Russell (1990)

Famille de désinfectants	Exemples	Mode d'action déterminé sur les cellules végétatives	Action sporicide (Russel, 1990)	TP3	TP4	TP5
Acides	Acide benzoïque	Inhibition de la synthèse des protéines et des acides	Non sporicide	X	X	X

⁵¹ A noter que des dispositions nationales peuvent s'appliquer pour certaines substances actives.

		nucléiques, altération des parois cellulaires				
Alcools	Éthanol, Isopropanol	Dénaturation protéique	Non sporicide		X	
Aldéhydes	Formaldéhyde, Glutaraldéhyde	Inhibition de la synthèse des protéines et des acides nucléiques, altération des parois cellulaires	Sporicide	X	X	
Ammoniums quaternaires	Benzalkonium	Altérations membranaires	Non sporicide	X	X	
Bases	Chaux vive et hydratée	Dénaturation protéique Altérations membranaires Altération des parois cellulaires	Sporicide	X		
Biguanides	Polyhexaméthylène biguanide	Altérations membranaires	Non sporicide	X	X	
Halogénés	Produits chlorés et iodés	Dénaturation protéique Altérations membranaires Altération des parois cellulaires	Sporicide	X	X	X
Isothiazolinones	Chlorométhyl-isothiazolinone	Dénaturation protéique Altérations membranaires	Non sporicide		X	
Oxydants	Peroxyde d'hydrogène, Acide peracétique, (Ozone)	Dénaturation protéique	Sporicide	X	X (X)	X (X)
Phénols et dérivés	Chlorocrésol	Altérations membranaires Dénaturation protéique	Non sporicide		X	

Parmi les substances actives présentées dans le tableau ci-dessus, les produits appartenant aux classes des aldéhydes, oxydants et halogénés sont retenus pour leur activité sporicide (Russell 1990). Ces derniers seront donc les produits les plus appropriés pour la désinfection des surfaces contaminées par des spores de *C. botulinum*. Néanmoins, très peu d'études ont été publiées sur la désinfection des surfaces contaminées par *C. botulinum*. Les principales données de la littérature portant sur les *Clostridium* ciblent les espèces *Clostridioides difficile*, un agent bactérien incriminé dans les infections nosocomiales, et *C. perfringens*, un agent responsable de contaminations alimentaires dont les volailles peuvent être à l'origine (McCrea et Macklin 2006), mais aussi responsable d'entérites nécrotiques chez plusieurs espèces d'animaux dont les volailles et les bovins.

Quelques résultats existent aussi pour *C. sporogenes* qui peut être défini comme un *C. botulinum* du groupe I ne produisant pas de toxine botulique. En revanche, il existe beaucoup plus d'informations sur la désinfection vis-à-vis des spores du genre *Bacillus* et en particulier de l'espèce *B. anthracis*. En effet de nombreux auteurs se sont intéressés à la désinfection des surfaces contaminées par les spores de cette espèce bactérienne suite à l'épisode des enveloppes contaminées par *B. anthracis* aux États-Unis en septembre 2001. Les principales données disponibles sur l'efficacité de la désinfection vis-à-vis des spores concernent donc le genre *Bacillus* mais certains travaux ont pris en considération à la fois des spores des genres *Bacillus* et *Clostridium* dans des conditions expérimentales similaires, ce

qui permet de transposer, dans une certaine mesure, les résultats obtenus sur les spores de *Bacillus* aux spores de *Clostridium*.

➤ Les oxydants, halogénés et aldéhydes

Perez *et al.* (2005) ont comparé l'efficacité de différents produits désinfectants halogénés (dioxyde de chlore à 600 mg/L, hypochlorite de sodium (eau de javel) à 1000 mg/L, 3000 mg/L et 5000 mg/L) et d'un produit désinfectant de nature oxydante, à base de peroxyde d'hydrogène (70000 mg/L), sur des spores de *B. subtilis*, *C. sporogenes* et *C. difficile* (deux échantillons de la même souche cultivée sur deux milieux de culture différents) déposées sur des coupons en acier inoxydable. Les résultats obtenus montrent que les différents produits désinfectants entraînent un abattement de 6 log₁₀ du nombre de spores mais avec des temps de contact différents selon les produits et les souches. Néanmoins la durée maximale de traitement nécessaire n'excède pas 30 minutes.

Oie *et al.* (2011) ont comparé l'efficacité de l'hypochlorite de sodium à 0.1 % et 0.5 % (additionné ou non de vinaigre), du glutaraldéhyde à 2 % et de l'acide peracétique à 0,3% pour désinfecter en solution ou par essuyage différentes matrices (PVC, bois, carrelage, ciment) contaminées par des spores de deux espèces de *Bacillus* ou des spores de *C. botulinum*, *C. tetani* et *C. difficile*. Les résultats concernant les spores de *Clostridium* n'ont pas été détaillés mais leur résistance à la désinfection a été jugée moins forte que celle des spores du genre *Bacillus*. Il est apparu que l'hypochlorite de sodium avait peu d'activité sur des surfaces en bois contrairement à l'acide peracétique à 0,3 %. Les résultats montrent qu'un temps de contact d'au moins 30 minutes est nécessaire pour achever la désinfection, même si pour certaines surfaces (PVC, carrelage, etc.) les spores étaient inactivées au bout d'une dizaine de secondes.

Par ailleurs, Uwamahoro *et al.* (2018) ont évalué l'activité sporicide de deux désinfectants oxydants dont l'un à base d'acide peracétique (5 %) et l'autre à base de peroxyde d'hydrogène et d'acide peracétique (2 %), en prenant comme référence différentes formulations d'hypochlorite de sodium (6000 ppm et 3.65 %) et de peroxyde d'hydrogène à 4,5 %. Les agents cibles étaient des spores de *C. difficile* et de *Bacillus amyloliquefaciens* déposées sur des coupons d'inoc. Les résultats de l'étude indiquent que les différents désinfectants testés entraînaient une réduction du nombre de spores de l'ordre de 5 log₁₀ dans un laps de temps d'une dizaine de minutes. Le degré d'efficacité des produits désinfectants évalués est similaire vis-à-vis des spores des deux espèces bactériennes testées.

Pour assurer une meilleure efficacité des opérations de désinfection, en particulier sur des surfaces verticales, Le Toquin *et al.* (2018) ont évalué l'activité désinfectante d'une mousse à base de peroxyde d'hydrogène à 12 % (v/v) (substance active biocide) et du coformulant xanthane (agent favorisant l'adhérence de la mousse) sur des spores de *Bacillus thuringiensis* déposées sur des coupons en polystyrène. Le procédé permet d'obtenir un abattement du nombre de spores de 8 log₁₀ en 45 minutes. L'importance de la température sur l'efficacité du procédé a été aussi mise en exergue. Le temps d'exposition pour atteindre un abattement de 8 log₁₀ était de 45 minutes à 30°C contre 2h30 à 4°C.

Les résultats publiés portent principalement sur les désinfectants utilisés par application directe sur les surfaces. Néanmoins deux études rapportent l'évaluation de l'utilisation du peroxyde d'hydrogène par voie aérienne sur des spores de *C. difficile* (Steindl *et al.* 2015) et *C. botulinum* de type A (une souche), E (une souche) et 3 souches de *Clostridium* spp. génétiquement proches des *C. botulinum* du groupe II (Johnston *et al.* 2005). Les tests effectués sur les spores de *C. difficile* déposées sur des coupons (carreaux en céramique) en présence et absence de matières organiques montrent un abattement supérieur à 4 log₁₀ sous

l'action du peroxyde d'hydrogène gazeux. Le temps d'action optimal du peroxyde d'hydrogène varie en fonction de la localisation des coupons. Un abattement supérieur à 4 log₁₀ est obtenu au bout d'une heure pour les coupons directement exposés au peroxyde d'hydrogène et au bout de trois heures pour les coupons placés dans un tiroir.

Les travaux de Johnston *et al.* (2005) montrent aussi une efficacité du peroxyde d'hydrogène sous forme vapeur (355 ppm) en moins de 30 minutes. Il apparaît que la sensibilité des spores du genre *Clostridium* (*C. botulinum* et *Clostridium* spp. non toxigènes) varie selon les souches, mais ce phénomène est aussi observé pour les spores de *Bacillus*. Une variabilité de la sensibilité des spores est mise en évidence dans de nombreuses études. Une part de cette variabilité pourrait être liée aux modes de préparation des spores dont différents paramètres (nature du milieu, température, purification éventuelle) (Dyer *et al.* 2019) ont été montrés comme capables d'influencer la stabilité.

Wood et Adrion (2019) ont testé différents produits commerciaux de désinfection dont l'efficacité avait été évaluée sur des spores de *B. anthracis* déposées sur des surfaces. Les auteurs ont intégré les résultats concernant les spores d'autres espèces bactériennes dont les *Clostridium*, lorsque des données étaient disponibles. Ils ont considéré un procédé comme efficace lorsqu'il entraînait un abattement supérieur à 6 log₁₀. L'hypochlorite utilisé sous différentes formes a été jugé efficace sauf sur les surfaces poreuses. L'utilisation de l'hypochlorite sous forme de gel apparaît intéressante pour la décontamination des surfaces verticales. Parmi les désinfectants oxydants, l'efficacité du peroxyde d'hydrogène liquide est limitée et doit être souvent optimisée par l'apport d'activateur. Son activité est faible sur les surfaces organiques comme le bois. L'efficacité du peroxyde d'hydrogène par voie aérienne sur les spores est variable selon les conditions opératoires. La difficulté réside dans le maintien d'une concentration optimale dans toutes les zones du local et sur les équipements à traiter. L'efficacité de la désinfection est moindre sur des surfaces comme le bois ou le béton. Les aldéhydes présentent une efficacité désinfectante significative vis-à-vis des spores ; malgré son classement CMR⁵², le formaldéhyde (liquide ou sous forme gazeuse) est peut être aussi utilisé en élevage⁵³.

L'efficacité du glutaraldéhyde/formaldéhyde 2% est optimisée à température élevée et en milieu acide. L'efficacité est peu affectée par la présence de matière organique et en eaux dures ; ce produit est également peu corrosif pour les matériaux (Gosling *et al.* 2017; McLaren *et al.* 2011).

Certains dérivés halogénés, comme l'hypochlorite de sodium ont une bonne activité dans un pH acide mais sont sensibles à la chaleur (> 50 °C) et à la présence de matière organique ; ils demeurent actifs en eaux dures et sont corrosifs pour les métaux lorsqu'ils sont utilisés à plus de 500 ppm (Fukuzaki 2006; Gelinac *et al.* 1984).

Les peroxygènes, comme l'acide peracétique, peuvent être utilisés en milieu acide ; ils sont actifs à basse température, mais sensibles à la présence de matière organique et aux eaux dures ; en présence de chlorures, ils deviennent corrosifs pour les métaux (Amass *et al.* 2001).

L'efficacité des aldéhydes et ammoniums quaternaires est réduite par temps froid (< 15 °C), lorsque la température ambiante est entre 0 et 5 °C (Blinov *et al.* 2014; Marois-Fiset *et al.* 2013).

⁵² Cancérogènes, mutagènes et toxiques pour la reproduction.

⁵³ Le formaldéhyde est une substance active biocide approuvée. <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/FR/TXT/PDF/?uri=CELEX:32020R1763&from=EN>

➤ Iode et dérivés iodés

L'iode et les dérivés iodés ont une très bonne activité à froid à pH acide (entre 3 et 5). Ils sont détruits à des températures excédant 40 °C. Ces produits sont sensibles aux protéines et aux eaux dures. Ils ont une action corrosive sur les métaux et colorent les matériaux. Au final, ils ne sont pas aussi performants que l'hypochlorite de sodium (Gelinat *et al.* 1984; McDonnell et Russell 1999).

➤ Ozone

Wood et Adrion (2019) ont étudié l'utilisation de l'ozone pour assurer la décontamination par voie aérienne en espace intérieur de matériaux contaminés par des spores de *B. anthracis* ou *B. subtilis*. L'efficacité de la désinfection à l'ozone est apparue dépendante du taux d'humidité et du type de surface. Pour une concentration de 9000 ppm pendant 6 heures, à 75 % d'humidité relative, il est observé une diminution des spores de *B. anthracis* de 2,2 log₁₀ sur le bois et de 1,7 log₁₀ sur le verre. À 85 % d'humidité relative cette diminution est de 6,3 log₁₀ sur le bois et 3,2 log₁₀ pour le verre.

➤ Chaux⁵⁴

La chaux vive (oxyde de calcium) agit en augmentant l'alcalinité du milieu traité avec la possibilité d'atteindre un pH supérieur à 12. Son hydratation s'accompagne d'un fort dégagement de chaleur (réaction exothermique) et conduit à la formation de chaux éteinte (hydroxyde de calcium). L'utilisation de la chaux vive présente donc un intérêt supplémentaire par rapport à la chaux éteinte en permettant, en réagissant avec l'eau, d'associer élévation du pH et action thermique. Des températures de l'ordre de 45-100°C peuvent être observées pendant quelques minutes, au moment de l'application de la chaux vive. Ainsi, la charge microbienne peut être réduite durant l'exposition aux températures les plus élevées, l'augmentation de la température ayant alors un effet synergique avec l'environnement alcalin sur la dénaturation des protéines.

L'action létale de la chaux vive sur les formes végétatives des bactéries est bien établie, mais plus d'incertitudes concernent les formes sporulées. Assez peu d'études portent sur son efficacité sur les spores de *Clostridium*, et elles concernent essentiellement *C. perfringens* et *C. sporogenes*. Au vu de la durée assez brève de l'élévation de température induite par la réaction exothermique et le degré de thermorésistance des spores, certains auteurs considèrent que l'efficacité de la chaux nécessite un pH élevé (supérieur à 12), durant un temps prolongé (Bauza-Kaszewska *et al.* 2014). Ces auteurs, en cherchant à estimer les concentrations de chaux affectant la viabilité de spores *C. sporogenes* mélangées à des déchets de viandes (concentration initiale : 6,84 UFC/g), constatent avec la chaux à 50 % une réduction de 1 log au bout de 30 minutes et de 3 log au bout de 48 heures. En revanche, sur des spores de *Clostridium* sulfite-réducteurs dans des boues d'épuration traitées avec 25 % de chaux, Gantzer *et al.* (2001) obtiennent une réduction maximale de 1,7 log.

La chaux vive peut être utilisée en aviculture pour traiter les murs et les sols bétonnés des locaux d'élevage et elle est préconisée (ainsi que la soude) dans la « charte technique d'élevage volailles de chair »⁵⁵ pour la décontamination des sols des bâtiments d'élevage sur

⁵⁴ Extrait de l'avis Anses 2016-SA-0196 relatif aux « procédés efficaces de désinfection des parcours en exploitations de volailles »

⁵⁵ EVA – CIPC – CIDEF – CICAR – CIP. Charte technique d'élevage Volailles de Chair. Version 5.0 du 01/02/2021

litière. Elle est cependant surtout utilisée pour le traitement des sols en terre battue (Valancony *et al.* 2000), ainsi que les parcours et les effluents d'élevage (voir plus loin).

➤ Mélanges

En conditions expérimentales, plusieurs produits biocides et procédés ont été testés, seuls ou en mélange, sur des spores ou des cultures de *C. botulinum* (communication C. Le Maréchal)⁵⁶. Les résultats obtenus montrent que, parmi les désinfectants testés :

- Les produits à base de chlore et de peroxyde d'hydrogène sont les plus efficaces.
- Les produits à base de glutaraldéhyde, ammoniums quaternaires, soude⁵⁷, vapeur d'eau inactivent les formes végétatives mais ne sont que partiellement efficaces sur les formes sporulées.

En outre, il faut souligner que les substances actives précédemment citées ne sont pas toutes actuellement approuvées dans le cadre de la réglementation Biocides avec une activité sporicide dans le domaine vétérinaire (TP3) et que, lorsque c'est le cas, les produits désinfectants intégrant ces substances actives n'ont pas systématiquement été évalués pour cette activité. Dans le cas de l'acide peracétique, par exemple, si l'activité sporicide a bien été reconnue en hygiène vétérinaire dans le cadre de l'approbation de la substance active, aucun produit à base d'acide peracétique mis sur le marché actuellement ne revendique cette activité. En ce qui concerne la chaux, ni les dossiers d'approbation des substances actives, ni les produits évalués actuellement au niveau européen ne revendiquent une activité sporicide quel que soit le domaine d'utilisation. Ces constatations suscitent des interrogations sur la disponibilité future des produits biocides TP3, revendiquant une activité sporicide dans le domaine vétérinaire.

4.1.2.2 Protocole de nettoyage-désinfection dans un foyer de botulisme

Le protocole de nettoyage et désinfection, applicable aux locaux d'élevage et aux équipements fixes et mobiles (matériel, véhicules, etc.), doit tenir compte du type d'élevage et des caractéristiques du bâtiment. Il ne s'envisage pas de la même façon dans un bâtiment clos, par exemple un poulailler (dont le sol peut être parfois en terre battue) ou ouvert, comme peut l'être une stabulation de vaches laitières.

En théorie, chaque exploitation dispose d'un protocole de nettoyage et désinfection à appliquer en routine. Ce protocole doit être renforcé et adapté aux caractéristiques de résistance des spores de *C. botulinum* dont on a vu qu'elles peuvent se maintenir sur les surfaces durant plusieurs années.

4.1.2.2.1 *Nettoyage*

Le nettoyage, qui inclut les étapes de retrait de la matière organique, détergence et décapage, est comme expliqué précédemment une étape obligatoire avant la désinfection.

Les principes d'organisation du nettoyage sont : du plus haut vers le plus bas, du plus propre vers le plus sale et on démonte tout ce qui peut être démonté.

⁵⁶ Dossier de test et de validation Des procédés de décontamination de *C. botulinum* dans le cadre des activités du LNR botulisme aviaire (Code Projet : Projet LNR botulisme aviaire 16-1, révision 01 du 18/04/2016, Code du dossier de validation : DV désinfectants Révision 00 du 19/04/2016). Laboratoire de Ploufragan-Plouzané (Unité HQPAP)

⁵⁷ À noter que la soude n'est pas notifiée au programme d'examen des substances actives du règlement 528/2012 et ne peut pas être utilisé en tant que désinfectant.

➤ Retrait de la matière organique :

L'objectif est d'éliminer, par différents procédés dont le plus courant est le nettoyage à sec, le maximum de matière organique dans et sur les matériels et bâtiments à désinfecter.

Cette étape consiste à délimiter la zone à nettoyer, à enlever les litières, les restes d'aliments ainsi que tout autre résidu organique, à démonter et brosser les équipements, vider les abreuvoirs et vidanger les canalisations. Il est nécessaire de porter une attention particulière au nettoyage du système d'aération (composantes internes et externes).

➤ Détergence et décapage :

Il s'agit d'une étape essentielle pour éliminer le reste de la matière organique et minérale accumulée et une partie non négligeable des micro-organismes présents, y compris les spores botuliques, qui se retrouvent en quantité importante dans les locaux et sur le matériel d'élevage. La qualité de la réalisation de cette opération conditionne l'efficacité des produits biocides qui, d'une façon générale, voient leur action diminuer en présence de souillures minérales et organiques. En effet, dans les milieux aqueux ou en conditions très humides, ces souillures peuvent prendre la forme de biofilms plus ou moins épais et complexes dans lesquels les micro-organismes pathogènes peuvent se trouver protégés physiquement des biocides, et/ou dans un état physiologique les rendant moins sensibles à ceux-ci. L'autre aspect du problème est que les désinfectants étant majoritairement des oxydants, ils réagissent avec la matière organique présente et sont donc consommés sans pouvoir exercer tout leur potentiel bactéricide.

Après l'application du détergent à basse pression (20 - 35 kg/cm²), il faut permettre un temps de contact adéquat variable selon le détergent, avant de rincer (décapage) à l'eau à haute pression (70 - 200 kg/cm²). Le décapage est amélioré si le flux d'eau est appliqué selon un angle de 45 degrés par rapport à la surface à nettoyer.

Pour les surfaces poreuses (bois, béton), un détergent peu moussant à basse pression est appliqué préférentiellement. A l'inverse, un détergent moussant est privilégié sur des surfaces verticales et non poreuses (paroi en plastique) pour faciliter son adhésion et augmenter le temps de contact.

Les canalisations, quand elles existent, doivent être vidées sous pression (au moins 1 kg/cm²) et nettoyées à l'aide d'un détergent alcalin, cette opération étant suivie de l'application d'un détergent acide, avant une étape de désinfection avec un désinfectant généralement à base de peroxyde d'hydrogène, en s'assurant d'un temps de contact d'environ 24 heures.

4.1.2.2.2 Désinfection et séchage

La désinfection doit s'effectuer sur les surfaces nettoyées et séchées. En effet, la présence de liquide résiduel sur les surfaces à désinfecter risquerait de diluer le désinfectant et ainsi d'altérer son efficacité.

La solution désinfectante est appliquée habituellement avec une pression moyenne (35 - 70 kg/cm²) pour assurer une bonne pénétration dans les pores et les cavités des matériaux, en utilisant les quantités requises par le fabricant.

La désinfection par aspersion/pulvérisation directe sur les surfaces est adaptée pour les locaux, et à cet égard, l'utilisation d'un désinfectant sous forme de mousse ou de gel pourrait être une bonne alternative aux formulations liquides pour réduire la quantité de rejets et visualiser le dépôt du désinfectant sur les surfaces, en particulier verticales, pour s'assurer que toutes les zones à désinfecter sont atteintes. La pulvérisation nécessite un volume d'eau

plus important que le moussage, et il faut s'assurer de pulvériser jusqu'à ruissellement sur des matériaux poreux comme le bois et le béton.

La voie aérienne n'est envisageable que si l'étanchéité des locaux peut être obtenue. Elle pourrait néanmoins être privilégiée pour les systèmes et équipements d'aération. La désinfection des équipements et du petit matériel en fonction de leur taille pourra s'effectuer par trempage ou aspersion/pulvérisation directe sur les surfaces. Le temps de contact entre les surfaces à désinfecter et le désinfectant doit être le plus long possible (supérieur à une heure) et conforme *a minima* au temps de contact indiqué par le fabricant pour atteindre le meilleur résultat possible.

La température est un facteur essentiel à l'efficacité du produit et la désinfection sera plus efficace si elle est effectuée dans des locaux chauffés, pour atteindre une température ambiante d'au moins 20°C. Il est à noter cependant que certains produits désinfectants sont efficaces à une température de 10°C, qui est la température obligatoire des normes CEN du domaine vétérinaire.

Après application du désinfectant, aucun rinçage n'est normalement effectué, sauf pour les lignes d'eau et les mangeoires et abreuvoirs, ou si une instruction spécifique de rinçage des surfaces est mentionnée par le fabricant du produit désinfectant utilisé.

A l'issue, les locaux doivent être aérés pour évacuer les résidus éventuels de désinfectant en suspension dans l'air et en conformité *a minima* avec les préconisations de l'étiquette du produit.

L'assèchement du sol et du bâtiment contribue à la réduction de la contamination microbienne et doit être associé à un vide sanitaire (absence d'animaux). La durée minimale doit correspondre au temps nécessaire pour assécher entièrement le bâtiment, soit en moyenne une quinzaine de jours. Cette période sera plus longue en saison froide et humide. Le vide sanitaire est systématiquement appliqué en élevage de volailles, mais pas toujours réalisable en élevage de bovins.

Dans le cas d'un foyer de botulisme, une double désinfection est systématiquement réalisée, ce qui n'est pas forcément le cas en routine. Des contrôles réalisés après les opérations de nettoyage-désinfection (Souillard *et al.* 2014) ont révélé la persistance de *C. botulinum* dans plusieurs élevages après simple désinfection, soulignant la nécessité de recourir à une deuxième désinfection pour renforcer le processus de décontamination. Elle peut être envisagée par désinfection par voie aérienne, par fumigation (particules de 0,5 µm) ou par brumisation (particules de 5 µm) afin d'assurer une bonne désinfection des surfaces difficiles d'atteinte (incluant les crevasses dans certains matériaux).

4.1.2.2.3 Cas particulier des sols en terre battue

Une majorité des poulaillers destinés à l'élevage des volailles de chair ont un sol en terre battue. Ces sols sont difficiles à désinfecter, plus encore s'ils sont contaminés par des spores botuliques. La désinfection, réalisée après enlèvement de la litière et balayage, se fait le plus souvent avec de chaux vive (50 kg/100 m²), éteinte avec de l'eau (de 30 à 100 L/100 m²).

Même si l'on ne peut pas vraiment désinfecter de la terre, certaines études, comme celle de Valancony *et al.* (2001), montrent, sur la base d'un dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs dans la couche superficielle du sol traité, une réduction de ces bactéries (de 1,4 10³ à 80 bactéries en moyenne pour 10 cm²). Toutefois, dans cette étude, la méthode de dénombrement utilisée ne permet pas de savoir si la réduction observée concerne les bactéries végétatives ou sporulées. Un autre essai, présenté aux journées de recherche avicole en (2003) par Léorat et Martin, qui visait à comparer l'efficacité de plusieurs produits

(chaux, soude, chloramine, phénol) pour prévenir l'entérite nécrotique du poulet (due à *C. perfringens*), a montré la supériorité de l'efficacité d'un traitement par épandage de chaux, avec un coefficient de réduction des spores de 98 %. Néanmoins, selon cet auteur, la chaux pénètre peu dans le sol et ne permet pas une décontamination en profondeur. La soude permettrait, en revanche, une désinfection plus en profondeur.

D'autres biocides sporicides pourraient être également préconisés. C'est le cas notamment de l'acide peracétique⁵⁸, dont l'activité sporicide a été validée dans le domaine vétérinaire (TP3) à la concentration de 2500 ppm (0,25 %) (Rapport d'évaluation de la substance active approuvée en TP3) et qui conserve une certaine activité en présence de matière organique et ne présente pas de risque pour l'environnement (Chhetri *et al.* 2020). Néanmoins, on ne dispose d'aucune donnée permettant d'attester de son efficacité dans ce contexte.

4.1.2.2.4 Autres opérations applicables aux locaux d'élevage et sur les abords

La désinfection des canalisations d'eau se fait avec des solutions concentrées en hypochlorite de sodium. Il existe un guide de l'association scientifique et technique pour l'eau et l'environnement (Astee)⁵⁹ très clair et pratique qui peut servir de support.

Le nettoyage-désinfection des locaux et du matériel n'est qu'un aspect de la décontamination en élevage. Les investigations de Souillard *et al.* (2014) dans des foyers de botulisme aviaire ont montré la présence de *C. botulinum* de type mosaïque C/D dans des cadavres de rongeurs et sa persistance dans des ténébrions. Dans un foyer de botulisme, il est donc nécessaire de renforcer les opérations de désinsectisation et de dératisation pour réduire au maximum le risque de maintien de l'infection sur le site. Lors d'infestation par des ténébrions des sites de production avicole, il est judicieux de désinsectiser de nouveau avant l'arrivée d'une nouvelle bande.

De même, les abords doivent faire l'objet d'une attention particulière compte tenu de la résistance des spores de *C. botulinum* dans l'environnement. Les abords des bâtiments d'élevage peuvent être très disparates en fonction du type d'élevage et des espèces élevées, de la conception des bâtiments, des circuits des animaux, des productions, des approvisionnements et des effluents, et des accès. Par ailleurs, ils comportent des zones propres et des zones sales. Les possibilités de traitement dépendent de la nature des surfaces, qui sont bétonnées, en terre battue, herbeuses, etc. et de leur degré de contamination (présence de déjections, litière souillée, fumier, écoulements divers, surfaces boueuses, etc.). Ces surfaces doivent d'abord être nettoyées et débarrassées des matières organiques et poussières, notamment devant les accès (entrées, sorties). Les surfaces bétonnées peuvent être désinfectées avec un biocide sporicide en même temps et selon le même protocole que celui appliqué au bâtiment d'élevage. Pour les abords en terre battue, on préférera la chaux vive. La soude caustique non incluse dans le programme d'examen biocide ne peut être recommandée en tant que désinfectant. Les zones enherbées peuvent être traitées comme les parcours de volailles (voir section 4.3).

L'ensemble du matériel présent doit être systématiquement et méticuleusement nettoyé et désinfecté, notamment les tracteurs, remorques et godets qui ont servi à l'enlèvement du fumier.

⁵⁸ Malgré l'absence de donnée bibliographique dans ce contexte d'utilisation, l'acide peracétique a été préconisé pour la désinfection des parcours de volailles infectée par un virus influenza hautement pathogène à la concentration de 1 % à raison de 0,4 litres par m². (Avis de l'Anses Saisine n° 2016-SA-0196).

⁵⁹ Astee, 1998. Réservoirs et canalisations d'eau destinée à la consommation humaine : inspection, nettoyage et désinfection. Guide réalisé à l'initiative du ministère chargé de la santé.

4.1.2.3 Contrôle d'efficacité des opérations de nettoyage et désinfection

Afin de prévenir les risques de récurrence, et donc la persistance de *C. botulinum* dans les élevages, il est nécessaire de s'assurer de la qualité des opérations de nettoyage et de désinfection. Des phases de vérification des étapes de nettoyage et de désinfection doivent être menées, sur la base de procédures de contrôle préétablies et adaptées aux spores de *C. botulinum* et aux surfaces à traiter.

Pour cela, il est recommandé, après désinfection, de réaliser des prélèvements pour rechercher la présence éventuelle de *C. botulinum*. Les prélèvements sont à effectuer dans différentes zones de l'élevage et sur différentes matrices, tel que proposé dans l'étude de Souillard *et al.* (2014), en ciblant, en élevage avicole par exemple, certains sites particulièrement difficiles d'accès, fréquemment oubliés ou pouvant faire l'objet d'une recontamination secondaire comme les circuits de ventilation, les abords, les canalisations d'eau, les réservoirs animaux (petits ténébrions), les circuits à œufs et les bacs d'équarrissage.

Les prélèvements peuvent être réalisés en privilégiant des chiffonnettes imbibées de neutralisant pour contrer les effets d'éventuels résidus de désinfectant encore présents sur les surfaces. Il peut s'agir d'un neutralisant spécifique du principe actif du désinfectant ou un neutralisant polyvalent comme celui recommandé dans la norme ISO 18593⁶⁰. Un stockage des chiffonnettes au congélateur (température inférieure à -18°C) est conseillé jusqu'à mise en analyse au laboratoire pour la détection de *C. botulinum*.

L'importance de ces contrôles après les opérations de nettoyage et désinfection peut être illustrée par une étude de cas suite à un épisode de botulisme dans un élevage bovin (Le Maréchal *et al.* 2019b). Le chantier a démarré par le démontage de l'ensemble des éléments qui pouvaient l'être, puis par une phase de nettoyage. Celle-ci a été réalisée à l'aide d'un produit détergent moussant qui a été appliqué avec un appareil à haute-pression. Cette phase de nettoyage a été suivie d'une désinfection avec un produit à base de formaldéhyde, appliqué au pistolet à mousse. Après ces opérations initiales, les prélèvements effectués à l'aide de chiffonnettes ont fourni des résultats positifs au niveau de certains équipements et une seconde phase de désinfection utilisant un détergent et un désinfectant (à base de formaldéhyde couplé à un traitement thermique par un chalumeau pour les outils métalliques) a été mise en œuvre, avec notamment cette fois-ci le trempage des équipements une fois démontés. *C. botulinum* n'a pas été détecté au niveau des échantillons collectés après cette deuxième seconde nettoyage/désinfection. Cette observation illustre l'importance de faire un nettoyage et une désinfection complets, ainsi que l'intérêt de la double désinfection.

La décontamination des locaux d'élevage, de leurs équipements et du matériel (notamment lorsqu'il a été utilisé pour le transport et la manutention d'effluents contaminés) implique le respect de procédures adaptées aux caractéristiques de l'agent pathogène, notamment la résistance des spores botuliques dont il a été montré la capacité à persister dans de multiples sites (notamment dans les plus difficilement accessibles, comme les circuits de ventilation en élevage avicole).

Les procédures générales de décontamination ne diffèrent pas de celles habituellement mises en œuvre dans la gestion des foyers infectieux en élevage, y compris dans le soin à apporter à la réalisation des phases préalables de nettoyage, détergence et décapage. En revanche

⁶⁰ ISO 18593:2018 - Microbiologie de la chaîne alimentaire — Méthodes horizontales pour les prélèvements de surface.

trois conditions doivent être respectées lors de la phase de désinfection proprement dite pour tenir compte de la persistance des spores :

- le choix d'un désinfectant dont l'activité sporicide doit avoir été validée dans le contexte d'une utilisation en élevage ;
- la réalisation de deux opérations de désinfection successives après nettoyage/décapage ;
- des contrôles d'efficacité montrant la disparition de la bactérie dans les locaux et sur le matériel.

Plusieurs biocides (aldéhydes, dérivés halogénés, produits oxydants et bases) sont reconnus comme ayant une activité sporicide. On constate cependant que les substances actives citées n'ont pas toutes été validées selon les normes en vigueur pour cette activité (exemple de la chaux, utilisée notamment pour la décontamination des sols des poulaillers en terre battue) et que peu de produits disposant d'une AMM pérenne dans le domaine vétérinaire (TP3) la revendiquent, ce qui laisse planer des incertitudes sur la disponibilité des produits sporicides utilisables pour la désinfection dans les élevages atteints de botulisme.

4.2 Traitement des produits organiques, notamment les effluents d'élevages (litières, fumiers, lisiers eaux résiduaires) et aliments contaminés

Les produits organiques qu'il faut décontaminer sont les effluents d'élevage, c'est-à-dire les excréments et/ou urines d'animaux d'élevage, avec ou sans litière, et les eaux résiduaires, ainsi que les aliments.

Leur traitement dans le cadre d'un épisode de botulisme doit être effectué si possible sur place, dans l'élevage, afin de limiter les risques de diffusion de l'agent pathogène durant leur transport vers des sites dédiés.

4.2.1 Description des procédés

La décontamination des effluents riches en matières organiques peut faire appel à différents procédés physiques, chimiques et/ou biologiques. Néanmoins, tous ne sont pas applicables au traitement des effluents d'élevage. Nous nous focaliserons ici sur les procédés les plus couramment applicables sur site aux élevages bovins et aviaires, en particulier pour la décontamination des fumiers et lisiers.

Le traitement des eaux résiduaires (y compris celles qui relèvent du lavage mis en œuvre lors des opérations de nettoyage-désinfection), qu'elles soient recueillies dans une fosse de stockage spécifique ou mélangées avec les autres effluents d'élevage, relève des mêmes procédés que les autres effluents liquides, notamment les lisiers.

Le traitement des aliments, tels que fourrages, ensilages, grains, farines et granulés peut être rendu nécessaire lorsqu'ils sont reconnus comme la cause du développement de l'épisode de botulisme dans l'élevage ou contaminés secondairement durant cet épisode. Leur volume parfois important peut rendre difficile leur traitement, notamment si celui-ci ne peut être fait sur place. En tant que biomasse végétale, les foin et ensilages peuvent être traités par les procédés de compostage et de méthanisation en mélange avec d'autres substrats comme des effluents (lisiers, fumiers, paille, etc.). D'autres procédés sont utilisables, comme l'incorporation au fumier et traitement par la chaux. L'incinération peut être aussi une solution envisageable, par exemple pour des grains contaminés.

4.2.1.1 Procédés physiques

4.2.1.1.1 *Procédés mécaniques*

Les procédés mécaniques tels que la filtration et la centrifugation sont plutôt adaptés au traitement des denrées alimentaires d'origine animale telles que le lait mais s'appliquent difficilement aux effluents liquides dans les élevages. La charge organique de ces effluents rend difficile leur épuration par filtration du fait des risques de colmatage des filtres. La séparation de phases mécanique (utilisation d'un décanteur centrifuge), applicable aux lisiers, n'a pas d'effet hygiénisant, tant sur la fraction liquide que sur la fraction solide, mais il est possible de traiter ensuite séparément chaque fraction.

4.2.1.1.2 *Procédés par rayonnement*

Les procédés par rayonnements ionisants (irradiation par faisceaux d'électrons ou par rayons gamma), envisageables pour le traitement des eaux usées ne sont pas applicables à la problématique du traitement des effluents en élevage.

4.2.1.1.3 *Procédés thermiques*

Trois procédés sont présentés : l'incinération, la stérilisation sous pression et la pasteurisation.

➤ Incinération

L'incinération, qui s'adresse aux effluents solides et aux aliments contaminés, est totalement stérilisante mais difficilement applicable à l'échelle des exploitations. On peut citer, à ce propos, l'exemple rapporté par Boutant et Mellal (2020) d'un stock de grains de blé contaminés ayant pu être brûlé dans la chaudière d'un élevage de dindes infectées. Ce procédé implique habituellement le transport des matières à traiter vers un incinérateur.

➤ Stérilisation

La stérilisation sous pression de vapeur d'eau saturante telle que décrite dans le règlement n° 142/2011/CE (chauffage à une température à cœur supérieure à 133 °C pendant au moins 20 minutes, sans interruption et à une pression d'au moins 3 bars) permet de détruire les micro-organismes sporulés, mais implique le transport des effluents contaminés vers une usine de transformation agréée.

➤ Pasteurisation

La pasteurisation selon le couple temps / température fixé à 70°C pendant 60 minutes (règlement n°142/2011/CE) est notamment préconisée en amont du procédé de digestion anaérobie (méthanisation) pour le traitement des intrants présentant un risque sanitaire.

Les formes végétatives de *C. botulinum* soumises au couple temps / température indiqué sont inactivées. Ci-dessous les quelques données disponibles sur la sensibilité des spores de *C. botulinum* du groupe III et leur toxine.

○ Effets sur les formes sporulées

La résistance à la chaleur en milieu humide des spores de *C. botulinum* est très bien documentée, et ce depuis le début du XX^{ème} siècle pour les spores des souches du groupe I (*C. botulinum* protéolytique, types A, B et F). Des méta-analyses récentes donnent une vision

synthétique des paramètres D et z ⁶¹. Ainsi, $D_{121^{\circ}\text{C}}$ est estimé, à partir de 394 données, à 0,19 min pour les spores des *C. botulinum* protéolytiques, avec une valeur de z de 11,3°C (Diao *et al.* 2014). Pour les spores de *C. botulinum* non protéolytiques ($n = 549$), les estimations de $D_{80^{\circ}\text{C}}$ pour les types non protéolytiques B, E et F sont comprises entre 1 min et 1,5 min avec des valeurs de z comprises entre 6,5°C et 6,9°C (Wachnicka *et al.* 2016).

Les valeurs disponibles pour les spores des souches du groupe III ont été publiées par Segner et Schmidt (1971) : les estimations de $D_{101^{\circ}\text{C}}$ pour les souches de type C testées sont comprises entre 0,07 et 2,44 min avec des valeurs de z comprises entre 5,0 et 6, 2°C. Ces paramètres de résistance suggèrent une résistance supérieure à celle des spores des *C. botulinum* non protéolytiques (Groupe II), mais également inférieure à celle des spores des *C. botulinum* protéolytiques (Groupe I). Ceci a été confirmé par Portinha *et al.* en 2022. Dans cette dernière étude portant sur la résistance de spores purifiées de type C, les valeurs de $D_{90^{\circ}\text{C}}$ (2 souches étudiées) étaient de 11,5 et 11,9 min (Portinha *et al.* 2022).

Des estimations des temps de réduction décimale (D) en milieu aqueux de *C. botulinum* du groupe III à des températures comprises entre 70°C et 120°C ont été effectuées à partir de données publiées par Segner et Schmidt (1971) (cf. Annexe 2). Ces estimations de $D_{70^{\circ}\text{C}}$ (> 12 h pour les groupes I, II et III) suggèrent qu'un traitement d'une heure à 70°C (pasteurisation au sens du règlement n°142/2011/CE) n'aura quasiment aucun effet sur les spores des groupes I, II et III.

○ Effets sur les toxines botuliques

Les données relatives à l'inactivation des toxines botuliques apparaissent très diverses dans la littérature scientifique selon les conditions expérimentales, le pH et la composition du milieu utilisé. De plus, l'inactivation ne suit pas un modèle linéaire, ce qui ne permet pas les inter-comparaisons (Popoff 2017). Pour Siegel (1993) la valeur $D_{76,7^{\circ}\text{C}}$ pour la concentration des toxines botuliques A et B (chaleur humide) varie de 1 à 8 min selon le pH et la composition du substrat. Roberts et Gibson (1979) soulignent dans leur revue que la résistance thermique des toxines botuliques C et D est supérieure à celle des toxines A, B et E. Si pour ces dernières un traitement de 2 min à 70°C suffit pour les inactiver, il faut atteindre 90°C pour obtenir le même résultat en 2 min sur les toxines C et D.

Une synthèse des données disponibles sur la stabilité des toxines C et D en fonction de la température est fournie dans l'Annexe 3.

4.2.1.2 Procédés chimiques (traitement à la chaux vive)

Plusieurs procédés de traitement acidifiants (addition d'acide lactique) ou, surtout, alcalinisants (traitement à l'urée, addition de soude ou de chaux) ont été proposés pour réduire le nombre de micro-organismes pathogènes dans les effluents d'origine fécale (Odey *et al.* 2018; Anderson *et al.* 2015). L'acide peracétique, étudié comme alternative aux désinfectants chlorés dans le traitement des eaux usées (Stampi *et al.* 2002), a été aussi préconisé pour l'hygiénisation des boues d'épuration (Luukkonen *et al.* 2020). Mais on ne dispose pas de données d'efficacité sur les bactéries sporulées dans de telles matrices.

Les procédés chimiques applicables à la décontamination des effluents d'élevage (litières, fumiers, lisiers...) font essentiellement appel à la chaux vive, dont le mode d'action, a été déjà présenté dans le chapitre consacré aux désinfectants : il relève à la fois de l'augmentation du pH du milieu traité (possibilité d'atteindre un niveau de pH supérieur à 12) et de la réaction

⁶¹ D_{ref} est le temps de réduction décimale à la température T_{ref} et z l'élévation de température en °C réduisant D_T d'un facteur 10.

exothermique (élévation de température jusqu'à 45 à 100°C) résultant de la formation d'hydroxyde de calcium (chaux éteinte) lorsque la chaux vive entre en contact avec de l'eau.

Cet effet synergique pH/température est particulièrement important dans le cas du traitement des fumiers et litières usagées issus d'un foyer de botulisme, car la montée en température va permettre une combustion des matières et par conséquent une réduction de leur volume. Il peut d'ailleurs être nécessaire d'arroser la matière à traiter si elle est trop sèche, pour entraîner une montée en température suffisante et initier la combustion. En pratique, c'est cette méthode qui est la plus utilisée sur le terrain (Balloy *et al.* 2009). Le fumier du bâtiment, après avoir été mouillé (lavage de la coque du bâtiment sur la litière) est repris dans une benne et disposé sur une surface décaissée d'environ 50 cm - 1 m afin d'éviter des écoulements polluants, dans une zone éloignée des bâtiments d'élevage, des pâtures destinées aux bovins et de tout voisinage. Quand la totalité du fumier a été déposée et mélangée par strates (technique du mille-feuilles) à de la chaux vive (taux d'incorporation de 5 à 7 %), la combustion (qui résulte de l'élévation thermique) démarre généralement très vite. Dans le cas contraire, un arrosage supplémentaire doit être effectué. Cette combustion va durer plusieurs semaines et conduire le plus souvent à une incinération complète du fumier déposé. Les engins agricoles qui ont servi aux manipulations du fumier doivent être soigneusement nettoyés et désinfectés. Cette méthode reste délicate à mettre en œuvre et nécessite d'être particulièrement vigilant par rapport au risque d'incendie et à la protection des personnes.

Le traitement par application directe de chaux sur le substrat est aussi préconisé pour traiter les lisiers. Le chaulage du lisier de canards permet un assainissement rapide par alcalinisation. Il est préconisé d'employer de la chaux liquide (chaux vive diluée dans l'eau, à hauteur de 600 grammes par litre) à une dose allant de 30 à 50 litres par m³ de lisier (Le Bouquin *et al.* 2017; Pertusa *et al.* 2017). Après brassage, l'objectif est d'atteindre un pH minimum de 12 pendant 7 jours (celui-ci sera alors vérifié quotidiennement par l'éleveur), ou une température supérieure à 70°C pendant 30 minutes mais cet objectif est difficile à atteindre sur du lisier. Concrètement, le chaulage des lisiers n'est pas une pratique qui tend à se généraliser sur le terrain. Il ne convient pas aux fosses avec géomembranes qui ne supportent pas un tel pH. Il est adapté aux fosses en béton avec un niveau de remplissage compatible avec un brassage sans risque de débordement. Toutefois, la validation du couple temps/pH reste à confirmer expérimentalement. La manipulation de la chaux vive est délicate et peut produire des résidus difficiles à éliminer en fond de fosse. Pour des raisons de sécurité, cette opération doit être réalisée par une entreprise spécialisée. L'obtention d'un pH homogène est conditionnée à un brassage correct et sa mise en œuvre pratique est contraignante car il est nécessaire de suivre l'évolution du pH.

4.2.1.3 Procédés biologiques

Les effluents d'élevage peuvent être transformés à des fins de valorisation de la matière organique par des procédés biologiques tels que, selon leur origine et leur taux de matière sèche, la digestion anaérobie, le compostage et la méthanisation. Compatibles avec les volumes importants à traiter, ces procédés sont applicables sur site et offrent la possibilité de valoriser directement le produit final en agriculture, en tant qu'engrais organique ou amendement.

Les procédés biologiques applicables aux effluents bovins et aviaires sont le compostage et la digestion anaérobie. Nous excluons ici la digestion aérobie qui est utilisée pour le traitement

des lisiers porcins⁶². Nous n'aborderons pas non plus les procédés type « fumier fermenté » utilisant éventuellement la lactofermentation par humidification du fumier avec du lactosérum (Andreev *et al.* 2017).

4.2.1.3.1 Compostage

Le compostage est un processus « contrôlé » de décomposition et de transformation en milieu aérobie (oxygéné) des matières organiques biodégradables d'origine végétale et/ou animale, permettant l'obtention d'une matière fertilisante stabilisée riche en composés humiques, le compost. Il s'adresse, en élevage avicole ou bovin, aux effluents solides c'est-à-dire au fumier, résultat du mélange des déjections animales avec leur litière (paille, sciure de bois, etc.). L'effet hygiénisant recherché résulte notamment de l'élévation de température obtenue par l'action de divers micro-organismes évoluant en milieu aérobie engendré par aération ou ventilation forcée. Cette élévation thermique est obtenue pendant la première phase du processus de compostage dite « phase active du compostage » ou « phase de décomposition ». Elle implique l'action de micro-organismes mésophiles (température de croissance optimale comprise entre 20 et 45°C) entraînant une élévation de température autour de 30-40°C, rapidement suivie de celle de micro-organismes thermophiles (température de croissance optimale comprise entre 50 et 70°C) permettant une élévation de température au-dessus de 55°C, jusqu'à 71-72°C (voire 80°C) au cœur du compost. Les phases de refroidissement et de maturation (cette dernière s'accompagnant de la conversion de la matière organique en humus stable) qui succèdent à la phase active sont associées à un refroidissement progressif du produit et une stabilisation de la température au-dessous de 40°C. La qualité du compost, étroitement associée à l'activité microbienne dans les dernières phases du processus, en particulier durant la phase de maturation, pourrait dépendre de la composition des communautés bactériennes impliquées, conduisant à préconiser parfois l'inoculation de la litière par certaines bactéries telles que des *Actinobacteria* (Baccella *et al.* 2002; Steger *et al.* 2007).

Le compostage, tel que classiquement réalisé pour la valorisation du fumier dans les exploitations d'élevage, correspond le plus souvent au compostage au champ après mise en andains⁶³, l'aération étant effectuée par retournements successifs ou aération forcée. Il est généralement admis qu'une réduction substantielle des bactéries indicatrices de l'ordre de 4 à 5 log₁₀ implique le maintien de la température au-dessus de 50°C pendant 6 semaines ou de 55°C pendant 2 semaines. Ces modalités, prises en compte dans la réglementation ICPE, permettent de garantir une action hygiénisante satisfaisante vis-à-vis de certains agents pathogènes (agents pathogènes fécaux tels que salmonelles, entérovirus, helminthes) éventuellement présents dans les déjections des animaux d'élevage. Les modalités de compostage sont renforcées par le règlement n°142/2011/CE qui impose, dans les usines de compostage et pour une mise sur le marché des composts produits, l'application de paramètres normalisés caractérisés par le respect d'une température minimale de 70°C de toutes les matières avec durée minimale de 60 minutes⁶⁴. Ces exigences impliquent que le

⁶² La digestion aérobie (procédé de nitrification/ dénitrification) ne s'applique qu'aux effluents liquides. Elle permet de limiter la quantité d'azote organique épandue sur les sols, notamment en zones d'excédent structurel.

⁶³ Les andains sont de forme géométrique, de manière à permettre à l'air de circuler dans le compost. Ils ont normalement 2-4 m de large et 2-3 m de haut au début du processus. La taille des andains est fonction des dimensions du matériel servant au retournement du compost.

<http://www.omafra.gov.on.ca/french/engineer/facts/05-024.htm#method1>

⁶⁴ Cela correspond, pour un lot donné, comme précisé dans l'Instruction technique DGAL/SDSPA/2020-41 du 21/01/2020, à un maintien de la température à 70°C durant 5 jours si la mesure est faite en point fixe pour être représentative.

compostage soit effectué dans des établissements disposant d'un équipement spécifique de suivi en continu et d'enregistrement des températures.

Plusieurs paramètres sont à prendre en considération pour évaluer les effets du compostage sur *C. botulinum*, dont notamment les conditions d'aérobiose, le couple température / temps et les compétitions bactériennes en fonction des populations microbiennes sélectionnées durant les différentes étapes du processus de compostage. L'aérobiose et la compétition avec les bactéries aérobies sélectionnées ne sont pas favorables à la survie des formes végétatives et à la germination des spores présentes. Toutefois, l'existence de zones anoxiques situées dans les agrégats de matière organique (Wang *et al.* 2015) de même qu'un défaut d'aération et le tassement des andains, à l'origine de zones anaérobies, peuvent être favorables à *C. botulinum*. Les températures atteintes durant la phase critique de compostage, en particulier si la température atteint 70°C pendant au moins 1 heure, sont compatibles avec l'élimination de la toxine préformée et des formes végétatives de *C. botulinum* ; elles ne permettent pas, en revanche, d'espérer obtenir un abattement significatif du nombre de spores éventuellement présentes, ce qui semble validé par quelques études et observations de terrain (voir sections 4.2.2.2 et 4.2.2.3.2).

Par ailleurs, il ne faut pas sous-estimer, selon les conditions de stockage du compost produit, le risque de re-croissance des *C. botulinum* présentes : l'aération doit être suffisante pour éviter la constitution de zones d'anaérobiose, notamment si le compost est humide. Une recontamination bactérienne est aussi envisageable dans un environnement contaminé.

4.2.1.3.2 Digestion anaérobie (méthanisation)

La méthanisation est une technologie de production de biogaz fondée sur la dégradation par des micro-organismes de la matière organique, en conditions contrôlées et en l'absence d'oxygène (donc en milieu anaérobie), dans des bioréacteurs thermorégulés. Elle peut utiliser différents substrats organiques, dont des effluents d'élevages (liquides ou solides) et sous-produits agro-alimentaires, souvent mélangés à des déchets végétaux. La digestion anaérobie (ou co-digestion lorsque plusieurs types d'intrants sont mélangés) est un processus biologique complexe (étapes successives d'hydrolyse, d'acidogenèse, d'acétogenèse et de méthanogenèse impliquant des groupes microbiens spécifiques) de dégradation de la matière organique, conduisant à la production de biogaz (constitué de gaz carbonique et de méthane) convertible en énergie et d'un résidu appelé « digestat », valorisable en tant qu'engrais organique ou amendement (Béline *et al.* 2010). Le procédé est de type discontinu en voie sèche ou de type continu en voie liquide avec une agitation mécanique. La digestion se réalise à une température comprise entre 34 et 42°C (procédé mésophile, par convention) ou entre 50° et 65° C (procédé thermophile, par convention). Il existe également des procédés psychrophiles fonctionnant à des températures comprises entre de 11 à 25°C (Lv *et al.* 2019). Les principaux facteurs influençant la survie des agents pathogènes sont la température, le temps de séjour dans le méthaniseur, les interactions microbiennes (compétition, antagonismes bactériens), la composition des intrants, la concentration en ammoniac, les teneurs en acides gras volatiles et le pH (Zhao et Liu 2019; Jiang *et al.* 2020). Il est à noter qu'en France, la méthanisation des effluents d'élevage s'opère principalement en conditions mésophiles (le plus souvent entre 37 et 42°C).

Comme indiqué, la digestion anaérobie est donc le résultat d'un processus biologique complexe dont différents paramètres peuvent intervenir sur *C. botulinum*.

En premier lieu, il faut rappeler que les températures, de l'ordre de 37-40°C en condition mésophile et de 51- 55°C en condition thermophile, n'ont aucun impact direct sur la survie des

spores et sur l'inactivation de la toxine botulique. En outre, les températures utilisées dans les procédés mésophiles correspondent aux températures optimales de croissance des cellules végétatives, qui sont par exemple pour le type mosaïque C/D de 37 à 40°C. Dans des digestats de boues d'épuration incubés en anaérobiose à 55°C pendant 25 jours, il a été observé une réduction de 5 Log₁₀ des concentrations en spores de cinq souches de *Clostridioides difficile*. Pour expliquer cette réduction, non observée en condition mésophile (36°C), il a été suggéré un impact indirect associé à un choc thermique conduisant à une stimulation de la germination suivie par l'inactivation des cellules végétatives (Xu *et al.* 2016).

D'autres paramètres peuvent intervenir, notamment la compétition pour les nutriments et les antagonismes entre les différents groupes de bactéries anaérobies qui se succèdent pour aboutir à la production de biogaz à partir de la matière organique. Les *Firmicutes* qui regroupent les *Clostridiales*, dont les bactéries du genre *Clostridium*, appartiennent aux *phyla* dominants des digestats (Fontana *et al.* 2020). Il est possible, dans cet environnement favorable au développement des *Clostridium*, que les compétitions inter- et intra-spécifiques, voire des effets inhibiteurs, entravent la croissance de *C. botulinum* et la production de toxines. A cet égard, Il a été rapporté un effet antagoniste de *C. perfringens* (Smith 1975), ce dernier étant l'espèce la plus abondante au sein des clostridies cultivables des digestats (Fontana *et al.* 2020). En revanche, les compétitions bactériennes n'ont pas d'effet sur la persistance des spores.

Les effets éventuels sur *C. botulinum* d'autres facteurs tels que la concentration en NH₃, les teneurs en acides gras volatils et le temps de séjour ne sont pas, en revanche, documentés. Selon Derongs *et al.* (2021), les teneurs en acides gras volatils (<10 - 416 mg.L⁻¹) et en NH₃ libre (de 164-375 N-NH₃ mg.kg⁻¹) dans le digestat de réacteurs de laboratoire mésophiles alimentés par du lisier de porc sont trop faibles pour conduire à une inhibition de *C. difficile* et *C. perfringens*.

La réponse à ces interrogations passe par des études permettant de comparer la charge bactérienne dans les matières entrantes issues d'élevages et dans le digestat. Cependant, de telles investigations, en nombre limité jusqu'ici et ne portant pas sur des effluents issus de foyers de botulisme, n'ont pas permis de disposer de résultats interprétables du fait des faibles charges en *C. botulinum* dans les matrices analysées (voir section 4.2.2.3).

4.2.2 Efficacité des procédés applicables aux effluents et aux aliments contaminés

Les données les plus nombreuses relatives à la contamination des effluents d'élevage portent sur les élevages aviaires dans lesquels les volailles sont cliniquement atteintes de botulisme ou porteuses asymptomatiques (infections de type mosaïque D/C en particulier), comme cela a été observé lors d'enquêtes épidémiologiques menées pour déterminer l'origine de foyers bovins. En revanche, peu de données concernent les effluents issus d'élevages bovins. La contamination des effluents résulte, d'une part, de l'excrétion fécale par les animaux malades ou porteurs asymptomatiques, d'autre part, de la présence, en élevage avicole, de cadavres de volailles qui, lorsqu'ils ne sont pas retirés par les aviculteurs, peuvent s'accumuler dans la litière et se retrouver dans les fumiers. En outre, les données relatives à la présence de formes végétatives, spores et/ou toxines de *C. botulinum* dans les effluents bruts (avant stockage ou traitement) sont en général qualitatives (présence ou absence), la charge bactérienne et la concentration de toxine n'étant, en général, pas renseignées.

Le temps de survie dans les fumiers ou lisiers lorsqu'ils sont stockés sans ajout, est variable selon les agents pathogènes. Elle peut être limitée pour certains agents pathogènes peu adaptés au milieu extérieur, et dépendre de différents facteurs tels que la compétition bactérienne, le pH, la température, la durée de stockage. Une décroissance plus ou moins rapide peut ainsi être observée, jusqu'à atteindre à terme un niveau indétectable. Ainsi, dans le fumier, ce délai a pu être défini pour certains agents pathogènes : 42 jours pour le virus de l'influenza aviaire et au moins 6 mois pour *Mycobacterium bovis*. On évoque à ce propos la notion d'« assainissement naturel ». En revanche, les caractéristiques de résistance des formes sporulées de *C. botulinum* et les résultats des études disponibles (cf. chapitre 3) ne permettent pas d'envisager un assainissement naturel résultant d'un stockage prolongé des fumiers et lisiers contaminés.

Nous nous attacherons ci-après à présenter l'impact sur *C. botulinum* de trois procédés applicables à ces effluents d'élevage : le traitement à la chaux, la conversion en compost (compostage) et la conversion en biogaz (méthanisation).

4.2.2.1 Efficacité du traitement des effluents par la chaux

Le traitement par la chaux, couramment préconisé pour le traitement des effluents solides, peut être aussi utilisé pour les effluents liquides, tels que les lisiers et les eaux résiduaires. Aucune donnée n'est cependant disponible sur l'efficacité d'un tel traitement vis-à-vis des spores de *C. botulinum*.

S'agissant du fumier et des litières usagées, la méthode la plus utilisée en pratique sur le terrain dans le cadre de la gestion du botulisme consiste en une incinération du fumier et de la litière usagée par mélange avec de la chaux vive selon la méthode du mille-feuilles (Balloy *et al.* 2009) précédemment décrite.

L'étude de Souillard *et al.* (2020) conduite dans 10 exploitations de volailles atteintes de botulisme aviaire entre 2015 et 2017 (6 élevages de dindes, 3 élevages de poulets de chair et un élevage de poules pondeuses) décrit les pratiques des éleveurs et évalue la contamination de fumier stocké suite à un épisode de botulisme et son évolution dans le temps. Elle montre que la manipulation et la gestion du fumier varient grandement d'un élevage à l'autre : incorporation ou non de chaux, bâchage ou non du tas, ajout de chaux à l'intérieur du bâtiment avant sa mise en tas ou non, etc. Seuls cinq éleveurs sur dix ont eu recours à l'ajout de chaux dans leur fumier. Le suivi dans le temps a permis de mettre en évidence une combustion inégale des tas. Cela a été observé dans des élevages contaminés dans deux fumiers traités à la chaux vive qui ne s'étaient pas consommés et trois autres pour lesquels des résidus de fumier non brûlés ont persisté (Souillard *et al.* 2020).

Quelle que soit la modalité de gestion du fumier (simple stockage ou ajout de chaux), le nombre de prélèvements positifs (par PCR en temps réel après enrichissement) était plus important au bout de 1 à 2 mois de stockage dans le fumier ou dans les résidus en cas de combustion à la chaux, que lors des prélèvements initiaux. L'ajout de chaux vive n'a donc pas entraîné la disparition de *C. botulinum* dans le fumier non consommé, ou dans ses résidus non brûlés en cas de combustion partielle. L'avantage de l'utilisation de la chaux vive réside dans la combustion ultérieure du fumier et dans une réduction du volume, mais le fumier non brûlé reste contaminé.

Ces résultats montrent l'importance de la combustion totale du fumier suite à un épisode de botulisme aviaire. Bien que cette méthode soit délicate à mettre en œuvre (elle doit se faire dans le respect des conditions de sécurité des personnes (risque incendie, voisinage)), elle demeure à l'heure actuelle la méthode la plus facile à mettre en œuvre sur le terrain.

4.2.2.2 Impact du compostage sur *Clostridium botulinum*

Compte tenu de la rareté des études disponibles relatives à la recherche de *C. botulinum* dans du compost, le traitement de la question posée s'appuie principalement sur les données portant sur *C. perfringens* ; l'incertitude des résultats quant à leur transposition à *C. botulinum* doit alors retenir l'attention.

Les neurotoxines botuliques étant dénaturées par la chaleur cf. Annexe 3), il est probable qu'elles soient progressivement inactivées pendant la phase critique du compostage, même si les températures habituellement requises, par exemple pour leur destruction dans les aliments (80°C, 30 min), ne sont pas atteintes. Dans une étude portant sur des échantillons de bio-compost de déchets verts (procédé de compostage en andains classique, donc sans référence à un maintien de la température à 70°C durant 1h) et bien que des spores botuliques aient pu y être caractérisées (54 % des échantillons positifs), Böhnelt et Lube (2000) n'ont pu y détecter la présence de toxines libres (test sur souris). Ces auteurs signalent néanmoins avoir détecté la présence de toxine dans une étude antérieure, tout en soulignant la possibilité d'une production ultérieure *in situ* à partir de spores de *C. botulinum* présentes dans certaines zones du compost offrant des conditions favorables pour la germination (zones anaérobies ou de faible tension en oxygène et contenant des quantités suffisantes de matière organique).

Les formes végétatives de *C. botulinum* sont au moins aussi fragiles que celles des autres bactéries, d'autant qu'elles rencontrent rapidement pendant la phase critique du compostage des conditions défavorables à leur survie, liées notamment à l'aérobiose, la compétition bactérienne et la montée en température. À cet égard, il faut souligner l'importance de l'homogénéité du produit et la qualité de l'aération permettant d'obtenir la montée en température souhaitée dans toutes les parties du compost.

Le règlement n°1069/2009/CE impose, pendant la conversion en compost, le maintien d'une température minimale de 70°C de toutes les matières pendant 60 min. Pris isolément, l'effet température (70°C, 1h) est insuffisant pour permettre une inactivation des spores. Il a été rapporté, en prenant l'exemple de *C. perfringens*, et, d'un point de vue général, des bactéries anaérobies sulfito-réductrices, un abattement de 2 à 3 log₁₀ après compostage (Aubert 2007; Rainisalo *et al.* 2011; Houot *et al.* 2014), suggérant une action directe ou indirecte de l'effet conjugué des différents processus intervenant à la faveur du compostage aérobie. Toutefois, une telle réduction n'est pas systématique. McLaughlin *et al.* (2015) ont ainsi observé une croissance de *C. perfringens* de l'ordre de 1 log₁₀ au cours du compostage de cadavres de porcelets, qu'ils ont attribuée à la présence de zones anaérobies et à une température peu élevée. En revanche, Baccella *et al.* (2002) indiquent avoir observé une réduction rapide et l'élimination des clostridies pathogènes (*C. perfringens*) après compostage de litière de brebis additionnée d'*Actinobacteria*.

Dans une étude menée aux États-Unis, Dharmasena *et al.* (2018) ont mis en évidence la présence de *C. difficile* dans 36,9 % des 65 échantillons de composts dont les matières premières étaient constituées d'effluents d'élevage. Selon les informations obtenues auprès des fabricants de composts, la plupart des procédés impliquaient un maintien de la température à 55°C pendant 3 jours.

Aucune publication ne fait cependant référence à la recherche et/ou à des dénombrements des spores botuliques au cours du processus de compostage, ce qui ne permet pas de vérifier la possibilité d'une éventuelle réduction de charge en spores pour *C. botulinum*.

En conséquence, aucune donnée actuellement disponible ne permet d'affirmer, en particulier lors du compostage en tas ou en andains habituellement pratiqué à la ferme, que ce procédé

permet d'éliminer les spores botuliques présentes dans les litières et fumiers issus d'un élevage infecté.

4.2.2.3 Impact de la digestion anaérobie sur *C. botulinum* et apport d'un prétraitement par pasteurisation

Rappelons que les installations de méthanisation utilisant les effluents d'élevage comme matière entrante sont essentiellement, en France, de type mésophile.

Le bilan que l'on peut faire à l'issue du processus de méthanisation repose sur les quelques données disponibles comparant les populations bactériennes dans les matières entrantes et les digestats.

Nous présenterons successivement les données relatives à l'impact du processus de méthanisation sur *C. botulinum* et l'apport d'un prétraitement des effluents par la pasteurisation.

4.2.2.3.1 *Impact du processus de méthanisation sur C. botulinum*

L'impact de la méthanisation sur *C. botulinum* est très peu documenté mais quelques données existent sur *C. perfringens*, espèce à la fois pathogène et indicatrice d'efficacité de traitement. Toutes les études soulignent le faible impact de la digestion anaérobie sur cette bactérie. Ainsi Fontana *et al.* (2020) rapportent une réduction de moins de 1 log₁₀ des concentrations en spores de *Clostridium* sp, majoritairement représentés par *C. perfringens*, dans des réacteurs mésophiles alimentés par du lisier bovin et de l'ensilage de maïs. À l'échelle du terrain, parmi les 10 méthaniseurs agricoles mésophiles étudiés par Orzi *et al.* (2015), huit conduisaient à des abattements inférieurs à 1 log₁₀. La température du procédé n'a aucun effet sur *C. perfringens*, comme l'ont montré les travaux de Bagge *et al.* (2005) menés sur quatre sites de méthanisation alimentés par des effluents d'élevage, fonctionnant en thermophilie (un site) ou en mésophilie (trois sites). De même, en élevant la température du procédé de 38°C à 54°C, Lloret *et al.* (2013) n'ont observé qu'une très légère augmentation de l'abattement des concentrations des spores de *C. perfringens* (de 0,45 log₁₀).

Concernant la toxine botulique, différents experts s'accordent pour une absence de persistance lors du processus de la méthanisation (SciCom 2017). Toutefois peu d'études portent spécifiquement sur *C. botulinum*, et nonobstant les incertitudes liées aux protocoles, les résultats souvent contradictoires peuvent s'expliquer par la diversité des conditions d'études et des méthodes de détection des spores.

Fröschle *et al.* (2015) n'ont détecté aucun *C. botulinum* dans 154 échantillons de 10 g de lisiers et de digestats prélevés sur huit sites de méthanisation agricole situés en Allemagne, fonctionnant à des températures comprises entre 39°C et 43°C (5 méthaniseurs) et entre 44°C et 52°C (3 méthaniseurs). Ces auteurs ont aussi utilisé des réacteurs d'une trentaine de litres maintenus à 38°C ou à 55°C alimentés par un mélange d'ensilage de maïs et d'herbe dans lesquels avaient été incorporés des supports inoculés avec une quantité définie de *C. botulinum* (pour une concentration finale de 10⁴ à 10⁵ NPP / mL). Ils ont observé une décroissance de *C. botulinum*, la réduction obtenue étant de 2,1 ± 0,7 log₁₀ en 63 jours à 38°C et d'au moins 3,2 log₁₀ en 10 jours à 55°C, suggérant un effet assainissant de la méthanisation. Ces conclusions divergent de celles émises par Le Maréchal *et al.* (2019a) et Pourcher *et al.* (2018) qui ont rapporté la présence de *C. botulinum* dans les digestats. Ainsi, Le Maréchal *et al.* (2019a) ont utilisé la PCR en temps réel après une phase d'enrichissement pour rechercher et dénombrer *C. botulinum* (spores et formes végétatives) dans les effluents et les digestats de cinq sites de méthanisation agricole mésophile (S1 à S5), sans historique de botulisme. La

bactérie, non détectée dans le site S1, a été retrouvée dans les effluents de trois sites et les digestats de quatre sites. Le gène codant la toxine B a été mis en évidence dans tous les échantillons à résultats positifs en *C. botulinum* alors que le gène codant les toxines A et F n'a été retrouvé que dans un digestat. Les concentrations, très faibles dans les effluents (comprises entre < 1,3 et 11 NPP/g), étaient du même ordre de grandeur dans les digestats. Cette 1^{ère} étude qui reposait sur un prélèvement ponctuel a été complétée par une 2^{ème} campagne de prélèvements (8 échantillons prélevés toutes les 6 semaines sur une année) réalisée sur 3 des 5 sites de méthanisation (sites S1, S2 et S3). *C. botulinum*, non détecté dans les 8 échantillons de lisier des sites S1 et S2 (absence dans 25 g) était présent dans les digestats à une fréquence de détection de 50 % et de 87,5 %, respectivement. La bactérie a été mise en évidence dans tous les échantillons de lisier et de digestat du site S3. La concentration, très faible, n'a pas dépassé 8,1 NPP/g. Tous les échantillons positifs en *C. botulinum* étaient positifs pour le gène codant la toxine B. Le gène codant la toxine E a été détecté une seule fois dans un digestat (Pourcher *et al.* 2018).

En conclusion, s'il y a réduction du nombre de spores de *C. botulinum* durant le processus de méthanisation, elle demeure incertaine et ce traitement ne permet pas de garantir l'absence de la bactérie dans le digestat qui en est issu.

Il faut souligner cependant l'impact possible de certains traitements post-digestion. Une étude (Pulvirenti *et al.* 2015) réalisée sur un digestat solide (obtenu après séparation des phases solides et liquides d'un digestat brut) a montré l'absence de détection de *Clostridium* spp. (la concentration initiale atteignant 10⁵ UFC / g) à la suite du traitement combiné par haute pression et des températures comprises entre 75 et 95°C effectué pour la production de granulés. Des études complémentaires sont néanmoins nécessaires pour valider un éventuel effet assainissant vis-à-vis des spores de *C. botulinum*.

4.2.2.3.2 Apport d'un prétraitement par pasteurisation

La question est aussi posée de déterminer si l'étape de « pasteurisation/hygiénisation » en amont de la conversion en biogaz (pasteurisation à 70°C pendant 60 min) imposée par le règlement n°1069/2009/CE peut réduire le risque de persistance de *C. botulinum* lors du processus de digestion anaérobie.

Le maintien d'une température de 70°C pendant une heure dans l'ensemble du substrat de façon homogène, permet d'inactiver les formes végétatives éventuellement présentes, ainsi que la toxine produite. Ce couple température/durée est, en revanche, insuffisant pour inactiver les spores de *C. sporogenes*, capables de résister à 80°C pendant au moins 200 minutes (Ramaswamy *et al.* 2010). La présence de colonies de *C. botulinum* (identifiées par séquençage du gène codant l'ARNr 16S), sur un milieu de cultureensemencé avec un lisier de porc chauffé à 96°C pendant 10 minutes, suggère que les spores sont capables de résister à cette température élevée (Cunault *et al.* 2011). Ce résultat est en accord avec la valeur de la durée de réduction décimale (D) de 26,2 minutes obtenue à 95°C sur une souche de *C. sporogenes* (Ramaswamy *et al.* 2010). Sahlström *et al.* (2008) ont dénombré *C. perfringens* (formes totales : cellules végétatives et spores), utilisé ici comme indicateur des bactéries sporulées, dans 3 échantillons de biodéchets chauffés à 70°C pendant 1h. Le traitement thermique a très peu affecté la bactérie dont les concentrations n'étaient pas significativement modifiées à l'issue du traitement (moyenne de 4,4 log₁₀ contre 4,8 log₁₀ cfu/g dans le substrat initial). Des observations équivalentes ont été faites par Bagge *et al.* (2010); Bagge *et al.* (2005) ont montré que la concentration de *C. perfringens* dans des lisiers n'était pas affectée significativement par une pasteurisation (70°C/1h) effectuée en amont de la méthanisation. Cunault *et al.* (2011) ont également observé une absence d'effet de ce couple

température/durée sur les spores de bactéries sulfite-réductrices. Bagge *et al.* (2010) ont identifié, sur la base du séquençage de l'ARN 16S après culture, la présence de *C. botulinum* / *Clostridium* spp. dans le substrat analysé avant et après pasteurisation et de *Clostridium sporogenes* / *botulinum* après pasteurisation (la méthode d'identification ne permettant pas la différenciation des espèces). Il est à noter que le nombre de *Clostridium* sp. (formes totales) a diminué après la pasteurisation de l'ordre de moins de 1 Log₁₀ à 2 Log₁₀, selon les sites de méthanisation.

Le refroidissement des effluents après le traitement thermique pourrait conduire à une augmentation de la concentration en *C. botulinum* à l'instar de ce qui a été observé par Derongs *et al.* (2021) pour *C. difficile*. Dans cette étude menée à l'échelle de pilote, le lisier porcin a été chauffé 1 heure à 70°C et stocké une quarantaine de minutes de façon à atteindre 40°C, avant d'alimenter des réacteurs mésophiles. Dans ces conditions, il a été observé une diminution des concentrations de *C. perfringens* (~ 0,7 log₁₀) et une augmentation de celles de *C. difficile* (~ 0,4 log₁₀) entre le lisier avant chauffage et l'effluent destiné à alimenter les réacteurs. Il est possible que les spores de *C. difficile* aient germé au cours de la période de refroidissement. Au regard de la différence de comportement entre *C. perfringens* et *C. difficile*, il est difficile d'estimer le devenir de *C. botulinum*. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour mieux cerner le comportement de ces différentes clostridies en aval du prétraitement thermique.

Les déchets organiques issus des élevages sont représentés par les excréments et/ou urines avec ou sans litière, les eaux résiduaires et les aliments reconnus contaminés. Trois inconvénients majeurs entravent la décontamination des effluents destinés à être valorisés en tant qu'amendements ou engrais organiques en agriculture : la résistance des spores botuliques, qui élimine toute perspective d'assainissement naturel par stockage prolongé, l'impossibilité du recours à des procédés chimiques autres que le traitement par la chaux et les volumes très importants des matières à traiter.

S'agissant des excréments et/ou urines avec ou sans litière, trois procédés utilisables sur le site de l'élevage ont été analysés : le traitement à la chaux, le compostage et la méthanisation, ces deux derniers visant non pas l'élimination des micro-organismes pathogènes, mais la valorisation de la matière organique pour le premier et la production de biogaz pour le second.

- La chaux (chaux vive) est très utilisée sur les effluents solides, notamment le fumier. Son action relève à la fois de l'augmentation du pH du milieu traité (possibilité d'atteindre un pH ≥ 12) et de la réaction exothermique (élévation de température jusqu'à 45 à 100°C) résultant de la formation d'hydroxyde de calcium lorsqu'elle entre en contact avec de l'eau. Les seules données relatives à son efficacité sur les spores botuliques portent sur le procédé dit « du mille-feuilles » débouchant sur une combustion du substrat traité. Nonobstant les risques d'incendie qu'il génère, si ce traitement contribue à réduire le volume de l'effluent contaminé, les contrôles réalisés par le LNR montrent cependant qu'il s'avère insuffisant pour éliminer les spores botuliques.

- Le compostage qui permet d'obtenir un produit organique stabilisé, possède un effet hygiénisant vis-à-vis de certains agents pathogènes, dû principalement à l'élévation thermique au-dessus de 55°C (jusqu'à 72°C, voire 80°C) lors de la phase active. Réglementairement, en application du règlement n°1069/2009/CE, l'hygiénisation implique un maintien de la température à 70°C durant au moins 1 heure au cours du compostage. Si de telles températures (du moins si elles sont atteintes de façon homogène dans l'ensemble du substrat) sont compatibles avec une inactivation des formes végétatives et de la toxine de *C.*

botulinum, elles demeurent en revanche insuffisantes pour inactiver les spores présentes. On ne dispose pas, jusqu'à présent, de données relatives à l'évolution de *C. botulinum* au cours du compostage. Néanmoins des recherches montrant la persistance d'autres bactéries sporulantes (telles que *C. difficile*) suggèrent fortement que le processus de compostage ne permettrait pas d'éliminer les spores botuliques.

- La méthanisation produit du biogaz à partir de la matière organique dégradée par des micro-organismes en milieu anaérobie dans des bioréacteurs (digesteurs) thermorégulés. Les installations peuvent traiter les effluents de plusieurs élevages (ce qui aboutit à une dilution des effluents contaminés) et fonctionnent majoritairement en France en conditions mésophiles (entre 37 et 42°C). Hors intervention possible d'autres facteurs biotiques (compétitions bactériennes) ou abiotiques (pH, concentration en NH₃) dont les effets sur la bactérie ne sont pas caractérisés, les conditions anaérobies et de températures (du moins en conditions mésophiles) des digesteurs ne semblent pas réduire la persistance de *C. botulinum* ou de ses toxines. Les quelques études disponibles comparant la présence de *C. botulinum* dans les intrants et en sortie dans les digestats n'ont apporté jusqu'ici aucune réponse relative à la présence ou l'absence d'un effet hygiénisant vis-à-vis de cette bactérie et notamment de ses spores. En outre, le prétraitement réglementaire des effluents par pasteurisation élimine toxines et formes végétatives, mais n'affecte pas la survie des spores. Les experts s'interrogent par ailleurs sur l'effet du choc thermique généré par ce prétraitement sur les spores et la possibilité de germination et de multiplication des formes végétatives lors du refroidissement précédant l'entrée de l'effluent dans le digesteur.

Les eaux résiduaires (eaux usées agricoles), collectées dans une installation de stockage spécifique ou non, peuvent être traitées selon les mêmes conditions que les autres effluents liquides (lisier, purin) avec lesquels elles peuvent être mélangées. Une décontamination à la chaux est souvent préconisée, sans que l'efficacité du procédé dans les conditions d'emploi ait été validée pour *C. botulinum*.

S'agissant des aliments (fourrages, ensilages, etc.) ils peuvent être mélangés avec les fumiers et traités comme tels ou incinérés.

4.3 Traitement des matrices environnementales

Les matrices environnementales ciblées dans ce chapitre sont celles contaminées durant l'épisode de botulisme survenu dans l'élevage :

- parcours de volailles ;
- différentes surfaces ayant fait l'objet d'un épandage avec un produit contaminé (pâtures, cultures, etc.) ;

Les procédés de décontamination envisageables ont pour la plupart été présentés dans les chapitres précédents. Nous les aborderons de nouveau en fonction des matrices étudiées.

Il faut rappeler que *C. botulinum* est une bactérie tellurique dont la croissance est favorisée dans le sol par la présence de matières organiques. On ignore, de plus, le degré de contamination naturel des sols comme le seuil à partir duquel il peut y avoir risque d'émergence du botulisme.

4.3.1 Traitement des parcours de volailles

De plus en plus d'élevages de volailles possèdent des parcours en plein air, comme c'est déjà le cas pour les élevages de galliformes sous signes officiels de qualité (dont les cahiers des

charges comportent tous un accès à un parcours en plein air), les élevages de volailles biologiques, et les élevages de canards prêts à gaver.

Dans ces parcours, le risque de contamination le plus important concerne les zones de fortes densités de volailles plus favorables à l'accumulation de fientes, en particulier la zone proximale correspondant à une bande d'environ 10 m de large sur toute la longueur du bâtiment d'élevage, au niveau des trappes de sortie des oiseaux du bâtiment et les zones correspondant aux mangeoires, abreuvoirs et abris mobiles, notamment si ces zones comportent des parties boueuses.

Les rares données disponibles sur la décontamination des parcours de volailles correspondent à des investigations relatives à l'emploi de la chaux au travers d'un suivi des streptocoques thermotolérants, utilisés comme indicateurs (Huneau-Salaün *et al.* 2010), et des prescriptions dans le cas de maladies comme l'influenza aviaire (Anses 2017). Il n'existe cependant aucune référence bibliographique sur la décontamination des parcours de volailles contaminés par des bactéries sporulées ou, plus spécifiquement, par *C. botulinum*.

Des doses de chaux vive de 500 g par m², en arrosant le sol s'il n'est pas assez humide, permettent en surface d'obtenir le pH supérieur à 12 nécessaire pour une activité sporicide. Il est probable que cette activité soit limitée aux couches superficielles du sol. Dans la pratique, il est indiqué de laisser agir pendant 3 à 4 heures avant de retourner la terre par labourage et de réaliser un vide sanitaire de 6 semaines minimum (Anses 2017). On ne dispose pas, néanmoins de données permettant de valider ces prescriptions dans le cas d'une contamination du sol par *C. botulinum*.

4.3.2 Traitement des surfaces agricoles contaminées

Le GT examinera successivement dans ce paragraphe le cas des prairies et des parcelles cultivées ou destinées à être cultivées, en soulignant qu'on ne dispose d'aucune possibilité de traitement (qu'il soit physique, chimique ou biologique) applicable à ces écosystèmes à la suite d'une contamination avérée et que la solution passe en fait par un changement de destination de ces surfaces. Le GT se bornera donc à présenter les mesures de gestion applicables en vue de réduire les risques afférents.

Il faut rappeler que la contamination des surfaces agricoles peut résulter soit d'un épandage direct, soit d'un dépôt de poussières ou d'aérosols contaminés entraînés par le vent depuis une aire de stockage du produit ou lors d'un épandage de matériel pulvérulent.

4.3.2.1 Prairies

Les études effectuées à la suite de l'observation de foyers de botulisme en élevage bovin montrent la présence de *C. botulinum* dans des pâtures. La contamination de ces dernières est notamment attribuée à leur proximité avec des élevages de volailles infectés par *C. botulinum* de types C, D ou mosaïques (avec éventuellement stockage de fumier près de la pâture) ou fait suite à l'épandage des effluents (litière, fumiers, etc.) qui en sont issus.

S'agissant de matières organiques solides, l'épandage se fait par dépôt sur la surface enherbée. Les effluents liquides (lisier) peuvent être épandus par enfouissement (avec enfouisseur à disque par exemple), contribuant à réduire la contamination des végétaux et du sol en surface.

L'épandage par dépôt entraîne une contamination des parties aériennes de l'herbe (en partie basse notamment) et une contamination du sol en surface. Il est habituellement conseillé,

après épandage d'effluents d'élevage sur des pâtures (ou sur des terres productrices de fourrages), de respecter une période d'attente de trois à cinq semaines avant remise des animaux. Une période d'attente minimale de 21 jours est réglementairement fixée dans le cas des composts et digestats⁶⁵. Ces délais sont habituellement compatibles avec une réduction naturelle de la quantité de micro-organismes initialement déposés du fait de l'intervention de différents facteurs affectant leur viabilité, en particulier l'exposition des végétaux à une forte dose d'UV, ainsi qu'à des fluctuations de température et d'humidité (Heaton et Jones 2008), ou réduisant leur concentration (infiltration progressive dans le sol). Dans le cas du botulisme, on peut présumer que les toxines sont assez rapidement inactivées sur les parties aériennes des végétaux ; il en est de même pour les formes végétatives à moins qu'elles ne puissent sporuler. Leur persistance en surface du sol est également dépendante de l'intervention des facteurs biotiques et abiotiques présents. De par leurs capacités intrinsèques de résistance, les formes sporulées vont en revanche persister. Ces questionnements sur la persistance de *C. botulinum* en surface des pâtures sont à mettre en perspective avec les observations de Smart *et al.* (1987) révélant le développement de la maladie chez un bovin mis à pâturer deux mois après un épandage de litières de volailles contaminées et celles de Souillard et Kuntz (2020) détectant la bactérie en surface (en utilisant des pédichiffonnettes) comme en profondeur (prélèvements de terre) cinq mois après épandage de fumier de volailles contaminé. Ces données conduisent à estimer comme insuffisant le délai de trois à cinq semaines généralement conseillé avant de remettre les bovins en pâture.

Un labourage profond (avant réensemencement de la prairie) permet une diminution de la contamination en surface et en partie superficielle du sol. Il n'a, en revanche, d'autre effet que celui d'une dilution, sans garantie d'une quelconque influence sur le devenir des spores dans la terre. Celle-ci, en fonction de la quantité de spores présentes, peut par la suite être une source indirecte de contamination de l'herbe ingérée par les animaux ou récoltée en tant que fourrage ou pour la fabrication d'ensilage d'herbe. En revanche, un labourage profond présente l'avantage de réduire l'exposition des oiseaux et autres animaux ayant accès au site.

4.3.2.2 Parcelles destinées à la culture ou cultivées

4.3.2.2.1 *Épandages sur terre nue*

Réglementairement (arrêté du 27 décembre 2013)⁶⁶, les épandages sur terres nues des effluents d'élevage ou des matières issues de leur traitement sont suivis d'un enfouissement dans les 12 heures (ou 24 heures pour les fumiers de bovins compacts non susceptibles d'écoulement, après un stockage d'au minimum deux mois, ou pour les matières issues de leur traitement). Ces dispositions visent à limiter les odeurs et les risques d'écoulement en surface. Elles ne s'appliquent pas aux composts, lorsque les andains ont fait l'objet d'au minimum deux retournements ou d'une aération forcée, et ont été maintenus à une température supérieure à 55°C pendant quinze jours ou à 50°C pendant six semaines. Toutefois, comme indiqué précédemment, ces modalités, ne permettent pas d'éliminer les formes sporulées de *C. botulinum* dans le compost produit.

Dans le cas d'un produit reconnu contaminé par *C. botulinum*, l'enfouissement (le plus profond possible) permet de réduire l'exposition des oiseaux et autres animaux ayant accès au site. Le devenir de la bactérie dans la terre dépend là encore des facteurs biotiques et abiotiques

⁶⁵ Période d'attente visée à l'article 11, paragraphe 1, point c), du règlement (CE) n° 1069/2009.

⁶⁶ Arrêté du 27 décembre 2013 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées pour la protection de l'environnement soumises à déclaration sous les rubriques nos 2101-1, 2101-2, 2101-3, 2102 et 2111.

qu'elle y trouve. De sa concentration dans le sol dépendent les possibilités de contamination des végétaux (racines notamment) en surface, d'où le risque en cas de consommation à l'état cru ou lorsque les procédés de conservation ou de transformation ne permettent pas de neutraliser ou d'éliminer le danger.

4.3.2.2.2 *Épandages sur culture*

La problématique des épandages sur culture de végétaux destinés à la consommation animale ou humaine est comparable à celle précédemment décrite pour les prairies et pâtures.

Le risque d'exposition est le plus élevé lorsque la contamination affecte les parties des végétaux (racines, feuilles et fruits) qui sont consommées. On notera que certaines prescriptions, comme celles d'épandre du fumier ou du lisier au minimum quatre mois avant la plantation ou le semis pour des légumes dont la culture dure peu de temps et pour des légumes qui sont consommés crus (par ex. les salades), sont suffisantes pour limiter le risque de contamination par des micro-organismes entéro-pathogènes non sporulés (salmonelles, coliformes, etc.), mais peuvent ne pas l'être pour les formes sporulées de *C. botulinum*. Le risque de botulisme doit alors être analysé en fonction des végétaux produits (végétaux consommés ou non), des espèces amenées à les consommer (humains ou animaux) et des modalités de consommation, en privilégiant notamment les procédés de conservation ou de transformation limitant le risque de développement de la bactérie et de production de toxine.

La décontamination des abords des bâtiments d'élevage s'effectue simultanément et selon les mêmes modalités que pour les bâtiments eux-mêmes lorsqu'ils sont cimentés (application d'un produit désinfectant sporicide) ou en terre battue (traitement à la chaux vive).

Les possibilités de traitement des abords enherbés des bâtiments d'élevage et des parcours en plein air pour les volailles sont quasiment limitées à l'application de chaux vive avant de retourner la terre par labourage, mais aucune étude n'a été conduite jusqu'ici pour en valider l'efficacité sur les spores botuliques ou pour déterminer le devenir des spores après enfouissement dans la terre.

Dans le cas des prairies et des terrains cultivés, aucun procédé ne permet d'éliminer les spores introduites en surface ou dans la terre à la suite de l'épandage d'un effluent contaminé. Si l'épandage est absolument nécessaire, il conviendra de le limiter à des parcelles vouées à des productions à faible risque de contamination et d'imposer ou privilégier un épandage par injection ou avec enfouissement rapide en amont des semis et plantations.

5 Évaluation qualitative de risque lié à l'épandage des matières issues d'un foyer de botulisme bovin/aviaire

Les éléments présentés dans le chapitre précédent montrent que le stockage prolongé, le compostage ou le processus de digestion anaérobie pour la production de biogaz (méthanisation), y compris lorsqu'ils sont soumis à l'étape de « pasteurisation/hygiénisation » prévue par le règlement n°1069/2009/CE, ne permettent pas d'obtenir un assainissement des effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme. Le traitement à la chaux vive, selon le procédé du mille-feuilles, est le moyen le plus efficace qui est utilisé le plus couramment sur site pour traiter le fumier de volailles, même s'il ne permet pas d'inactiver la totalité des spores de *C. botulinum* (au regard des données actuellement disponibles).

En réponse à la question du demandeur relative aux risques liés aux épandages des effluents contaminés et avant d'envisager comme alternatives un recours à l'incinération, la stérilisation sous pression, voire l'enfouissement en décharge des effluents les plus contaminés, il est nécessaire d'évaluer quels risques en santé animale comme en santé humaine peuvent résulter de leur épandage sur des sols agricoles et de définir quelles mesures de gestion sont susceptibles de les réduire.

5.1 Description de la méthode d'évaluation

Pour répondre aux questions d'évaluation de risque de cette saisine, les experts ont adopté la méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale dont le détail est disponible dans le rapport de l'Afssa intitulé « une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale » (Afssa 2008). Cette méthode a été conçue pour pouvoir être utilisée :

- lorsqu'il n'y a pas suffisamment de données pour conduire une évaluation quantitative,
- par tout expert ne possédant pas forcément une compétence particulière dans le secteur de l'analyse du risque.

Elle propose une échelle ordinale, graduée de zéro à neuf, pour qualifier les probabilités de l'émission du danger, de l'exposition au danger et de survenue de l'évènement indésirable (résultant de la combinaison de la probabilité de l'émission et de la probabilité de l'exposition) ; ainsi que l'estimation du risque (résultant de la combinaison de la probabilité de survenue de l'évènement indésirable et des conséquences). La correspondance terminologique de l'échelle utilisée est présentée dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Correspondance entre l'échelle ordinale et les qualificatifs utilisés pour caractériser les probabilités en évaluation qualitative du risque

Qualificatifs	Échelle ordinale
Nulle	0
Quasi-nulle	1
Minime	2
Extrêmement faible	3
Très faible	4
Faible	5
Peu élevée	6
Assez élevée	7
Élevée	8
Très élevée	9

Compte tenu du manque de données disponibles pour l'appréciation des conséquences, les experts ont convenu de se limiter à l'estimation de la probabilité de survenue de l'évènement indésirable. Le tableau de croisement utilisé pour cette estimation est présenté en Annexe 4.

5.2 Identification du danger

Le botulisme est une maladie du système nerveux due à l'action de la neurotoxine botulique produite par *C. botulinum*. On rappellera cependant que si la neurotoxine botulique est la cause du développement du botulisme, sa diffusion dans l'organisme sensible peut résulter :

- soit de l'ingestion de toxine préformée présente dans un aliment ou une eau de boisson,
- soit de sa production dans l'organisme par des formes végétatives de la bactérie se multipliant dans le tube digestif (ou certains tissus dans les cas, plus rares, de botulisme d'inoculation) à la suite de l'ingestion de la bactérie (formes végétatives et/ou sporulées) présente dans l'aliment.

Le danger considéré dans cette saisine, est représenté par *C. botulinum* de type D, C, mosaïques C/D, D/C, dont tous les éléments, c'est-à-dire les formes végétatives, les formes sporulées et la neurotoxine. Ces différents éléments peuvent être présents dans les effluents et les autres matrices considérées dans cette étude à savoir : les végétaux produits dans les terrains fertilisés avec des effluents contaminés, les poussières ou les aérosols disséminés lors des opérations d'épandage et les eaux de surface (mares, cours d'eau, etc.) contaminées suite à l'épandage. Du fait de leur capacité de résistance, les spores sont néanmoins l'élément le plus abondant et le plus constant dans ces matrices.

L'évènement indésirable au vu de la santé animale est **la contamination de bovins ou de volailles *via* : (i) la consommation de végétaux ou cultures issus des sols sur lesquels ont été épandus des effluents contaminés ou (ii) des poussières ou des aérosols disséminés suite à l'épandage d'effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme ou (iii) la consommation d'eaux de surface contaminées.**

L'évènement indésirable au regard de la santé humaine, est **(i) la contamination des humains situés à proximité lors des opérations d'épandage d'effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme ou (ii) la contamination suite à la consommation de végétaux provenant d'un sol sur lequel ont été épandus des effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme.**

5.3 Schéma évènementiel

Le schéma évènementiel est une représentation des différents scénarios conduisant à l'apparition de l'évènement indésirable.

Le schéma proposé (Figure 3) se réfère aux restrictions générales que prévoit la réglementation lors de foyers d'infection dans un élevage. Il est destiné à identifier pour chaque situation les différentes probabilités à prendre en compte tant pour l'émission que pour l'exposition. Ce schéma comprend deux parties : la première met en évidence les étapes relatives à l'émission du danger et la seconde les principales modalités d'exposition au danger.

Dans la **partie relative à l'émission**, le point de départ de ce schéma est un élevage (aviaire ou bovin) foyer de botulisme d'où proviennent les effluents à épandre (litière, fumier, lisier, fientes et eaux résiduelles seules ou mélangées au lisier). Les aliments contaminés de l'élevage pourraient dans certains cas être mélangés au fumier ou à la litière.

En dessous sont identifiés les différents types de produits possiblement épandus : effluents bruts, effluents après stockage ou valorisés par compostage (compost) ou méthanisation (digestat). L'émission possible à partir des engins utilisés pour le transport des produits contaminés est également identifiée dans le schéma. L'épandage peut se faire sur place dans l'« élevage-foyer » ou à distance, dans d'autres élevages. Il existe de ce fait, un risque de dissémination.

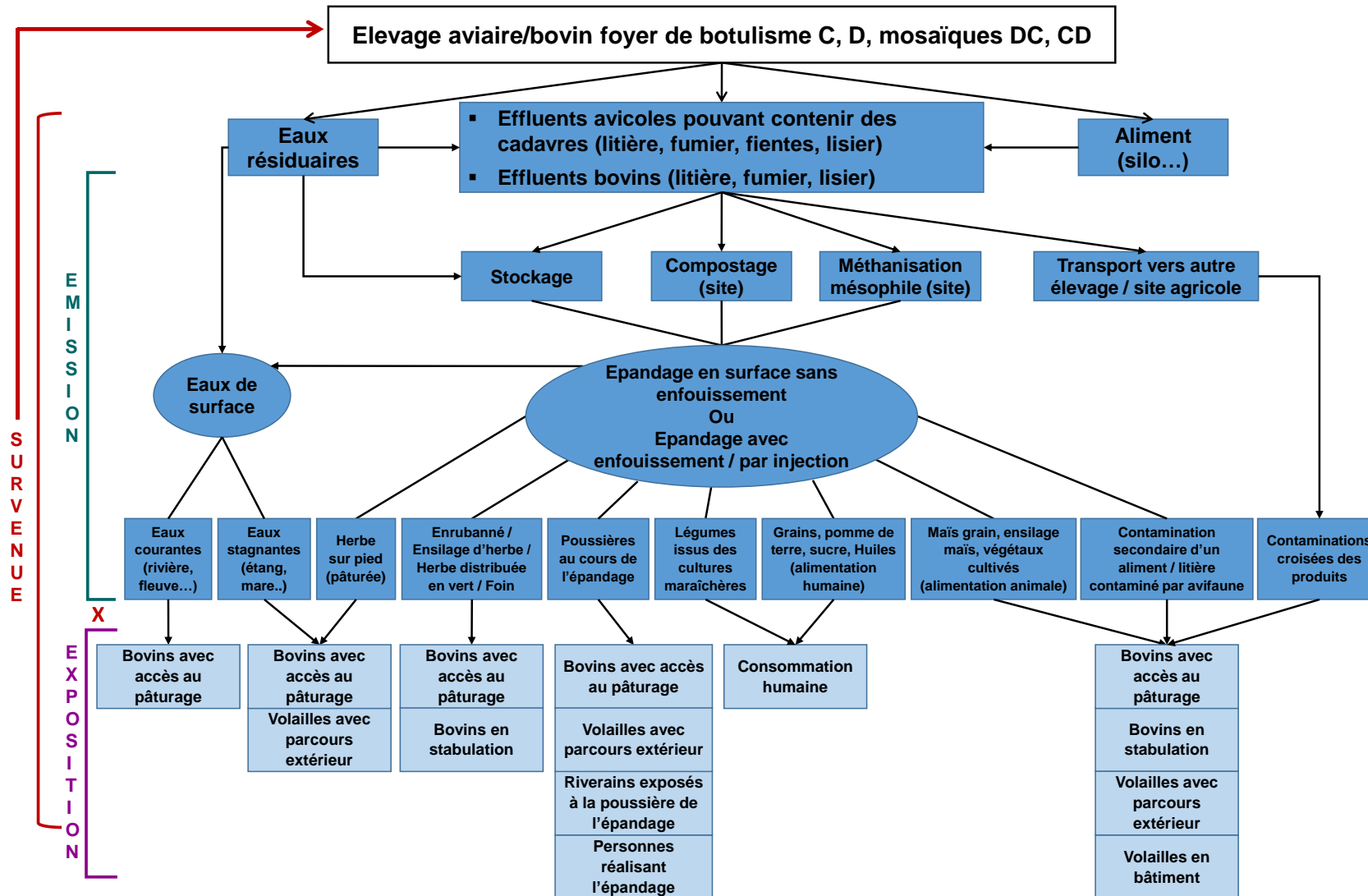
Les étapes suivantes découlent de l'épandage, en différenciant l'épandage en surface (matières solides et liquides) ou par introduction dans le sol (enfouissement ou injection dans le cas des matières liquides). En résultent les possibilités d'émission des sols (prairies ou parcelles mises en culture) sur ou dans lesquels ont été introduits *C. botulinum* et/ou sa toxine, et *in fine* les végétaux qui y sont cultivés.

La question de la contamination des eaux de surface est aussi prise en compte. Elle peut résulter du rejet des eaux résiduaires dans la nature ou du ruissellement suite aux épandages.

Dans la **partie relative à l'exposition**, sont considérés les animaux qui peuvent se contaminer : en consommant directement les végétaux des parcelles sur lesquelles ont été réalisés les épandages (bovins mis à l'herbe, volailles sur parcours), à la suite de l'incorporation dans leur ration des végétaux qui y sont récoltés (bovins en stabulation, volailles en bâtiment) ou en s'abreuvant avec des eaux contaminées. Les aliments destinés aux animaux peuvent être aussi secondairement contaminés par des poussières ou des aérosols émis durant les épandages ou par des animaux sauvages (oiseaux notamment) fréquentant les parcelles où ces épandages ont été effectués.

Est enfin prise en considération l'exposition des humains résultant de l'inhalation des poussières ou des aérosols contaminés émis pendant l'épandage (éleveurs ou tiers résidant à proximité des zones d'épandage) ou de la consommation des végétaux produits sur les parcelles fertilisées avec les effluents, fumiers, compost ou digestats contaminés (Figure 3).

Figure 3 : Schéma évènementiel



5.4 Probabilité d'émission du danger

La probabilité d'émission du danger correspond à la probabilité que *C. botulinum* (forme végétative, spore et/ou toxine) soit présent dans la matrice considérée.

L'appréciation de l'émission consiste à approcher de manière qualitative la probabilité de présence du danger dans chaque matrice pouvant être incriminée dans la contamination des espèces animales et de l'être humain. Ce score est cependant pondéré (avis d'experts) en fonction de la charge microbienne ou en toxine potentiellement attendue dans chaque matrice en tenant compte :

- de l'espèce animale émettrice, ici les bovins et les volailles ;
- du devenir attendu du danger dans les différentes matrices ;
- des abattements éventuels consécutifs à l'effet des traitements (compostage ou méthanisation) ou des dilutions réalisées (résultant par exemple du mélange avec des co-substrats et les mélanges d'effluents issus de plusieurs élevages, lors de la méthanisation).
- du type d'épandage (épandage en surface ou épandage par injection ou avec enfouissement),

En tenant compte des critères précédemment énoncés, les experts ont procédé, par étapes successives (cf. Figure 3), à l'estimation de l'émission du danger dans :

- les effluents bruts (déjections et eaux résiduaires) issus des locaux d'élevage des volailles ou des bovins (**probabilités brutes d'émission**),
- les produits obtenus à la suite du stockage des effluents bruts, de leur transformation par compostage, ou de leur conversion en biogaz (**émission primaire**),
- les matériels de manutention et de transport des effluents contaminés (**émission primaire**),
- les surfaces environnementales (prairies, champs) sur lesquelles les produits précédents ont été épandus, et *in fine* les végétaux produits sur ces surfaces et consommés à l'état cru ou après transformation, en tenant compte du consommateur final, être humain ou animal (**émission secondaire**),
- les poussières ou les aérosols se déposant sur des végétaux ou inhalés et déglutis par l'être humain ou les animaux (**émission secondaire**)
- les eaux de surfaces polluées par des écoulements d'eaux résiduaires ou par des ruissellements après épandage (**émission secondaire**).

L'estimation des différentes probabilités d'émission se fonde sur les données bibliographiques disponibles et les connaissances des experts. En fonction des données disponibles, le niveau d'incertitude sur l'estimation de ces probabilités est qualifié de « faible », « moyen », « élevé » ou « absence de données ». Les critères d'attribution des qualificatifs d'incertitudes sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Critères d'attribution des qualitatifs utilisés pour caractériser les incertitudes

Qualification de l'incertitude	Critères d'attribution
Faible	La note attribuée est fondée sur des résultats convergents d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité reconnue.
Moyen	La note attribuée est fondée sur un nombre limité d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité limitée ET la présence de convergences entre auteurs et/ou experts.
Élevé	La note attribuée est fondée sur : - un nombre limité d'études scientifiques ou sur un système de collecte de données de fiabilité limitée ET l'absence de consensus entre auteurs et/ou experts ; - ou sur un avis individuel d'expert en l'absence d'études scientifiques ou de système de collecte de données.
Absence de données	Aucune note n'est attribuée du fait de l'absence totale de données et d'avis d'expert.

5.4.1 Probabilité brute d'émission dans un foyer déclaré

La probabilité brute d'émission est la probabilité de retrouver *C. botulinum* sous toutes ses formes dans des effluents d'élevage (bovin ou aviaire) issus d'un foyer de botulisme déclaré.

Les probabilités brutes d'émission ainsi que l'argumentaire et les incertitudes pris en compte dans l'estimation sont résumés dans le Tableau 7 ci-dessous.

Tableau 7 : Probabilités brutes d'émission du danger dans les effluents issus d'un foyer déclaré

Élevage	Effluents	Probabilité brute d'émission	Argumentaire pris en compte dans l'estimation des probabilités	Niveau d'incertitude
Volailles	Litière, fumier, fientes, lisier (pouvant contenir des cadavres)	9 Très élevée	<p>La présence en quantité importante de <i>C. botulinum</i> de type C, D ou mosaïques et leur persistance dans les effluents d'élevage est démontrée en particulier par les investigations portant sur les fumiers de volailles (Souillard <i>et al.</i> 2020).</p> <p>L'excrétion de la bactérie est très forte chez les volailles même sans signes cliniques.</p> <p>Le nombre d'animaux pouvant être atteints lors d'un épisode est très élevé comparé aux bovins, ce qui entraîne une charge microbienne plus importante dans les effluents d'origine aviaire.</p> <p>Le fumier issu de lots atteints de botulisme est identifié comme l'une des principales sources de contamination à l'origine des foyers de botulisme bovin de type C, D, mosaïques C/D ou D/C (Popoff 1989; Payne <i>et al.</i> 2011; Relun <i>et al.</i> 2017; Souillard <i>et al.</i> 2017a; Souillard <i>et al.</i> 2021).</p> <p>Des cadavres non ramassés ou oubliés peuvent être mélangés à la litière augmentant ainsi le risque de portage dans les effluents (Ortiz et Smith 1994; Popoff 1989; Espelund et Klaveness 2014).</p>	Faible Références bibliographiques disponibles
	Eaux résiduaires	[6-8] Peu élevée à élevée	<p>Prévalence importante de <i>C. botulinum</i> dans les effluents de volailles.</p> <p>En cas d'infection, le nettoyage complet des bâtiments après le retrait du fumier ou la litière conduit à une dilution de la charge initiale (audition GDS Bretagne).</p>	Élevé Manque de données sur les charges bactériennes dans les eaux résiduaires

Bovins	Litière, fumier, lisier	[4-8] Très faible à élevée	<p>En cas de botulisme, la mortalité chez les bovins est généralement très rapide et l'excrétion des <i>C. botulinum</i> dans les fèces des bovins contaminés est faible (évaluation du risque faite par la DDPP des Côtes d'Amor).</p> <p>Le nombre de sujets contaminés lors d'un épisode de botulisme bovin est habituellement faible, ce qui limiterait la quantité de <i>C. botulinum</i> excrétée dans le fumier ou le lisier.</p> <p>Des analyses récentes dans des élevages bovins infectés ont néanmoins mis en évidence la persistance de <i>C. botulinum</i> dans le fumier (au moins sept mois dans un fumier de bovins pourtant traité à la chaux) et le lisier (au moins trois mois) (projet BOTUSOL).</p>	Moyen Peu de références sur le degré de contamination des effluents bovins
	Eaux résiduaires	[2-6] Minime à peu élevée	La charge bactérienne des eaux de lavage des locaux d'élevage est considérée comme inférieure à celle des fumiers et lisiers (effet dilution).	Élevé Absence de données sur les charges bactériennes dans les eaux résiduaires

5.4.2 Appréciation de la probabilité primaire d'émission

5.4.2.1 Probabilités primaires d'émission des effluents d'élevage

Les effluents d'élevage issus d'un foyer déclaré peuvent être stockés ou transformés par des procédés biologiques (compostage, méthanisation) à des fins de valorisation de la matière organique.

Cette phase de l'analyse vise à évaluer la probabilité d'émission du danger dans : (i) les effluents (fumier, lisier, eaux résiduaires) issus de l'élevage foyer après une phase de stockage, (ii) un compost après le processus de compostage et (iii) les produits (digestat solide ou liquide) issus de la méthanisation et destinés à être épandus.

Selon l'arrêté de biosécurité du 29/09/2021⁶⁷, un temps de stockage de 42 à 60 jours est requis pour les effluents issus d'élevages de volailles. Le stockage des effluents bovins, en revanche, n'est soumis à aucune durée de stockage réglementaire. Les experts considèrent que le stockage n'entraîne aucune inactivation de *C. botulinum* et peut parfois augmenter le risque par une possible multiplication de celui-ci (Souillard *et al.* 2020).

Le compostage est un procédé réalisé en aérobiose, milieu défavorable à la survie de *C. botulinum*. L'aération et le suivi des températures observées lors du compostage suggèrent une probable inactivation des cellules végétatives, mais pas des spores (Böhnel et Lube 2000).

La méthanisation est réalisée en anaérobiose, milieu favorable à la persistance de *C. botulinum*. Les digestats destinés à l'épandage peuvent être bruts (issus du digesteur avec ou sans stockage en fosse) ou post-traités. En méthanisation en voie liquide, les post-traitements les plus courants consistent en une post-digestion suivie ou non d'une séparation de phase (phase liquide stockée et phase solide stockée ou compostée). Après méthanisation en voie

⁶⁷ Arrêté du 29 septembre 2021 relatif aux mesures de biosécurité applicables par les opérateurs et les professionnels liés aux animaux dans les établissements détenant des volailles ou des oiseaux captifs dans le cadre de la prévention des maladies animales transmissibles aux animaux ou aux êtres humains. JORF n°0228 du 30 septembre 2021.

solide⁶⁸, le digestat est stocké ou composté. Les sous-produits issus de la filière de méthanisation sont donc liquides ou solides. Les effluents de volailles sont majoritairement valorisés dans les unités de méthanisation en mélange avec des effluents porcins et/ou bovins. En effet, les effluents de volailles, compte tenu de leur richesse en ammoniac, doivent être mélangés à d'autres effluents et/ou à des co-substrats. Les effluents bovins peuvent être transformés par les deux types de voies (liquide ou sèche).

Les experts estiment que la digestion anaérobie ne cause aucune inactivation de la bactérie et n'excluent pas un éventuel développement de *C. botulinum* compte tenu des conditions anoxiques favorables retrouvées dans les unités de méthanisation. Par ailleurs, le prétraitement de 70 C pendant une heure est sans effet sur les spores.

Les probabilités primaires d'émission des effluents ainsi que l'argumentaire et les incertitudes pris en compte dans l'estimation sont présentés dans le Tableau 8 ci-dessous.

5.4.2.2 Probabilités d'émission liée au transport des effluents

Les effluents d'un foyer de botulisme peuvent être transportés vers un autre élevage ou un site agricole pour être épandus. Dans ce cas, les experts considèrent qu'il existe un risque d'une contamination croisée dans le cas d'un nettoyage et d'une désinfection insuffisants des matériels de transport. Par exemple, un foyer a été rapporté dans un élevage de dindes où le stock de blé s'est révélé positif avec une suspicion forte de contamination croisée dans un camion lors de la succession de transports de fumier et de blé (Le Gratiet *et al.* 2022). Dans plusieurs cas de foyer de botulisme, l'analyse des godets ayant servi au transport des effluents a donné des résultats positifs (Souillard *et al.* 2021; GDS Bretagne *et al.* 2019).

Il convient néanmoins de noter que le règlement n°1069/2009/CE interdit l'envoi au départ d'exploitations contaminées, des sous-produits animaux et produits dérivés sauf s'ils sont expédiés dans des conditions destinées à empêcher la propagation de maladies transmissibles aux êtres humains ou aux animaux.

La probabilité d'émission de *C. botulinum* sur du matériel ayant servi au transport d'effluents contaminés et n'ayant pas été suffisamment nettoyé et désinfecté est présentée dans le Tableau 8.

⁶⁸ On parle généralement de méthanisation solide ou par voie sèche lorsque les intrants du digesteur contiennent entre 15 et 20 % de matière sèche.

Tableau 8 : Probabilités primaires d'émission du danger

Élevage	Effluents	Probabilité primaire d'émission	Argumentaire pris en compte dans l'estimation des probabilités	Niveau d'incertitude	
Volailles	Litière, fumier, fientes, lisier (pouvant contenir des cadavres) et eaux résiduaires	Stockage	9 Très élevée	Un suivi de fumier de volailles stocké suggère un accroissement de la charge en <i>C. botulinum</i> durant le stockage (Souillard <i>et al.</i> 2020).	Moyen Pas de connaissance quantitative de la charge des effluents.
		Produits issus du compostage	[7-8] Assez-élevée à élevée	Effet de dilution de la charge bactérienne lié au mélange de co-substrats. Compétition bactérienne liée à la présence d'autres micro-organismes dans le milieu. Présence d'oxygène liée à l'aération est défavorable à la croissance des formes végétatives	Élevé
		Produits issus de la méthanisation	[7-9] Assez-élevée à très élevée	En méthanisation collective, la contamination apportée par un effluent peut être diluée par l'apport d'effluents d'autres élevages non contaminés. Dans le cas d'un méthaniseur non collectif, les co-substrats et les différents types d'effluents issus de l'élevage participent à la dilution de la contamination. Lorsque le digestat est composté (phase solide après séparation de phase pour la méthanisation voie liquide ou digestat issu de la voie solide) il subit une étape d'hygiénisation susceptible de réduire le nombre de cellules végétatives de <i>C. botulinum</i> .	Moyen Diversité des procédés de méthanisation et des produits issus de cette filière, rendant complexe l'estimation de la probabilité d'émission. Pas de données sur l'influence des compétitions bactériennes sur le développement ou la survie de <i>C. botulinum</i> durant la méthanisation.
	Matériels de manutention dont matériels de transport	[3-7] Extrêmement faible à assez-élevée	Cette situation suppose l'absence de nettoyage-désinfection du matériel ayant servi au transport des effluents contaminés. La charge bactérienne initiale des effluents de volaille peut être importante. La charge initiale déposée sur les parois des bennes, godets, etc. est diluée en fonction de la quantité d'aliment secondairement transporté.	Faible Manque de connaissance sur une possible affinité de <i>C. botulinum</i> pour certains matériaux et surfaces.	
Bovins	Litière, fumier, lisier	Stockage	[4-8] Très faible à élevée	La bibliographie existante montre la persistance de la contamination des effluents durant un stockage prolongé pendant au moins sept mois (BOTUSOL, projet en cours).	Moyen Peu de publications avec uniquement des données qualitatives sur la charge des effluents Pas de données disponibles pour un stockage au-delà de sept mois
		Produits issus du compostage	[3-7] Extrêmement faible à assez-élevée	Effet de dilution de la charge bactérienne lié au mélange de co-substrats. Compétition bactérienne liée à la présence d'autres micro-organismes dans le milieu. Présence d'oxygène liée à l'aération est défavorable à la croissance des formes végétatives	Élevé
		Produits issus de la méthanisation	[3-8] Extrêmement faible à élevée	En méthanisation collective, la contamination apportée par un effluent peut être diluée par l'apport d'effluents d'autres élevages non contaminés. Dans le cas d'un méthaniseur non collectif, les co-substrats et les différents types d'effluents issus de l'élevage participent à la dilution de la contamination. Lorsque le digestat est composté (phase solide après séparation de phase pour la méthanisation voie liquide ou digestat issu de la voie solide) il subit une étape d'hygiénisation susceptible de réduire les cellules végétatives de <i>C. botulinum</i> .	Moyen Diversité des procédés de méthanisation et des produits issus de cette filière, rendant complexe l'estimation de la probabilité d'émission. Pas de données sur l'influence des compétitions bactériennes sur le développement ou la survie de <i>C. botulinum</i> durant la méthanisation.
	Matériels de manutention dont matériels de transport	[2-5] Minime à faible	Cette situation suppose l'absence de nettoyage-désinfection du matériel ayant servi au transport des effluents contaminés. La charge bactérienne initiale des effluents bovins est faible. La charge initiale déposée sur les parois des bennes, godets, etc. est diluée en fonction de la quantité d'aliment secondairement transporté.	Élevé Pas de données disponibles sur les contaminations croisées liées au transport d'effluents contaminés. Pas de connaissance sur une possible affinité de <i>C. botulinum</i> pour certains matériaux et surfaces.	

5.4.3 Probabilité secondaire d'émission

Cette étape est consacrée à l'appréciation des probabilités d'émission après l'épandage d'effluents de volailles ou de bovins issus d'un foyer déclaré et ayant fait l'objet de stockage ou de transformation (produits de méthanisation ou du compostage). Ces effluents peuvent être épandus sur des prairies, des sols de grandes cultures ou des sols de cultures maraîchères. Les cultures issues des sols sur lesquels auront été épandus des effluents transformés ou non et initialement contaminés par *C. botulinum* pourraient ainsi être des sources d'émission du danger. Les oiseaux peuvent également, par leurs fientes, contaminer secondairement des aliments et litières non protégés.

L'épandage des effluents est réalisé en surface ou par injection en fonction de la nature du produit épandu. Les produits solides sont épandus en surface tandis que l'épandage des effluents liquides peut se faire en surface à l'aide d'un pendillard⁶⁹ ou par injection à l'aide d'un injecteur à dents. Le mode d'épandage peut moduler la probabilité secondaire d'émission. En effet le risque d'aérosolisation de *C. botulinum* lors d'un épandage par injection est moindre que lors d'un épandage en surface.

Par ailleurs, après épandage et en cas d'intempéries, les eaux de ruissellement contaminées par *C. botulinum* contaminent elles-mêmes les eaux de surface (rivière, point d'eau, etc.) proches à partir desquelles des bovins ou des volailles pourraient se retrouver exposés. Les experts ne considèrent pas le cas de l'infiltration des eaux contaminées vers une nappe phréatique, aucune recherche de *C. botulinum* dans une eau souterraine n'ayant été réalisée à ce jour.

Les probabilités secondaires d'émission du danger, estimées par les experts dans les différentes matrices, sont présentées dans le Tableau 9 (après épandage d'effluents de volailles) et le Tableau 10 (après épandage d'effluents de bovins). L'argumentaire et les incertitudes pris en compte dans l'estimation de ces probabilités sont présentés dans le Tableau 11.

⁶⁹ Dispositif souple ou rigide équipant les pulvérisateurs afin de rapprocher les buses du sol. Ce dispositif permet de limiter fortement les pertes de produit par volatilisation (<https://fertilisation-edu.fr/lexique/word/73.html>).

Tableau 9 : Probabilités d'émission du danger dans diverses matrices suite à un épandage d'effluents de volailles

Matrice	Épandage en surface (sans enfouissement)			Épandage par injection ou épandage en surface suivi d'un enfouissement immédiat		
	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de stockage	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de compostage	Probabilité d'émission après épandage de produits de méthanisation	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de stockage	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de compostage	Probabilité d'émission après épandage de produits de méthanisation
Herbe sur pied (pâturée)	8 Élevée	[6-7] Peu élevée à assez élevée	[6-8] Peu élevée à élevée	[4-6] Très faible à peu élevée	-	[3-6] Extrêmement faible à peu élevée
Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[2-4] Minime à très faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	-	[1-2] Quasi-nulle à minime
Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[7-8] Assez élevé à élevée	[5-6] Faible à peu élevé	[5-7] Faible à assez élevée	[3-7] Extrêmement faible à assez élevée	-	[2-6] Minime à peu élevée
Foin	[2-4] Minime à très faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	-	[1-2] Quasi-nulle à minime
Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible
Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[2-3] Minime à extrêmement faible	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime
Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée
Grandes cultures (céréales, oléagineux, etc.) (consommation humaine)	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible
Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible
Eaux stagnantes peu profondes (étang, mare)	[6-8] Peu élevée à élevée					
Eaux courantes (rivière, fleuve)	[1-6] Quasi-nulle à peu élevé					

Tableau 10 : Probabilités d'émission du danger dans les diverses matrices suite à un épandage d'effluents de bovins

Matrice	Épandage en surface (sans enfouissement)			Épandage par injection ou épandage en surface suivi d'un enfouissement immédiat		
	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de stockage	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de compostage	Probabilité d'émission après épandage de produits de méthanisation	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de stockage	Probabilité d'émission après épandage d'effluents ayant fait l'objet de compostage	Probabilité d'émission après épandage de produits de méthanisation
Herbe sur pied (pâturée)	[3-7] Extrêmement faible à assez élevée	[2-6] Minime à peu élevée	[2-7] Minime à assez élevée	[2-6] Minime à peu élevée	-	[1-5] Quasi-nulle à faible
Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	-	1 Quasi--nulle
Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[3-7] Extrêmement faible à assez élevée	[2-6] Minime à peu élevée	[2-7] Minime à assez élevée	[2-6] Minime à peu élevée	-	[2-5] Minime à faible
Foin	[1-2] Quasi-nulle à minime	1 Quasi-nulle	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	-	1 Quasi--nulle
Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée	[1-6] Quasi-nulle à peu élevée	[1-7] Quasi-nulle à assez élevée	[1-2] Quasi-nulle à minime	1 Quasi--nulle	[1-2] Quasi-nulle à minime
Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminée par avifaune	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	[1-2] Quasi-nulle à minime	1 Quasi--nulle	1 Quasi--nulle	1 Quasi--nulle
Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-5] Quasi-nulle à faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-5] Quasi-nulle à faible	[1-5] Quasi-nulle à faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-5] Quasi-nulle à faible
Grandes cultures (céréales, oléagineux, etc.) (consommation humaine)	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	1 Quasi--nulle	1 Quasi--nulle	1 Quasi--nulle
Légumes issus des cultures maraîchères	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-3] Quasi-nulle à extrêmement faible	[1-4] Quasi-nulle à très faible	[1-2] Quasi-nulle à minime	1 Quasi--nulle	[1-2] Quasi-nulle à minime
Eaux stagnantes peu profondes (étang, mare, etc.)	[3-7] Extrêmement faible à assez élevée					
Eaux courantes (rivière, fleuve, etc.)	[1-6] Quasi-nulle à peu élevé					

Tableau 11: Argumentaire et incertitudes pris en compte dans l'estimation des probabilités secondaires

Matrice	Argumentaire pris en compte dans l'estimation des probabilités	Niveau d'incertitude
Herbe sur pied (pâturée)	L'herbe peut être contaminée lors d'épisodes pluvieux par des éclaboussures. Le rinçage de l'herbe par la pluie peut réduire la charge en <i>C. botulinum</i> . Délai de trois à cinq semaines habituellement conseillé avant la mise en pâture des animaux (délai de 21 jours obligatoire avec composts et digestats). Ce délai est de 60 jours dans le cas des digestats dont les matières premières sont constituées de déjections de volailles (Arrêté du 22 octobre 2020) ⁷⁰ . L'enfouissement des effluents entraîne une réduction du risque (effet de dilution des effluents dans le sol).	Faible L'internalisation de <i>C. botulinum</i> dans la plante à partir du sol semble très peu probable. Aucun cas de botulisme n'a été signalé suite à l'épandage d'un digestat.
Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	L'ensilage ou l'enrubannage est bien réalisé (bonnes pratiques, respect de pH≤5) avec moins de terre et une absence de cadavres de micromammifères. Les spores peuvent être présentes mais ne germent pas.	Faible Très peu d'études permettant de relier l'épandage d'effluents contaminés par <i>C. botulinum</i> et le risque de contamination de l'ensilage réalisé par fauchage de l'herbe issu du sol amendé.
Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	L'ensilage ou l'enrubannage est défectueux avec une mauvaise conservation, un pH>5 (Anses 2020b), une présence de terre et de cadavres de micromammifères. La présence d'un cadavre peut créer des conditions favorables à la re-croissance de <i>C. botulinum</i> et à la production de toxine (Ortiz et Smith 1994; Espelund et Klaveness 2014).	
Foin	L'aération et l'action du soleil contribueraient à réduire l'émission dans ce produit par élimination de la toxine et des formes végétatives. Les spores peuvent persister.	Élevé
Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	L'épandage se fait généralement lors de la préparation du sol et avant les semis. Selon les pratiques et les besoins nutritifs de la plante, l'épandage peut se faire directement sur des cultures déjà en place (juste après le semis) mais <i>a priori</i> uniquement avec des effluents liquides. Risque de contamination des feuilles des plantes par éclaboussures de terre lors de l'irrigation et ou des pluies. Risque de contamination des graines au moment de la récolte par des spores initialement présentes dans le sol.	Moyen
Contamination secondaire d'un aliment / litière, contaminé par avifaune	Le risque de contamination des sites autour du lieu d'épandage par les oiseaux est élevé (augmentation de portage en présence d'une population importante d'avifaune) (Notermans <i>et al.</i> 1981). Risque d'excrétion (à partir de leur tube digestif) sur un site éloigné.	Élevé
Poussières et aérosols au cours de l'épandage	Les effluents de volailles sont plus pulvérulents (taux élevé de matières sèches) que les effluents bovins. Les bactéries présentes dans le fumier de volaille sont aérosolisées plus facilement que les bactéries du sol ou celles retrouvées dans les poussières (Thiel <i>et al.</i> 2020). En fonction des conditions atmosphériques, les particules de fumier peuvent être transportées sur des centaines de kilomètres (Thiel <i>et al.</i> 2020). L'épandage en surface sur sol nu d'effluents de volailles doit être suivi d'enfouissement dans un délai maximal de 12 h. Le compost d'effluents de volailles est considéré comme étant moins pulvérulent que les effluents ayant fait l'objet de stockage car il subit une phase d'humidification.	Faible

⁷⁰ Arrêté du 22 octobre 2020 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation d'intrants agricoles et/ou agro-alimentaires en tant que matières fertilisantes.

Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	L'épandage se fait généralement lors de la préparation du sol et avant les semis. Selon les pratiques et les besoins nutritifs de la plante, l'épandage peut se faire directement sur des cultures déjà en place (juste après le semis) mais <i>a priori</i> uniquement avec des effluents liquides. Risque de contamination des feuilles des plantes par éclaboussures de terre lors de l'irrigation et ou des pluies. Risque de contamination des graines au moment de la récolte par des spores initialement présentes dans le sol.	Élevé
Légumes issus des cultures maraîchères	L'épandage d'effluents se fait toujours avant le semis. Les matières habituellement épandues sont des produits de compostage. L'épandage est systématiquement suivi d'un enfouissement et les récoltes ont lieu généralement entre trois semaines et trois mois après le semis. Risque de contamination lié aux projections, éclaboussures de terre contaminée sur les cultures ou à un lavage insuffisant.	Élevé
Eaux stagnantes peu profondes (étang, mare, etc.)	Une faible dilution des eaux résiduaires, estimée à 2 log environ par les experts. Possibilité de survie et de maintien (voire multiplication et production de toxine) de <i>C. botulinum</i> , si les conditions environnementales sont favorables, en particulier dans les milieux riches en matières organiques (notamment à l'interface eau-sédiments ou dans les premiers cm des sédiments).	Élevé Peu de connaissances sur la résistance et la croissance de <i>C. botulinum</i> dans une mare
Eaux courantes (rivière, fleuve, etc.)	La dilution des eaux résiduaires pourrait être d'un facteur 2 à 6 log selon la pluviométrie (estimée par les experts).	Élevé Pas d'études sur la possible contamination d'une nappe phréatique par <i>C. botulinum</i>

5.5 Probabilité d'exposition au danger

La probabilité d'exposition au danger correspond à la probabilité d'ingestion par l'organisme de la matrice contaminée.

Pour *C. botulinum* du groupe III, il n'existe aucune donnée précise sur les doses de toxine et la quantité de formes végétatives et/ou spores qui, après ingestion, causeront le développement de la maladie (intoxication) chez les espèces animales et l'être humain. Les experts se sont donc limités à évaluer la probabilité d'ingestion d'une matrice (végétal, eau ou poussières) véhiculant le danger, sans définir si le niveau de contamination sera suffisant pour permettre le développement de la maladie. Aussi, les experts n'ont pas pris en compte la sensibilité des espèces animales et de l'être humain aux différents types toxiques.

Le fait de considérer dans l'hypothèse de travail qu'une matrice peut être ingérée par l'organisme implique d'attribuer le score maximal (9 sur une échelle allant de 0 à 9) à la probabilité d'exposition, cela sans tenir compte de la quantité ingérée.

Les experts ont choisi d'estimer les probabilités d'exposition au danger pour : (i) des bovins en stabulation sans accès aux pâturages, ii) des bovins avec accès aux pâturages, iii) des volailles en bâtiments et iv) des volailles avec parcours extérieur. Pour l'être humain, les probabilités d'exposition ont été estimées pour : (i) les personnes réalisant l'épandage et les riverains exposés aux poussières de l'épandage et (ii) les consommateurs de produits végétaux crus produits sur des parcelles où ont été épandus des produits fertilisants contaminés.

5.6 Probabilité de contamination

Le croisement des probabilités d'émission et d'exposition, en utilisant la grille de croisement présentée dans la méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale, a permis d'estimer la probabilité de survenue de l'évènement indésirable, limitée ici à la probabilité de contamination des animaux et de l'être humain, et non à la probabilité de survenue du botulisme.

Comme cela a déjà été souligné, **cette probabilité reflète exclusivement le risque de contamination par ingestion et non pas le risque de développement de la maladie.**

Selon le tableau de croisement des probabilités présenté en Annexe 4, le fait d'attribuer une probabilité d'exposition égale à 9 (très élevée) implique pour la probabilité de survenue de l'évènement indésirable un score égal à celui de la probabilité d'émission.

L'estimation des probabilités de contamination chez les animaux et l'être humain est présentée dans l'Annexe 5 (Tableaux I à VI).

5.7 Résultats et discussion

Les résultats présentés ci-après sont fondés sur les probabilités détaillées et présentées en Annexe 5 du rapport : les probabilités de contamination suite à l'épandage des effluents de volailles contaminés, après stockage, après compostage et après méthanisation sont présentées dans les Tableaux I, II et III, respectivement. Les probabilités de contamination suite à l'épandage des effluents de bovins contaminés, après stockage, après compostage et après méthanisation sont présentées dans les Tableaux IV, V et VI, respectivement.

5.7.1 Appréciation du risque en santé animale

5.7.1.1 Probabilité de contamination des bovins

La probabilité de contamination des bovins a été estimée pour deux scénarios : (i) pour des bovins en stabulation sans accès aux pâturages et (ii) pour des bovins avec accès aux pâturages.

5.7.1.1.1 *Bovins en stabulation*

L'utilisation d'ensilage ou d'enrubannage de mauvaise qualité est le risque principal de contamination des bovins en stabulation lorsque leurs aliments sont produits sur des parcelles amendées avec des fertilisants organiques contaminés, en particulier d'origine avicole.

- Probabilité de contamination liée à la distribution d'ensilage d'herbe ou de fourrage enrubanné issus d'une prairie fertilisée avec des effluents contaminés

La distribution aux bovins de fourrage enrubanné ou d'ensilage préparés à partir de végétaux récoltés sur une prairie fertilisée avec des effluents contaminés est une cause fréquemment citée de botulisme bovin (Popoff 1989; Driehuis *et al.* 2018).

La probabilité de contamination des bovins est fonction de la qualité de l'enrubanné ou de l'ensilage. Ces aspects sont bien décrits pour l'ensilage (Anses 2020b), dont la contamination est favorisée par la présence de terre (fauchage trop ras) ou la présence de cadavres d'oiseaux ou de petits mammifères piégés et tués durant la récolte (lapins, rongeurs, chats, etc.). Le risque est augmenté dans le cas d'un ensilage dont le pH est supérieur à 4,5 et en présence d'un taux d'humidité élevé. Ces conditions favorisent en effet la germination des spores, la multiplication bactérienne et la production de toxine. Dans de telles circonstances, la probabilité de contamination des bovins ingérant les parties contaminées peut être élevée et est estimée à [7-8] pour des fumiers ou lisiers de volailles, [5-6] pour des composts et [5-7] pour des digestats épandus en surface. Le risque de contamination est réduit en cas d'épandage par injection de lisiers de volailles [3-7] et digestats issus d'intrants contenant des effluents d'élevages avicoles contaminés [2-6].

La probabilité de contamination des bovins est réduite avec des ensilages d'herbe et fourrages enrubannés de bonne qualité. Cette probabilité est estimée respectivement à [2-4], [2-3] et [2-3], pour des fumiers ou lisiers de volailles, composts et digestats épandus en surface, et à [2-3] et [1-2] respectivement, en cas d'épandage par injection des lisiers de volailles et des digestats.

Dans le cas où les fertilisants contaminés sont d'origine bovine, les probabilités de contamination sont plus faibles, variant de [2-5] (digestat injecté dans le sol) à [3-7] (fumier ou lisier épandus en surface) si l'enrubanné ou l'ensilage sont de mauvaise qualité, et réduits à [1-2] si l'enrubanné ou l'ensilage sont de bonne qualité.

Certaines études montrent en outre que **la probabilité de contamination peut être réduite si la récolte de l'herbe est suffisamment décalée par rapport à l'épandage**, ce que rapportent Smart *et al.* (1987) qui n'observent aucun cas de botulisme chez des bovins nourris avec un ensilage d'herbe récoltée trois mois après épandage de litières de volailles très contaminées.

Il est à noter que la distribution de fourrage vert récolté sur les prairies contaminées n'élimine pas le risque de contamination des bovins, notamment si l'herbe récoltée est souillée par de la terre (voir paragraphe 5.7.1.1.2).

➤ Probabilité de contamination liée à la distribution à des bovins de foin issu d'une prairie fertilisée avec des effluents contaminés

L'herbe correctement séchée n'est pas propice à la germination des spores de *C. botulinum* issues des opérations d'épandage de produits fertilisants contaminés sur la prairie. Les cas de botulisme chez des bovins alimentés avec du foin sont le plus souvent consécutifs à la présence d'un cadavre de petit animal (Joubert *et al.* 1969; Popoff 1989; Galey *et al.* 2000; Braun *et al.* 2005). La fermentation accidentelle d'un foin trop humide, si des spores sont présentes sur les végétaux ou lorsqu'ils ont été souillés avec de la terre, peut être néanmoins favorable à la germination des spores et la production de toxine.

En dehors de ces circonstances, la probabilité de contamination du fait de la distribution aux bovins d'un foin de bonne qualité est estimée, lorsque le foin est issu de végétaux produits sur une prairie fertilisée avec des produits d'origine aviaire de [1-2] pour du digestat injecté dans le sol à [2- 4] pour du fumier épandu en surface. Suite à un épandage de produits fertilisants contaminés d'origine bovine, la probabilité de contamination est estimée à [1-2].

➤ Probabilité de contamination liée à la distribution des productions végétales issues d'une parcelle fertilisée avec des effluents contaminés

Les apports végétaux pour les bovins, issus de prairies naturelles, sont complétés (ou remplacés) par diverses productions végétales en grande majorité produites sur l'exploitation (maïs, sorgho, luzerne, betteraves fourragères) auxquelles s'ajoute une part de compléments céréaliers et protéiques (tourteaux de soja, colza) du commerce ou produits en partie par l'éleveur.

La fertilisation des parcelles dévolues à ces productions végétales répond aux besoins propres de chaque catégorie de plante cultivée (épandage lors de la préparation du sol avant les semis, épandage aux phases clés de la croissance des plants de blé ou de maïs) et aux contraintes réglementaires (épandage interdit sur légumineuses, sauf la luzerne). La diversité des pratiques conditionne la contamination des parties des plantes distribuées aux bovins ou utilisées pour la préparation de concentrés, notamment lorsque les produits récoltés sont souillés par la terre ou des poussières.

La bonne qualité de l'ensilage de maïs (pH, teneur en eau, etc.), qui peut constituer une part notable de l'alimentation des bovins en hiver, est importante pour prévenir le risque de germination des spores et la production de toxine. Les conditions de stockage des végétaux sont également essentielles (aération suffisante des betteraves fourragères, fréquemment souillées par de la terre, par exemple).

La probabilité de contamination des bovins liée à la distribution des productions végétales issues d'une parcelle fertilisée avec des effluents contaminés se situe dans une fourchette large, estimée en fonction des végétaux inclus dans la ration des bovins. Cette probabilité est estimée à [1-3] après épandage des fertilisants enfouis ou injectés dans le sol s'ils sont d'origine aviaire et à [1-2] s'ils sont d'origine bovine. En cas d'épandage sans enfouissement, la fourchette est plus large et estimée à [1-7] après épandage des fertilisants d'origine aviaire et à [1-6] après épandage des fertilisants d'origine bovine.

Les probabilités les plus faibles sont atteintes en privilégiant des épandages avec enfouissement pendant le travail du sol et avant les semis ou l'implantation des cultures.

➤ Probabilité de contamination liée à l'exposition aux poussières ou aérosols émis durant l'épandage de produits fertilisants contaminés

Les bovins en stabulation semi-ouverte peuvent être exposés accidentellement aux poussières ou aérosols émis durant l'épandage des fertilisants organiques sur une parcelle, une prairie ou un champ cultivé situé à proximité.

Le risque d'exposition évoqué correspond à l'inhalation de formes végétatives et/ou sporulées véhiculées par ces poussières ou aérosols et celui du léchage des surfaces (ou consommation d'aliments) sur lesquelles se sont déposés ces poussières ou aérosols. A la suite de leur inhalation, les particules peuvent être dégluties et transiter dans le tube digestif qui constitue le point de départ d'une toxi-infection. **Les probabilités les plus élevées sont atteintes en cas d'épandage de fertilisants d'origine aviaire sans enfouissement immédiat.**

La probabilité de contamination des bovins se situe cependant dans une fourchette importante, en fonction de la distance qui les sépare du lieu d'épandage. Cette probabilité est estimée à [1-6] pour les composts et digestats et à [1-7] pour les fumiers, d'origine aviaire. Elle est estimée à [1-4] pour les composts et [1-5] pour les fumiers et digestats, d'origine bovine.

La probabilité de contamination peut être réduite en privilégiant les épandages avec enfouissement immédiat par temps calme et en informant les exploitants voisins sous le vent afin qu'ils évitent d'exposer leurs bovins le jour de l'épandage.

5.7.1.1.2 Bovins avec accès au pâturage

Le risque principal est l'épandage de fumier de volailles sur prairie pâturée ainsi qu'une contamination de l'environnement de la prairie en particulier les zones d'abreuvements naturels suite aux ruissellements après épandage d'effluents contaminés.

Aux risques de contamination évoqués pour les bovins en stabulation, s'ajoutent pour les bovins ayant accès au pâturage ceux en lien avec leur mise à l'herbe et leur accès aux eaux de surface potentiellement contaminées après épandage des effluents.

Le risque découle de l'ingestion par les bovins d'herbe contaminée, de terre (quantité ingérée évaluée en moyenne à 2 % de la MS ingérée) (Afssa 2009a) ou de fragments de cadavres de volailles ou d'oiseaux sauvages suite à l'épandage d'un fumier en contenant.

Le pire scénario est celui d'une prairie sur laquelle a été épandue en surface de la litière ou du fumier de volailles contenant des cadavres. Des fragments de cadavre peuvent être ingérés avec les litières dont les bovins sont très friands. Cette situation a été rapportée par Smart *et al.* (1987), qui en analysant deux cadavres ou parties de cadavres de volailles en décomposition, y ont détecté respectivement 250 et 25 000 MLD de toxine C par gramme de tissus. Ces concentrations permettent (pour une dose toxique estimée à 40 MLD/kg *per os*) le développement du botulisme chez des bovins de 600 kg ingérant 1 à 96 gramme de tissus de volaille (Smart *et al.* 1987).

Au-delà de ce premier scénario, l'épandage en surface de fumier de volailles, notamment lorsqu'il est contaminé par des *C. botulinum* de type mosaïque D/C ou D auxquels les bovins sont les plus sensibles, reste la pratique la plus à risque au regard d'une probabilité de contamination estimée à [8]. La probabilité de contamination a été évaluée dans une fourchette de [6-7] pour le compost de litières de volailles et [6-8] pour un digestat (cas ou l'intrant de

méthanisation contient une part importante de litières de volailles contaminées). L'enfouissement des effluents entraîne une réduction du risque (effet de dilution des effluents dans le sol), la probabilité de contamination descend à [4-6] pour les lisiers de canards ou de poules et à [3-6] pour les digestats.

Le risque de contamination après épandage de produits d'origine bovine est réduit par rapport aux précédents, avec une probabilité estimée dans des fourchettes de [2-6] (compost), [2-7] (digestats) et à [3-7] (fumier), sans enfouissement, et de [1-5] (digestat) à [2-6] (lisier), après enfouissement.

Le risque peut être réduit par des mesures de gestion adaptées. L'enfouissement doit être privilégié lorsqu'il est possible (cas avec des effluents liquides). Le risque élevé associé aux épandages en surface de produits d'origine aviaire, justifie (même à l'issue d'un stockage prolongé) de les proscrire, d'autant que des volailles peuvent être porteuses asymptomatiques pour certains types toxiques (cas chez les poulets avec les types mosaïque D/C ou D auxquels les bovins apparaissent très sensibles). En cas d'épandage, il est envisageable de suspendre la mise à l'herbe des bovins durant une période compatible avec une réduction du taux de contamination de la partie aérienne des plantes consommées par les animaux et une réduction de la contamination du sol en surface (infiltration des spores dans le sol). Cette durée est difficile à définir, de l'ordre de plusieurs mois (six mois dans l'étude de Smart *et al.* (1987) précédemment évoquée). Il faut aussi évoquer le risque de voir s'instaurer un cycle « sol-aliment-bovin » comme mentionné par Notermans *et al.* (1981) à la suite d'un épisode de botulisme de type B.

Le risque de développement de cas de botulisme dans le troupeau peut enfin être réduit par la vaccination des bovins (rappelons qu'elle est généralement mise en œuvre sur tous les bovins du troupeau sitôt le diagnostic de botulisme confirmé).

Pour les bovins au pâturage, la question se pose de leur accès à des étangs, mares ou fossés, dont les eaux, déjà souillées par la terre et les déjections, peuvent être contaminées par ruissellement à la suite de l'épandage d'effluents contenant *C. botulinum*. La probabilité de contamination des bovins s'élève à [3-7] après épandage des fertilisants d'origine bovine et à [6-8] après épandage des fertilisants d'origine aviaire.

La probabilité de contamination des bovins est plus faible [1-6] en cas de ruissellement dans un cours d'eau (dilution très importante), après épandage des fertilisants d'origine aviaire ou bovine.

Le respect de la réglementation (quantités épandues et périodes d'épandage des effluents d'élevage adaptées de manière à prévenir le ruissellement en dehors des parcelles d'épandage, respect des distances, par exemple en maintenant une zone enherbée d'au moins dix mètres sans intrants le long d'un cours d'eau) permet de réduire le risque. En cas de risque important, interdire l'accès (clôtures) des animaux aux points d'eau contaminés est la solution à privilégier.

5.7.1.2 Probabilité de contamination des volailles

Les modalités de contamination des volailles sont liées à leur mode d'élevage, avec ou sans parcours extérieur. Rappelons que l'accès à un parcours extérieur se développe et est obligatoire pour les élevages de volailles « Label Rouge », « Agriculture Biologiques » ou plus largement « plein air ».

5.7.1.2.1 Volailles en bâtiment

Le risque le plus élevé est lié à l'épandage de produits résiduels organiques, sans enfouissement, sur des cultures destinées à la production d'aliments pour les volailles dans le cas où une mauvaise conservation des végétaux contaminés est favorable à la germination des spores de *C. botulinum*.

- Probabilité de contamination liée à la distribution des aliments issus d'une parcelle fertilisée avec des effluents contaminés

Les associations céréales-protéagineux-oléagineux constituent la base de l'alimentation des volailles. L'apport de fibres est souvent représenté par de la luzerne déshydratée. Les céréales (notamment blé, triticale et maïs) constituent la fraction la plus importante dans les aliments des volailles, dont elles peuvent représenter jusqu'à 75 voire 80 %. Une partie peut être produite dans l'élevage, notamment en élevage biologique où l'équivalent de 20 % du tonnage annuel d'aliment consommé par les animaux doit être produit sur la ferme. Le reste est acquis auprès d'autres producteurs ou auprès de distributeurs.

Comme pour les bovins, la diversité des pratiques de fertilisation en fonction des types de végétaux conditionne la probabilité de l'émission du danger des parties des plantes utilisées pour la préparation des aliments des volailles, notamment lorsque les produits récoltés sont souillés par de la terre ou des poussières.

La probabilité de contamination qui en résulte se situe dans une fourchette large, estimée, en fonction de la probabilité d'émission par les végétaux inclus dans la ration, de [1] pour une fertilisation avec enfouissement, par un compost d'origine bovine, jusqu'à [6] pour une fertilisation sans enfouissement pour des fumiers ou lisiers de bovins et [7] pour des fumiers, fientes et lisiers de volailles⁷¹, sans enfouissement. Les probabilités les plus faibles sont attribuables à des productions de grains ou d'oléagineux (colza par exemple) non souillés par de la terre ou des poussières. Comme avec les bovins, les probabilités les plus faibles sont atteintes en privilégiant des épandages pendant le travail du sol ou avant les semis ou l'implantation des cultures, avec enfouissement immédiat.

La contamination par des spores de *C. botulinum* d'un des composants de la ration entraîne celle de l'aliment distribué aux volailles. Un degré d'humidité trop élevé et une aération trop faible durant le stockage peuvent favoriser la germination des spores contaminant les végétaux ou apportées par les poussières et les fientes d'oiseaux sauvages lorsque les cuves et silos de stockage à la ferme sont insuffisamment protégés.

5.7.1.2.2 Volailles avec parcours extérieur

Le risque principal est lié au transport par voie aérienne des particules produites lors d'épandages, sans enfouissement, des effluents contaminés sur des parcelles à proximité.

- Probabilité de contamination liée à l'épandage des effluents contaminés sur un parcours extérieur

⁷¹ À noter que l'épandage en surface d'un fumier et d'un lisier ou des fientes sèches de volailles n'ayant pas été stocké au moins 42 jours et 60 jours, respectivement est interdit. Par dérogation, ils peuvent néanmoins être appliqués dans les sols avec enfouissement à une profondeur de 10 à 15 cm, empêchant les oiseaux et autres animaux d'y avoir accès.

L'aménagement des parcours de volailles, tout en tenant compte des espèces élevées, doit de plus en plus répondre à des exigences environnementales et sociétales. Il s'agit, dans l'idéal, d'offrir aux volailles un parcours herbeux ou cultivé et arboré, dont le couvert végétal doit permettre de limiter la présence de sol nu tout en constituant un apport nutritionnel (implantation de graminées, de légumineuses comme le trèfle blanc et autres espèces végétales). L'aménagement et la gestion des parcours sont en outre encadrés par l'arrêté du 29/09/2021 précisant les mesures de biosécurité applicables dans les établissements détenant des volailles.

L'épandage n'est habituellement pas conseillé sur les parcours, déjà fertilisés par les fientes des volailles tout au long de la période d'élevage, et le stockage d'effluents de volailles y est interdit. En cas de besoin, lors de la mise en place d'un nouveau parcours ou lorsqu'il est nécessaire de reconstituer le couvert végétal durant le vide sanitaire entre deux bandes, il est conseillé de n'épandre que des effluents « assainis », en privilégiant un épandage avec enfouissement, ce qui est possible vis-à-vis de certains agents pathogènes (salmonelles) mais pas vis-à-vis de *C. botulinum*.

La probabilité de contamination est augmentée chez les volailles par leurs « activités d'exploration, de grattage et de picorage » qui les conduisent à ingérer quotidiennement, en sus des végétaux, insectes, lombrics, etc., jusqu'à 10 à 30 grammes de terre (Travel *et al.* 2012; Brachet 2015). Enfin, la sensibilité des volailles varie selon l'espèce en fonction du type toxinique, et la circulation de certains types dans l'effectif peut être silencieuse (par exemple le type mosaïque D/C pour les poulets de chair), avec le risque d'une expression clinique chez les bovins dans un élevage mixte où des bovins sont mis en pâture sur les parcours (valorisation de la production végétale) durant le vide sanitaire recommandé entre deux bandes.

La probabilité de contamination des volailles sur un parcours traité avec des fertilisants organiques issus d'élevages avicoles atteints de botulisme et épandus en surface, sans enfouissement, est estimée de [6-7] avec du compost à [8] avec du fumier. En cas d'enfouissement, elle varie de [3-6] avec du digestat à [4-6] avec du fumier. La probabilité de contamination à la suite d'un épandage de fertilisants organiques issus d'élevages bovins est évaluée de [2-6] à [3-7], respectivement pour des composts et des fumiers ou lisiers épandus en surface sans enfouissement, et de [1-5] à [2-6] respectivement, pour des digestats et des fumiers ou lisiers avec enfouissement.

➤ Probabilité de contamination liée à l'exposition aux poussières et aérosols lors d'épandage de produits fertilisants contaminés

Les volailles en extérieur peuvent être exposées accidentellement aux poussières et aux aérosols émis durant l'épandage de fertilisants organiques contaminés sur une parcelle (prairie ou champ cultivé) située à proximité. Ainsi, le botulisme peut être introduit lors du dépôt sur le parcours de poussières ou aérosols contaminés transportés par le vent, ou par des fientes d'oiseaux sauvages contaminés.

La probabilité de contamination des volailles dépend fortement de l'abondance des poussières ou aérosols contaminés et de leur charge en spores et cellules végétatives de *C. botulinum*. Elle a été estimée avec une fourchette large [1-7] selon l'origine et la catégorie du fertilisant épandu.

5.7.1.3 Probabilité de contamination d'autres espèces animales

L'analyse de risque a été limitée au rôle des oiseaux sauvages fréquentant les zones d'épandage, susceptibles de contaminer, par leurs fientes et éventuellement leur cadavre, les aliments et litières non protégées destinées aux animaux d'élevage. Eu égard aux mesures de biosécurité applicables en ce domaine, ce risque est considéré au plus comme extrêmement faible.

Le risque lié aux fuites éventuelles d'effluents agricoles contaminés vers les écosystèmes aquatiques naturels (entraînant un risque de contamination de la faune sauvage les fréquentant) n'a pas été étudié ici. Il est en principe limité par le respect de la réglementation ICPE relative au stockage des effluents et aux épandages.

Seules ont été abordées, en tant que source possible de contamination des espèces animales (petits carnivores, rongeurs et surtout les oiseaux sauvages) les fréquentant, les conséquences du stockage des fumiers au champ et surtout des épandages des fertilisants organiques issus d'élevages atteints de botulisme.

Peu d'études confortent la réalité d'un lien épidémiologique entre les épandages et la contamination de ces espèces. Dans le cas de l'avifaune sauvage, on peut citer néanmoins l'étude de Notermans *et al.* (1981), lesquels ont détecté *C. botulinum* dans les fientes d'oiseaux fréquentant des prairies contaminées à la suite d'un épisode de botulisme bovin de type B.

Les espèces animales contaminées (rongeurs et avifaune) peuvent intervenir par leur cadavre, éventuellement ramassé avec le fourrage destiné à la production d'enrubanné, d'ensilage ou de foin. Les oiseaux peuvent aussi intervenir en contaminant, par leurs fientes, des aliments et litières non protégés ou des parcours.

La probabilité de contamination de bovins ou de volailles dont les aliments ont été secondairement souillés par l'avifaune sauvage est estimée à [2-3] après épandage en surface de fumiers, fientes ou lisier issus d'un foyer de botulisme aviaire et à [1-2] après épandage en surface de fumiers ou lisier issus d'un foyer de botulisme bovin.

Différentes mesures de maîtrise sont susceptibles de réduire ce risque. À la suite d'un épandage, la probabilité de contamination des oiseaux sauvages (et des autres espèces potentiellement exposées) peut être réduite en injectant ou en enfouissant les fertilisants contaminés à une profondeur suffisante (au moins 10-15 cm) afin d'empêcher les oiseaux et autres animaux d'y avoir accès. La prévention passe aussi par la protection des silos et stocks d'aliments contre l'intrusion des espèces sauvages, notamment les oiseaux.

5.7.2 **Appréciation du risque en santé humaine**

Il existe plusieurs formes de botulisme selon le mode de contamination et d'exposition à la toxine. Les cas de botulisme humain résultent en grande majorité de l'ingestion de toxine préformée dans les aliments (botulisme alimentaire). Le botulisme par toxi-infection consécutive à l'ingestion de spores peut être observé (i) chez les nourrissons de moins de 12 mois (botulisme infantile) et (ii) chez des adultes (botulisme infectieux de l'adulte) présentant un déséquilibre du microbiote (par exemple à la suite d'une chirurgie digestive, d'une dépression immunitaire ou d'une antibiothérapie prolongée). Un botulisme d'inoculation résultant d'une contamination de plaies par des spores est également décrit (Anses 2021a). Le botulisme par inhalation de toxines est très rare. Les seuls cas décrits résultent de

contaminations accidentelles en laboratoire ou de l'utilisation intra-nasale de cocaïne contaminée. La nécessité que des toxines soient présentes en grande quantité au niveau des muqueuses nasales rend très improbable un botulisme par inhalation. Les conditions d'anaérobiose nécessaires à la germination des spores et à la production de toxine ne sont pas présentes au niveau des voies respiratoires supérieures et inférieures. À la suite d'inhalation de spores, il peut y avoir remontée mucociliaire de spores qui peuvent être ensuite dégluties. Seuls le botulisme infantile et le botulisme infectieux de l'adulte pourraient être causés par ce mécanisme (Anses 2021b, 2022).

Les cas de botulisme humain liés aux types C, D, mosaïques C/D, D/C sont rarissimes comparativement à ceux de types A, B, E et F. L'analyse critique des publications sur les cas humains réalisée par le GT « groupe socle botulisme » a permis d'identifier au niveau international, entre 1950 et 2006, un foyer suspecté de botulisme D et deux foyers confirmés de botulisme C (cinq cas) (Anses 2021a). La faible sensibilité de l'être humain à ces toxines (faible absorption intestinale) est l'hypothèse privilégiée par le GT.

Seront abordés dans ce chapitre, les probabilités de contamination des humains exposés aux poussières ou aérosols émis lors des épandages de fertilisants organiques d'origine avicole ou bovine issus d'élevages atteints de botulisme ainsi que les probabilités de contamination alimentaire consécutive à l'ingestion de végétaux produits sur les parcelles correspondantes. Le risque final est discuté en fin de chapitre.

- Probabilité de contamination des humains exposés à des poussières ou aérosols lors d'épandage de produits fertilisants contaminés

Le risque est lié à l'inhalation des poussières et des aérosols contaminés avec une possibilité d'ingestion des particules, mais ce risque reste très limité en raison de la voie de contamination et de la faible sensibilité de l'être humain aux *C. botulinum* de types C, D et mosaïque C/D.

Les humains exposés aux poussières ou aérosols émis durant l'épandage des fertilisants organiques sont les exploitants réalisant des épandages (exposition professionnelle) et les riverains (exposition accidentelle).

L'exposition évoquée est celle de l'inhalation de formes végétatives et/ou sporulées véhiculées par ces poussières ou aérosols dont la taille conditionne le degré de pénétration dans les voies respiratoires. Les experts du GT considèrent que la présence de BoNT dans les poussières ou les aérosols est peu probable. Le risque retenu est celui consécutif à l'inhalation de particules trop volumineuses pour pénétrer dans l'arbre respiratoire, mais qui une fois dégluties transitent dans le tube digestif, avec comme principale conséquence théorique une toxi-infection botulique (botulisme infantile ou botulisme infectieux de l'adulte).

La probabilité de contamination telle qu'estimée se situe dans une large fourchette qui reflète la variabilité de l'émission liée à la prise en compte de nombreux facteurs à savoir : la catégorie d'effluent, la charge en agents pathogènes, le taux d'humidité et l'état de pulvéulence, les modalités d'épandage (avec ou sans enfouissement), le type de matériel d'épandage utilisé et la force du vent au moment de l'épandage. Dans le cas de fertilisants d'origine bovine, elle varie de [1-4] pour les composts à [1-5] pour les fumiers, les lisiers et les digestats. Dans le cas de fertilisants d'origine aviaire, qui sont plus favorables à l'émission de poussières ou aérosols et dont la charge en *C. botulinum* est plus forte, cette probabilité varie de [1-6] pour les digestats et les composts à [1-7] pour les fumiers et fientes sèches. Les probabilités les plus élevées correspondent à des épandages de produits pulvérulents déposés en surface par temps venteux.

Le fait de privilégier certains équipements comme les cabines de tracteurs, les rampes munies d'injecteurs ou de sabots, la rampe d'épandage équipée de tapis caoutchoutés pour plaquer le produit au sol et les jupes en toile pour les épandeurs à disque, contribue à réduire ces probabilités. Rappelons en outre que dans le cas d'un épandage sur sol nu, l'exploitant doit procéder à un enfouissement 12 à 24 heures après épandage suivant les produits, sauf pour le compost. Mais **dans tous les cas, un épandage par injection ou avec enfouissement immédiat est à privilégier.**

S'agissant des professionnels au moment de l'épandage, la probabilité de contamination peut être abaissée en réduisant l'exposition par le port de masques anti-poussières dès le début du travail.

S'agissant des riverains, il faut tenir compte de la réglementation existante imposant des distances minimales à respecter par rapport aux tiers, c'est-à-dire, aux habitations principales ou secondaires, aux locaux recevant habituellement des tiers, aux zones de loisirs et aux campings (RSD, réglementation ICPE). Ces distances varient de 10 m minimum pour les composts à 100 m pour les effluents liquides épandus avec un matériel à palette ou à buse (cf. Tableau 2). Les distances d'épandage dans le cas des fumiers et fientes de volailles sont de 50 m minimum avec obligation d'enfouissement dans les 12 heures. Dans certains travaux sur les risques d'exposition à *C. botulinum*, ces distances sont néanmoins jugées insuffisantes (Kabelitz *et al.* 2020; Kabelitz *et al.* 2021) (cf. paragraphe 3.4.4.3). **Les distances et conditions précédemment proposées pour réduire le risque de contamination des animaux d'élevage s'appliquent donc ici.**

- *Probabilité de contamination des consommateurs de produits crus issus des parcelles où ont été épandus des produits fertilisants contaminés*

Le risque lié à l'épandage des produits fertilisants contaminés sur des cultures légumières est essentiellement celui d'un botulisme alimentaire consécutif à la consommation de conserves de produits végétaux en cas de défaut de maîtrise de la stérilisation (par exemple dans le cas de conserves de production familiale ou artisanale).

Le recours à des fertilisants organiques issus d'élevages contaminés sur des sols voués à des cultures légumières ou céréalières destinées à l'alimentation humaine, soulève la question du risque alimentaire consécutif au transfert de formes sporulées et/ou végétatives de *C. botulinum* sur les parties consommables des végétaux produits. Comme précédemment indiqué, la possibilité d'une internalisation n'étant pas retenue dans le cas de *C. botulinum*, la probabilité d'émission prend essentiellement en compte la contamination de surface des parties aériennes des légumes feuilles ou légumes fruits ou des parties en contact avec la terre (tubercules, racines, bulbes).

En tenant compte des pratiques de fertilisation (réalisée généralement lors de la préparation du sol et avant les semis et privilégiant un épandage par injection ou avec enfouissement immédiat) et des modalités de transformation qui réduisent la probabilité d'émission des produits issus des grandes cultures (cultures céréalières, oléagineux, betteraves sucrières, etc.), la probabilité de contamination apparaît comme nulle (0 sur une échelle de 0 à 9).

Dans le cas des cultures légumières, et notamment maraîchères, les conditions de fertilisation (enfouissement, apport des fertilisants avant semis, pas d'apport sur légumes feuilles ou légumes fruits dans les semaines précédant la récolte) et les modalités de préparation des produits avant consommation (lavages), font que la probabilité de contamination est évaluée à [1-4] pour des fertilisants d'origine aviaire. Pour les fertilisants d'origine bovine, cette

probabilité varie de [1] pour le compost après enfouissement à [1-4] pour les produits de méthanisation sans enfouissement.

Le risque final évoqué ici pour les cultures légumières est surtout celui d'un botulisme alimentaire consécutif à la consommation de produits végétaux frais, notamment lorsqu'ils sont consommés crus. Leur conservation (réfrigération notamment) n'est pas propice à la germination des spores éventuellement présentes et à la production de toxines incriminées dans cette forme de botulisme (ingestion de toxines préformées). La germination des spores, la croissance des bactéries et la production de toxines peut en revanche survenir en cas de non-respect des barèmes de stérilisation, de fermentations lactiques insuffisamment acides (au niveau du pH final et de la vitesse d'acidification) ou lorsque les végétaux sont inclus dans des préparations insuffisamment chauffées et/ou non réfrigérées.

Pour conclure, qu'il s'agisse de personnes exposées à des poussières ou aérosols ou des consommateurs exposés à des préparations culinaires contenant des végétaux, le risque de botulisme de type C, D, mosaïques C/D ou D/C doit être relativisé du fait de la faible sensibilité de l'être humain à ces neurotoxines.

5.7.3 Incertitudes

L'évaluation qualitative de risque lié à l'épandage des effluents issus d'un foyer de botulisme bovin/aviaire est conduite sur la base des données bibliographiques disponibles et sur l'avis des experts du GT. Il convient d'attirer l'attention du demandeur sur les incertitudes liées à cette évaluation.

Ainsi, l'appréciation de la probabilité d'émission est caractérisée par une incertitude qualifiée de « Faible » à « Élevée » en fonction du type d'effluents et des matrices. Les incertitudes sont liées notamment au manque de données quantitatives sur le degré de contamination des effluents (litière, fumier, lisier, eaux résiduaires) par *C. botulinum* et sa persistance dans les différentes matrices concernées (végétaux, poussières et aérosols, eaux de surface). Par ailleurs, la diversité des procédés de méthanisation et des produits issus de cette filière, rend complexe l'estimation de la probabilité d'émission (cf. Tableaux 7, 8 et 11).

De plus, l'appréciation de la probabilité d'exposition est limitée par le manque de données sur les doses infectantes et la forme de contamination (spores, cellules végétatives, toxine) vis-à-vis des bovins, des volailles ou de l'être humain.

Il est donc difficile de relier l'épandage d'effluents contaminés par *C. botulinum* et l'émergence des foyers de botulisme.

6 Réponses aux questions de la saisine

6.1 Question 1 : actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum*, ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols.

Dans cette partie sont résumés les données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum* et l'appréciation de leur efficacité. L'actualisation des données sur la résistance et la persistance de *C. botulinum* de type C, D et mosaïques C/D et D/C dans différentes matrices, notamment les effluents des élevages contaminés et les sols agricoles, est présentée dans la partie 3 du rapport.

Compte tenu (i) des méthodes analytiques disponibles, (ii) de l'absence de données quantitatives sur les niveaux de concentrations en formes végétatives ou sporulées de *C. botulinum* de type C, D et mosaïques C/D et D/C ou en toxine botulique dans les matrices étudiées; (iii) et l'absence de données sur la dose infectieuse pour induire le botulisme chez l'être humain et les espèces animales sensibles, le GT a retenu comme assainissant tout traitement de décontamination ayant la capacité de réduire à un niveau non détectable la présence de *C. botulinum* et de leurs toxines, sur les supports ou dans les matrices considérées. L'élimination des spores est, à cet égard, l'objectif nécessitant les traitements les plus drastiques.

Trois groupes de situations ont été analysés par le GT : i) la décontamination des supports inertes représentés par les structures et les matériels d'élevage, ii) la décontamination des produits organiques, notamment des effluents d'élevage (litières, fumiers, lisiers, eaux résiduaires) et des aliments contaminés, iii) la décontamination dans certains environnements comme les parcours, prairies naturelles et surfaces cultivées.

➤ Décontamination des supports inertes représentés par les structures et les matériels d'élevage

Les procédures de décontamination des locaux d'élevage, de leurs équipements et du matériel (notamment lorsqu'il a été utilisé pour le transport et la manutention d'effluents contaminés) ne diffèrent pas fondamentalement des opérations de nettoyage-désinfection habituellement mises en œuvre dans la gestion des foyers infectieux en élevage. Elles doivent cependant être adaptées aux caractéristiques de *C. botulinum*, notamment à la résistance des spores botuliques et à leur capacité à persister dans de multiples sites, y compris les plus difficilement accessibles (par exemple les circuits de ventilation en élevage avicole). Pour une efficacité optimale, elles impliquent le choix d'un désinfectant dont l'activité sporicide est validée dans le contexte d'une utilisation en élevage, la réalisation de deux opérations de désinfection successives après nettoyage, et des contrôles d'efficacité montrant la disparition de la bactérie dans les locaux et sur le matériel. Plusieurs biocides (aldéhydes, dérivés halogénés, produits oxydants et bases) sont reconnus comme ayant une activité sporicide. Les substances actives citées n'ont toutefois pas toutes été validées selon les normes en vigueur pour cette activité (cas de la chaux), et actuellement aucun produit disposant d'une AMM pérenne ou dont le dossier d'AMM est en cours d'évaluation ne revendique une activité sporicide dans le domaine vétérinaire (TP3). A cet égard, le GT souligne que des incertitudes fortes demeurent quant à la disponibilité de produits sporicides utilisables pour la désinfection dans les élevages atteints de botulisme.

➤ Décontamination des effluents d'élevage

La décontamination des effluents des élevages atteints de botulisme est, en revanche, plus problématique. Le GT a précédemment indiqué qu'un stockage prolongé des effluents contaminés (études réalisées sur du fumier de volailles) ne permettait pas d'envisager un assainissement naturel vis-à-vis de *C. botulinum*.

Il est difficile, par ailleurs, en raison des grands volumes à traiter et de leur charge très élevée en matières organiques (qui réduit ou neutralise l'activité biocide de la plupart des produits désinfectants) d'envisager leur traitement par un agent chimique. Le seul actuellement préconisable, du fait de sa biodégradabilité et de la possibilité de l'épandre sur certains terrains agricoles, est la chaux (chaux vive ou chaux éteinte). Les données d'efficacité de la chaux appliquée à la décontamination des effluents contaminés seront présentées plus loin dans la réponse à la 2^{ème} question du demandeur.

Le GT a également analysé les données disponibles sur une éventuelle efficacité du compostage vis-à-vis de *C. botulinum*. Le compostage est un processus biologique de décomposition et de transformation « contrôlé » en milieu aérobie (obtenu par aération ou ventilation forcée) des matières organiques biodégradables permettant d'obtenir un produit organique stabilisé, le compost. Le compostage est reconnu pour présenter, en outre, un effet hygiénisant vis-à-vis de certains agents pathogènes, dû principalement à l'élévation thermique au-dessus de 55°C (jusqu'à 71-72°C, voire 80°C) qui résulte de l'action des micro-organismes aérobies thermophiles sélectionnés durant ce processus. Le compostage classiquement réalisé pour la valorisation du fumier dans les exploitations d'élevage, correspond en général au compostage au champ après mise en andains. Il est admis (règlement ICPE) qu'une hygiénisation « correcte » du compost implique une aération suffisante, obtenue par deux retournements successifs au minimum ou par aération forcée avec contrôle de la température des andains qui doit être supérieure à 55 °C pendant quinze jours ou à 50 °C pendant six semaines. Il n'existe, à la connaissance du GT, aucune donnée relative à l'évolution de ce micro-organisme au cours du processus de compostage, sinon des données ponctuelles indiquant la détection de spores dans certains composts. Par ailleurs, des recherches montrant la persistance d'autres bactéries sporulées (telles que *Clostridioides difficile*) suggèrent fortement que le processus de compostage ne permet pas d'éliminer les spores botuliques.

Les digestats de méthanisation agricole constituent une source de matière organique disponible pour la fertilisation en agriculture. Ils sont produits à la suite de la conversion en biogaz de divers substrats organiques, dont une part importante est constituée d'effluents d'élevages (fumiers, lisiers). La production de biogaz résulte d'un processus de digestion anaérobie, au cours duquel la matière organique est dégradée par des micro-organismes en milieu anaérobie dans des digesteurs thermorégulés. Les installations peuvent traiter les effluents de plusieurs élevages, ce qui aboutit à une dilution des effluents éventuellement contaminés. Il existe une diversité importante des systèmes de conversion en biogaz (voie sèche ou humide, en conditions psychrophile, mésophile ou thermophile), mais ils fonctionnent majoritairement en France en conditions mésophiles (entre 34 et 42°C). Hors intervention possible d'autres facteurs biotiques (compétitions bactériennes) ou abiotiques (pH) dont les effets sur *C. botulinum* ne sont pas caractérisés, les conditions anaérobies et de température (du moins en conditions mésophiles) dans les digesteurs ne semblent pas défavorables à la persistance de la bactérie et de ses toxines. Les quelques études disponibles comparant la présence de *C. botulinum* dans les intrants et en sortie dans les digestats n'ont pas montré un effet assainissant vis-à-vis de cette bactérie et notamment de ses spores.

➤ Décontamination dans l'environnement

Les possibilités de traitement des abords enherbés des bâtiments d'élevage et des parcours en plein air pour les volailles sont quasiment limitées à l'application de chaux vive avant de retourner la terre par labourage, mais aucune étude n'a été conduite jusqu'ici pour en valider son efficacité sur les spores botuliques dont leur devenir après enfouissement dans la terre.

Dans le cas des prairies et des terrains cultivés, aucun procédé ne permet d'éliminer les spores introduites en surface ou dans la terre à la suite de l'épandage d'un effluent contaminé. Le risque de botulisme doit alors être analysé en fonction des végétaux produits (végétaux consommés ou non), des espèces amenées à les consommer (humains ou animaux) et des modalités de consommation. Le GT préconise de privilégier les procédés de conservation ou de transformation limitant le risque de développement de la bactérie et de production de toxine. Si l'épandage est nécessaire, le GT préconise de le limiter à des parcelles vouées à des productions à faible risque et d'imposer ou privilégier un épandage par injection ou avec enfouissement rapide en amont des semis et plantations.

6.2 Question 2 : le traitement du fumier et de la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ?

La chaux vive (oxyde de calcium) et la chaux éteinte (hydroxyde de calcium) agissent en augmentant l'alcalinité du milieu traité avec la possibilité d'atteindre un pH supérieur à 12. La chaux vive se transforme en chaux éteinte au contact de l'eau en provoquant une réaction exothermique se manifestant par une élévation de température de 45 jusqu'à 100°C. L'action synergique obtenue (pH > 12 et température élevée) contribue à renforcer l'action sporicide.

La chaux est largement préconisée en élevage pour le traitement des litières, des sols des bâtiments d'élevage en terre battue, ainsi que des fumiers, voire lisiers, eaux résiduaires.

Mais si son activité sporicide est reconnue dans la littérature, cette activité n'est pas revendiquée par les producteurs de chaux dans les dossiers d'AMM pérennes. En outre, il n'existe que très peu de données publiées sur l'efficacité de la chaux vis-à-vis des spores de *C. botulinum* lorsqu'elle est utilisée sur le terrain.

S'agissant du fumier et des litières usagées, la méthode la plus utilisée en pratique sur le terrain dans le cadre de la gestion du botulisme consiste à obtenir une combustion progressive du fumier et de la litière usagée par mélange par strates avec de la chaux vive selon la méthode du « mille-feuilles » (Balloy et al, 2009). Il s'agit d'un procédé délicat à mettre en œuvre par les risques d'incendie qu'il génère. Ce traitement contribue à réduire le volume de l'effluent contaminé et la quantité de cellules de *C. botulinum* présentes. En revanche les contrôles réalisés par le LNR montrent que l'utilisation de la chaux vive s'avère insuffisante pour éliminer totalement *C. botulinum* dont le gène codant la toxine botulique est encore détectable dans les résidus de fumier qui n'ont pas été incinérés (Souillard *et al.* 2020).

6.3 Question 3 : la conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C/1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ?

Conformément au règlement n°1069/2009/CE, des exigences minimales s'appliquent pour la conversion des lisiers en compost ou en biogaz. Elles correspondent à l'étape dite de « pasteurisation/hygiénisation », définie dans le règlement n°142/2011/CE, qui doit précéder la digestion anaérobie, dans le cas d'une usine de production de biogaz, et qui intervient au cours du processus de compostage dans le cas d'une usine de compostage. À cet égard, ces établissements doivent garantir le maintien d'une température minimale de 70°C de toutes les matières pendant au moins 60 minutes. Les composts et digestats soumis à ces paramètres de conversion sont des produits dérivés transformés.

Le GT rappelle que le compostage et la digestion anaérobie ne permettent pas d'inactiver les spores de *C. botulinum*. Il convient donc ici d'évaluer l'apport d'une étape de « pasteurisation/hygiénisation » sur le devenir de *C. botulinum* au cours de ces opérations.

S'agissant du compostage, le respect du couple température / temps prévu, c'est-à-dire une température minimale de 70°C de toutes les matières avec durée minimale de 60 minutes, implique qu'il soit effectué dans des établissements disposant d'un équipement spécifique de suivi en continu et d'enregistrement des températures, et idéalement dans un réacteur de compostage. Le respect du couple température / temps prévu apparaît plus favorable à l'élimination de la toxine préformée et des formes végétatives de *C. botulinum* présentes dans la litière ou le fumier compostés qu'à celle des spores. Ainsi, les quelques études et observations de terrain suggèrent que le respect du couple prévu température/temps ne permet pas de garantir une inactivation totale des spores éventuellement présentes ni un abattement significatif de leur nombre.

S'agissant de la méthanisation, la mise en œuvre du prétraitement des intrants par chauffage à 70°C durant 1 heure implique de disposer d'un équipement de pasteurisation en amont du digesteur anaérobie, ce qui est rarement le cas dans les installations traitant les effluents d'élevage. S'appuyant sur les estimations des temps de réduction décimale (D) en milieu aqueux de *C. botulinum* du groupe III effectuées à partir de données publiées par Segner et Schmidt (1971), le GT a conclu que l'étape de pasteurisation proposée ne permettait pas l'inactivation des formes sporulées éventuellement présentes ($D_{70^{\circ}\text{C}} > 12\text{h}$), ce qui va dans le sens des observations conduites sur d'autres bactéries sporulées. Cette étape permet, en revanche, l'inactivation des formes végétatives. Le GT s'interroge néanmoins sur l'effet du choc thermique sur l'activation des spores et la possibilité, à démontrer toutefois, d'une éventuelle germination suivie d'une multiplication des formes végétatives lors du refroidissement précédant l'entrée de l'effluent dans le digesteur.

6.4 Question 4 : quels risques en santé publique et en santé animale lors d'épandage de fertilisants organiques contaminés ?

Dans l'hypothèse de matière non assainie,

- « L'épandage des eaux résiduaires voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-elles ? »
- « Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »
- « Lors de l'épandage du fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

Pour répondre à ces questions, le GT a adopté une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale décrite par l'Afssa en 2008. Cette méthode comporte plusieurs phases définies sur la base d'un schéma événementiel (Figure 3) identifiant les diverses étapes du cheminement du danger, représenté par les *C. botulinum* du groupe III et leurs toxines, depuis les effluents d'élevage issus d'un élevage bovin ou aviaire atteint de botulisme jusqu'aux cibles potentiels, animaux ou humains. En conjuguant des apports de la littérature scientifique (lorsqu'ils existaient) et les acquis de leur expérience, les experts ont collectivement procédé, pour chaque situation envisagée, à une estimation des probabilités qualitatives de l'émission du danger et d'exposition au danger. Les probabilités sont notées dans une échelle de [0] à [9], correspondant aux qualificatifs « nul » à « très élevé » (Tableau 5).

Avant de répondre aux questions posées, le GT rappelle, en termes d'émission, l'importance des fumiers, fientes ou lisiers (bruts ou après stockage prolongé sans traitement) issus des foyers de botulisme aviaire (probabilité d'émission évaluée à [9]). Ils induisent, en particulier en cas d'épandage sans enfouissement, les risques les plus élevés, notamment en santé animale. La teneur plus faible en eau des fumiers d'origine aviaire est en outre plus propice à l'émission de poussières que les fumiers d'origine bovine lorsqu'ils sont stockés en tas sans être bâchés ou épandus. La probabilité d'émission des fumiers ou lisiers issus des foyers de botulisme bovins est moins importante ; elle est évaluée à [4-8]. Les eaux résiduaires, notamment celles qui sont récupérées lors des opérations de nettoyage-désinfection sont caractérisées par une charge bactérienne plus faible en raison de la dilution par apport d'eau pour le lavage. La probabilité d'émission des eaux résiduaires est évaluée à [6-8] en foyer de botulisme aviaire, et à [2-6] en foyer bovin. Ces eaux, souvent mélangées avec d'autres effluents tels que les purins et lisiers, sont généralement épandues en même temps sans différenciation. Elles peuvent être aussi collectées dans une installation de stockage temporaire et épandues seules, sans que cela change d'une façon significative la probabilité d'émission. La probabilité d'émission des composts et digestats issus de la transformation des effluents avicoles ou bovins est aussi considérée légèrement inférieure à celle des fumiers et lisiers, par effet de dilution de la charge bactérienne lorsqu'ils sont mélangés avec des déchets végétaux ou d'autres effluents non contaminés. La probabilité d'émission peut être considérée comme similaire pour ces deux types de produits.

« L'épandage des eaux résiduaires voire lisiers (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux notamment un risque inter-espèces ? Des recommandations notamment sur les distances avec les élevages et l'épandage par injection suffisent-ils ? »

L'épandage des effluents (y compris les eaux résiduaires contaminées) issus d'un foyer de botulisme aviaire ou bovin de type C, D, mosaïques C/D ou D/C, ainsi que des composts ou des digestats qui en dérivent, peut présenter un risque au regard de la santé des espèces animales sensibles. Différents paramètres agissent néanmoins sur ce risque, notamment la charge microbienne, plus élevée dans les fertilisants d'origine aviaire, et le type toxinique. En effet, certaines volailles, comme les poulets, sont peu ou pas sensibles aux types mosaïque D/C et D alors que les bovins y sont très sensibles.

➤ Risque de contamination d'un élevage de bovins

Le risque le plus important concerne les élevages bovins exposés à des contaminations induites par l'épandage de fertilisants organiques d'origine aviaire. Le GT rappelle la situation assez fréquente où l'apparition de cas de botulisme dans un élevage bovin permet de révéler la circulation de *C. botulinum* de type mosaïque D/C, en l'absence d'atteinte clinique, dans un élevage avicole. Le risque apparaît plus faible en cas d'exposition des bovins consécutive à l'épandage d'effluents contaminés issus de foyers de botulisme bovin et, d'ailleurs, cette situation semble rarement observée sur le terrain.

Bien qu'elle soit amenée à décroître au cours du temps, la probabilité de contamination la plus forte [8] est celle résultant de la mise à l'herbe de bovins sur une pâture fertilisée avec de la litière ou du fumier de volaille, y compris dans le respect des mesures de biosécurité applicables dans les élevages de volailles, c'est-à-dire en respectant le délai de stockage de 42 jours avant épandage, d'autant que les bovins peuvent être attirés par les effluents de volailles. Cette probabilité est moins importante [3-7] avec le fumier de bovin. La probabilité de contamination est en outre réduite si l'épandage d'un fertilisant organique liquide a été effectué par injection directe dans le sol, par un système à disques ou à socs.

En deuxième rang, et malgré un éventail assez large des probabilités de contamination [1-7], on notera l'importance que peut revêtir l'exposition des bovins à des poussières ou aérosols émis à l'occasion des épandages sans enfouissement immédiat, des fertilisants d'origine aviaire. La probabilité de contamination peut s'élever à [7] avec les produits les plus pulvérulents lorsque les poussières ou aérosols poussés par le vent peuvent atteindre les sites où sont stationnés les bovins (aire d'exercice ouverte d'une stabulation ou pâturage). Le risque de contamination est en revanche évalué comme plus faible lors d'épandage de fertilisants d'origine bovine [1-5].

Se situent en troisième rang les fourrages enrubannés, ensilages d'herbe ou foin secs issus de végétaux récoltés sur des prairies permanentes ou temporaires fertilisées dans les conditions précédemment évoquées à propos des pâtures. Dans ce cas, la probabilité de contamination des bovins auxquels ils sont distribués est réduite à des valeurs comprises entre [1] et [4]. Cela suppose toutefois, en particulier pour l'enrubanné et l'ensilage d'herbe, des précautions à la récolte (absence de cadavres de petits animaux, éviter d'incorporer de la terre, ne pas piéger d'eau dans le fourrage, etc.) et lors de leur réalisation (acidification rapide, avec un pH final inférieur à 5). En cas d'enrubannage ou d'ensilage mal conduits, la probabilité de contamination des bovins nourris avec ces produits peut être importante, jusqu'à [8].

Enfin, les probabilités de contamination de bovins ayant consommé des végétaux (cultures fourragères, céréales, graines oléagineuses et protéagineuses) cultivés sur des terres où ont

été épandus des fertilisants organiques contaminés par des *C. botulinum* du groupe III, se situent dans une fourchette assez large [1-7]. Les probabilités les plus basses concernent les végétaux produits sur des terrains fertilisés par injection ou enfouissement avant implantation des semis, récoltés sans terre et dépoussiérés, et conservés dans de bonnes conditions (bonne aération, non exposés à la pluie).

➤ Risque de contamination d'un élevage de volailles

Le risque de contamination le plus important touche les volailles en extérieur, notamment lorsque le parcours est exposé aux poussières et aérosols émis lors d'un épandage à proximité et sous le vent. Une fertilisation des parcours herbeux ne se justifie pas en présence des volailles, mais peut être réalisée, dans le cadre d'une pratique culturale appropriée et dans le respect des exigences réglementaires, lors de leur conception ou leur remise en état à chaque rotation. Les probabilités de contamination se situent dans une fourchette assez large, pouvant atteindre [7] en cas d'exposition à des poussières et aérosols émis lors de l'épandage de fertilisants organiques issus de foyers de botulisme aviaire, voire [8] si le parcours a été fertilisé avec ces mêmes catégories de produits.

L'épandage des fertilisants organiques issus de foyers de botulisme aviaire ou bovin sur des cultures destinées à l'alimentation animale (céréales, graines oléagineuses et protéagineuses, luzerne, etc.) peut entraîner un risque de contamination des volailles (en claustration ou ayant accès à un parcours extérieur).

Nonobstant, les différences liées à leur sensibilité respective aux types toxiques, les risques de contamination des volailles sont équivalents à ceux présentés pour les bovins.

➤ Risque inter-espèces

Les conséquences d'épandages d'effluents issus de foyers de botulisme, quelle que soit leur nature (effluents frais, après stockage durant plusieurs mois dans les conditions réglementaires, après compostage ou après méthanisation), soulèvent la question de la dispersion des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C dans l'espace agricole et du risque de contamination inter-espèces.

Le risque principal est celui de la contamination croisée entre les élevages bovins et aviaires, et notamment dans les élevages mixtes bovins-aviaires. Dans les élevages mixtes, le respect de mesures de biosécurité destinées à séparer les deux activités d'élevage est essentiel (par exemple : pas de stockage de fumier de volaille en pâture, pas de mise en pâture des bovins sur les parcours de volailles, etc.).

De plus, les éleveurs de volailles ne disposent pas toujours de terrains permettant l'épandage de la totalité des fumiers, fientes sèches ou lisiers qu'ils produisent, et doivent alors rechercher des surfaces d'épandage extérieures à leur exploitation. Il est habituel de ne pas conseiller l'épandage de fumiers, fientes sèches ou lisiers de volailles sur des pâtures ou des prairies de fauche destinés aux bovins, et cela doit être proscrit si ces effluents sont reconnus contaminés par des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C. En outre, la conversion de ces effluents par compostage ou digestion anaérobie, sans effet assainissant vis-à-vis des spores de *C. botulinum*, ne diminue pas le risque encouru.

La question du risque lié à l'épandage de matières organiques issues de foyers bovins ne doit pas être sous-estimée, notamment lorsque l'éleveur, faute de surfaces cultivables suffisantes n'a d'autre choix que d'épandre le fumier ou le lisier sur ses prairies. Le respect des bonnes pratiques agricoles (relatives aux épandages, à la réalisation des ensilages, etc.) est indispensable. En cas de risque avéré, la pratique de la vaccination des bovins avec des

vaccins bivalents dirigés contre les toxines C et D est essentielle (Steinman *et al.* 2007; Krüger *et al.* 2013; Moreira *et al.* 2018).

L'épandage avec des fertilisants organiques contaminés par des *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C peut également permettre ou faciliter la contamination d'autres espèces, petits mammifères ou oiseaux sauvages, dont les cadavres ou les déjections peuvent être une source de contamination pour les animaux d'élevages.

➤ Recommandations sur les distances avec les élevages et l'épandage

L'épandage de fertilisants organiques issus de foyers de botulisme est propice à la propagation de poussières et aérosols, notamment lorsque le teneur de matières sèches est supérieur à 70 % (Kabelitz *et al.* 2021).

Outre les caractéristiques du fertilisant organique (Kabelitz *et al.* 2021), plusieurs paramètres interviennent dans la dissémination des poussières dont le mode d'épandage, avec ou sans incorporation dans le sol, la température, le taux d'humidité, les turbulences, la vitesse et la direction du vent au cours de l'épandage (Thiel *et al.* 2020; Kabelitz *et al.* 2021). Il s'avère donc très difficile de définir une distance à faible risque entre le site d'épandage et la position des espèces animales sensibles.

Les effluents de volailles sont particulièrement incriminés dans la dispersion des spores et formes végétatives de *C. botulinum*. Des cas de botulisme bovin sont décrits dans des élevages situés à plusieurs centaines de mètres des lieux d'épandage (Hogg *et al.* 2008). Une observation récente en France a montré le développement de la maladie chez des vaches dans une stabulation ouverte située à une distance de 150 à 250 mètres d'une zone d'épandage d'un fertilisant assez pulvérulent d'origine avicole. Le fertilisant, contenant *C. botulinum* de type mosaïque D/C à une concentration de l'ordre de 35 NPP par gramme a été épandu dans des conditions de grand vent avec dépôt visible de poussières sur les surfaces de la stabulation (Le Maréchal, communication personnelle, 2021).

Une distance supérieure à 400 m de la source d'émission des matières particulaires est conseillée pour minimiser le risque pour la santé publique et de contamination de l'environnement (Kabelitz *et al.* 2021).

L'incorporation immédiate du fertilisant dans le sol diminue (sans les supprimer) les émissions de poussières et aérosols et peut permettre de réduire d'un facteur de 10 à 100 la quantité de micro-organismes émise (Thiel *et al.* 2020). Il est alors suggéré de privilégier certains équipements pour ces épandages, comme par exemple l'utilisation de rampes munies d'injecteurs ou de sabots, l'utilisation de rampe d'épandage équipée de tapis caoutchoutés pour plaquer le produit au sol ou l'utilisation de jupes en toile pour les épandeurs à disque.

Le respect des bonnes pratiques d'épandage en tenant compte des conditions météorologiques (épandages aux périodes de temps calme) est également essentiel pour limiter le risque botulique.

« Les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ? »

Les humains exposés aux *C. botulinum* de type C, D, mosaïques C/D ou D/C (et leur toxine) présents dans les poussières et les aérosols émis durant l'épandage des fertilisants organiques sont d'abord les exploitants réalisant des épandages (exposition professionnelle), puis, en fonction des distances par rapport aux zones d'épandage et des conditions météorologiques, les riverains (exposition accidentelle). La voie de contamination est essentiellement liée aux possibilités d'inhalation, avec une probabilité de contamination de [1-

7], en fonction du type d'effluent. **Le risque de contamination des opérateurs exposés professionnellement est réduit par le port de vêtements de protection adaptée, et notamment de masques anti-poussières.** Le risque de contamination des riverains diminue avec la distance par rapport au site d'épandage, dans les mêmes conditions que celles précédemment décrites pour les animaux d'élevage. **À cet égard les distances minimales entre sites d'épandage et résidence des riverains imposées par la réglementation ICPE notamment pour réduire les nuisances consécutives à l'émission des odeurs (au plus 100 m pour les effluents liquides épandus avec un matériel à palette ou à bus) sont insuffisantes pour prévenir tout risque de contamination.**

Toutefois le risque de contamination des humains par *C. botulinum* du groupe III doit être relativisé en raison du mode d'exposition (exposition par inhalation et non par ingestion) et du fait de la très faible sensibilité des êtres humains aux neurotoxines C, D, mosaïques C/D et D/C. Ainsi, le risque de développement de la maladie reste très limité.

« Lors de l'épandage du fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ? »

La contamination des végétaux produits sur un sol où ont été épandus des fertilisants organiques ou contaminés par des poussières émises lors d'un épandage à proximité peut résulter, soit du dépôt de *C. botulinum* en surface de la plante, soit de son internalisation dans certaines parties de la plante. La possibilité d'une internalisation, déjà décrite avec certaines bactéries pathogènes, et bien qu'envisagée pour des *C. botulinum* du groupe III (Zeiller *et al.* 2015), reste à démontrer dans les conditions de terrain. Ainsi, les experts du GT ont considéré uniquement la probabilité de contamination en surface des parties consommées du végétal. C'est le cas des parties aériennes directement exposés au fertilisant en cas d'épandage sur la culture ou des parties racinaires, dont la rhizosphère peut constituer un environnement favorable à la persistance de certaines bactéries pathogènes. Leur contamination peut être aussi consécutive à la persistance de terre sur les bulbes et racines après déterrage ou, à la suite d'un fauchage trop ras par exemple, sur les feuilles. Une contamination en surface des végétaux par des poussières contenant l'agent pathogène lors de la récolte peut être aussi incriminée.

Le risque pour la consommation animale de ces végétaux a été précédemment présenté. Il est plus significatif, en élevage bovin, pour les fourrages produits sur des surfaces traitées avec des fertilisants issus d'élevages avicoles.

Les probabilités de contamination des consommateurs humains ont été estimées de [0] pour les produits issus de grandes cultures (cultures céréalières, oléagineux, betteraves sucrières, etc.) à [1-4] pour les productions maraîchères. Dans ce dernier cas, certaines conditions de fertilisation réduisent le risque de contamination, à savoir : **la préférence pour les composts, l'apport des fertilisants plusieurs mois avant semis avec enfouissement et l'absence d'apport sur légumes feuilles ou légumes fruits dans les semaines précédant la récolte, ainsi que les modalités de préparation des produits (lavages).** La probabilité de contamination la plus élevée concerne les conserves de végétaux en cas de défaut de maîtrise du procédé (par exemple dans le cas de productions familiales ou artisanales). En effet, la germination des spores, la croissance des bactéries et la production de toxines peuvent survenir en cas de non-respect des barèmes de stérilisation, de fermentations lactiques insuffisamment acides ou lorsque des végétaux sont inclus dans des préparations insuffisamment chauffées et/ou non réfrigérées. Malgré tout, comme précédemment indiqué,

la faible sensibilité des humains aux toxines de type C, D, mosaïques C/D ou D/C rend le risque de développement de la maladie très limité.

Au vu de ces éléments, le GT considère néanmoins que la faible sensibilité des humains aux *C. botulinum* du groupe III ne peut justifier l'épandage de fertilisants reconnus comme contaminés par ces agents pathogènes sur des cultures légumières, même si le risque de contamination inhérent à de telles pratiques s'avère assez faible.

7 Conclusions du groupe de travail

En France, les foyers de botulisme identifiés ces 20 dernières années dans les élevages bovins (une dizaine de foyers détectés chaque année) et aviaires (une trentaine de foyers par an) sont exclusivement causés par des *C. botulinum* du groupe III, correspondant aux types toxiques C, D et mosaïques C/D et D/C. Un problème important rencontré dans la gestion de ces foyers concerne les possibilités de décontamination et de leur efficacité, en particulier vis-à-vis des effluents (déjections et eaux résiduaires) d'élevage contaminés.

Le GT souligne que les conclusions rapportées ici s'appuient sur les données peu nombreuses de la littérature scientifique, le résultat des investigations menées, notamment par le LNR (en appui aux équipes intervenant sur le terrain, à la suite de la détection des foyers de botulisme) et, pour l'évaluation des risques en rapport avec les épandages des effluents contaminés, sur une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale (Afssa, 2008). L'interprétation des données est toutefois limitée par les difficultés, sources d'incertitudes, rencontrées pour la recherche de ces bactéries et leurs toxines dans les matrices environnementales, avec en plus, pour les *C. botulinum* du groupe III, y compris dans le cadre du diagnostic, l'absence de norme et consensus méthodologique pour leur détection et leur caractérisation. S'y ajoutent le fait que la plupart des données disponibles sont qualitatives et non quantitatives, ainsi que la méconnaissance des quantités de *C. botulinum* du groupe III et/ou de toxines devant être ingérées pour permettre le développement du botulisme, tant chez les animaux que chez les humains.

Les opérations de nettoyage-désinfection des locaux et matériels contaminés, si elles impliquent le choix d'un désinfectant dont l'activité sporicide est validée dans le contexte d'une utilisation en élevage, la réalisation de deux opérations de désinfection successives et des contrôles d'efficacité montrant la disparition de la bactérie, pourraient être assez bien maîtrisés. Le GT attire toutefois l'attention sur le fait qu'au moment de la rédaction du rapport, il n'y a pas de produit disposant d'une AMM pérenne qui revendique une activité sporicide dans le domaine vétérinaire (TP3), ce qui complique le choix des produits à utiliser pour la désinfection dans les élevages atteints de botulisme.

Le GT souligne que la question de la décontamination des effluents d'élevage (élimination des formes sporulées de *C. botulinum*) est encore plus problématique. En effet, les études disponibles montrent que ni un stockage prolongé, ni le compostage, ni la méthanisation (y compris lorsque les effluents sont soumis à l'étape d'hygiénisation/pasteurisation) ne permettent d'obtenir un assainissement complet des effluents d'élevage issus d'un foyer de botulisme animal.

Quant aux procédés chimiques, le seul pour lequel des données d'efficacité sont disponibles est le traitement à la chaux par la méthode du « mille-feuilles », préconisé notamment pour le fumier contaminé. Cette méthode permet de diminuer le volume de l'effluent traité par effet de combustion, diminuant ainsi indirectement la quantité de *C. botulinum* sans toutefois l'éliminer totalement. En cas d'épandage d'effluents contaminés pour la fertilisation des sols, il est donc nécessaire d'en évaluer le risque en découlant pour les animaux et les humains exposés, soit à la suite de l'ingestion de végétaux cultivés sur les zones d'épandage, soit après exposition à des poussières ou aérosols émis lors de ces épandages.

Il ressort d'abord, sans sous-estimer l'impact éventuel des effluents contaminés d'origine bovine, que les fumiers, fientes et lisiers issus des foyers de botulisme aviaire sont les effluents les plus à risques, par leur charge plus élevée en *C. botulinum*, et pour les effluents solides, par leur taux d'humidité plus faible et leur structure plus propice à l'émission de poussières et

aérosols. Il faut garder aussi à l'esprit que les bovins sont particulièrement sensibles à certains types toxiques, comme le type mosaïque D/C auxquels certaines volailles (*Gallus gallus* en particulier) sont peu ou pas sensibles, et de ce fait peuvent être révélateurs d'une circulation inapparente de *C. botulinum* dans un élevage avicole. Dans ce double contexte, les bovins en élevage mixte bovin-aviaire sont particulièrement exposés. Ainsi, afin de limiter le risque de contamination croisée, les experts soulignent l'importance d'un nettoyage et d'une désinfection systématiques des matériels utilisés dans le transport et la manipulation des effluents.

Les évaluations du GT indiquent une probabilité élevée de contamination des bovins mis à l'herbe sur une pâture fertilisée avec des produits organiques issus d'élevages avicoles contaminés, et également des bovins exposés aux poussières et aérosols émis lors d'épandages sans enfouissement immédiat ou injection de ces produits dans le sol. De ce fait, le risque de développement du botulisme chez ces animaux est important. Ce risque diminue lorsque les bovins sont alimentés avec des fourrages récoltés et conservés dans de bonnes conditions. En aviculture, les évaluations indiquent une probabilité élevée de contamination des volailles sur parcours, qu'elle résulte d'un apport sur les sols de fertilisants organiques contaminés ou d'une exposition à des poussières et aérosols véhiculant la bactérie. La probabilité de contamination liée à l'alimentation des animaux, bovins ou volailles par des végétaux issus des grandes cultures est la plus faible, en particulier : (i) si les fertilisants ont été épandus avec enfouissement avant réalisation des semis ou plantations, (ii) si les végétaux ont été récoltés en limitant l'apport de terre et (iii) en recherchant en particulier pour les productions à la ferme, des conditions de stockage des produits végétaux propres à réduire les risques de contamination secondaire (par l'avifaune notamment) et à limiter les possibilités de germination des spores botuliques éventuellement présentes.

La probabilité de contamination des humains peut être assez élevée pour des opérateurs et riverains exposés aux poussières et aérosols émis durant les épandages (en particulier s'il s'agit de fertilisants issus d'élevages avicoles contaminés). Par ailleurs, du fait des pratiques culturales, la probabilité de contamination est très faible pour les consommateurs de produits maraîchers crus cultivés sur des sols fertilisés avec des effluents d'animaux d'élevage contaminés par *C. botulinum*.

Le risque de développement du botulisme humain demeure très limité en raison de la faible sensibilité de l'être humain au *Clostridium* de type C, D et mosaïque C/D et leurs toxines, et de la faible possibilité de développement du botulisme par inhalation.

Toutefois, le GT considère que la faible sensibilité des humains aux *C. botulinum* du groupe III ne peut justifier l'épandage de fertilisants reconnus comme contaminés par ces agents pathogènes sur des cultures légumières.

8 Recommandations

En réponse aux questions de la saisine et en cas de foyer de botulisme, les experts du GT rappellent l'importance de respecter les exigences de la réglementation environnementale, et recommandent en particulier :

- de réaliser une décontamination renforcée des élevages foyers avec l'utilisation des produits adaptés ;
- de ne pas considérer les épandages comme un moyen d'élimination acceptable des effluents lorsque le risque lié à leur contamination par certains agents pathogènes ne peut être maîtrisé. En effet, les épandages des effluents d'élevage doivent être des actes réfléchis tenant compte de leur valeur fertilisante, du niveau de fertilité des sols et des besoins des cultures (qui diffèrent selon les végétaux et leur stade de croissance) ;
- si la solution de l'épandage des effluents issus du foyer de botulisme est retenue :
 - de choisir un matériel d'épandage adapté (pour réduire les émissions de poussières et aérosol), et de privilégier l'injection dans le sol ou l'enfouissement immédiat des effluents contaminés ;
 - de respecter des distances suffisantes (au moins 400 mètres pour les effluents d'origine avicole) par rapport aux pâtures et parcours fréquentés par les animaux d'élevage ou aux stabulations bovines ouvertes ainsi qu'aux habitations et zones d'activité humaines ;
 - de proscrire les épandages par vent fort ;
 - de privilégier les épandages sur des grandes cultures et d'en exclure les prairies (y compris si cela est possible les prairies de fauche) et les parcours ;
 - de ne pas épandre de fertilisants reconnus comme contaminés par *C. botulinum* sur des cultures légumières même si le risque pour l'être humain est très limité ;
- d'encourager la vaccination des bovins dans les élevages mixtes et dans toute situation où ils sont exposés.

À ces recommandations s'ajoute la nécessité du port de masque anti-poussières pour les opérateurs réalisant les épandages.

En complément de ces recommandations et avant de privilégier les solutions qui pourraient être disproportionnées et coûteuses telles que l'incinération ou une transformation par stérilisation sous pression prévues par le règlement n°1069/2009/CE, **il convient** :

- **de pallier le manque de données en favorisant les recherches afin de préciser les niveaux de contamination des différents types d'effluents issus d'élevages contaminés par les *C. botulinum* du groupe III et leurs toxines ;**
- **de mieux connaître le devenir de ces bactéries dans les sols agricoles à la suite des épandages (dans le sens des études actuellement menées dans le cadre du projet BOTUSOL) ;**
- **de définir des concentrations bactériennes maximales admissibles au-delà desquelles les épandages devraient être exclus ;**
- **de mieux étudier les méthodes de décontamination de ces effluents.**

Date de validation du rapport d'expertise collective par le groupe de travail : le 20 avril 2022 et par le CES « Santé et bien-être des animaux » (SABA) : le 10 mai 2022.

9 Bibliographie

- Aarnink, A.J.A. et H.H. Ellen. 2007. "Processes and factors affecting dust emissions from livestock production." Proceedings of DustConf 2007. How to Improve Air Quality, Maastricht, The Netherlands.
- ACMSF. 2020. *Subgroup on non-proteolytic Clostridium botulinum and vacuum and modified atmosphere packaged foods*. Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food, Final report.
- Afssa. 2002. *Rapport sur le botulisme d'origine aviaire et bovine*. (Maisons-Alfort), 82 p.
- Afssa. 2008. *Une méthode qualitative d'estimation du risque en santé animale*. 89 p.
- Afssa. 2009a. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la contamination de sols en dioxines et PCB de type dioxine et à l'utilisation possible de ces sols en lien avec d'éventuelles répercussions sur la qualité sanitaire de certains produits agricoles*. Saisine n° 2009-SA-0087. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/RCCP2009sa0087.pdf>, 15 p.
- Afssa. 2009b. *Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur un projet d'arrêté fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire*. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/SANT2008sa0334.pdf>, 9 p.
- Amass, S. F., D. Ragland et P. Spicer. 2001. "Evaluation of the efficacy of a peroxygen compound, Virkon (R) S, as a boot bath disinfectant." *Journal of Swine Health and Production* 9 (3): 121-123.
- Anderson, C., D.H. Malambo, M.E.G. Perez, H.N. Nobela, L. De Pooter, J. Spit, C.M. Hooijmans, J.V. De Vossenbergh, W. Greya, B. Thole, J.B. Van Lier et D. Brdjanovic. 2015. "Lactic Acid Fermentation, Urea and Lime Addition: Promising Faecal Sludge Sanitizing Methods for Emergency Sanitation." *International Journal of Environmental Research and Public Health* 12 (11): 13871-13885.
- André, S., I. Leguerinel, A. Palop, N. Desriac, S. Planchon et P. Mafart. 2019. "Convergence of Bigelow and Arrhenius models over a wide range of heating temperatures." *International Journal of Food Microbiology* 291: 173-180. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.019>.
- Andreev, N., M. Ronteltap, B. Boincean et P. N. L. Lens. 2017. "Treatment of Source-Separated Human Feces via Lactic Acid Fermentation Combined with Thermophilic Composting." *Compost Science & Utilization* 25 (4): 220-230. <https://doi.org/10.1080/1065657X.2016.1277809>.
- Anses. 2017. *Avis de l'Anses du 14/10/16 révisé le 08/03/17 relatif aux « procédés efficaces de désinfection des parcours en exploitations de volailles »*. (Maisons-Alfort), 25 p.
- Anses. 2020a. *Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments : "Clostridium botulinum, Clostridium neurotoxinogènes"*. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0074Fi.pdf>, 5 p.
- Anses. 2020b. *Identification et caractérisation des dangers microbiens liés aux matières premières d'origine végétale utilisées en alimentation animale*. Saisine 2015-SA-0191. Novembre 2019 révisé en mai 2020. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ALAN2015SA0191Ra.pdf>, 244 p.
- Anses. 2021a. *Clostridium botulinum : mise à jour des connaissances sur les différentes formes des types C, D, mosaïque C/D et D/C et E*. Saisines 2019-SA-0112 à 2019-SA-0115. (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2019SA0112Ra.pdf>, 170 p.
- Anses. 2021b. *Evaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits dans la filière bovine, lors de suspicion et de confirmation de cas de botulisme*. Saisine 2019-SA-0112. (Maisons-Alfort), 112 p.

- Anses. 2022. *Évaluation des risques en appui des mesures de gestion de produits et sous-produits animaux dans la filière avicole, lors de suspicion et de confirmation des cas de botulisme*. Saisine n°2019-SA-0114. (Maisons-Alfort), 101 p.
- Arnon, S.S., T.F. Midura, K. Damus, B. Thompson, R.M. Wood et J. Chin. 1979. "Honey and other environmental risk factors for infant botulism." *The Journal of Pediatrics* 93: 331-336. [https://doi.org/10.1016/S0022-3476\(79\)80863-X](https://doi.org/10.1016/S0022-3476(79)80863-X).
- Arnon, S.S., R. Schechter, T. V. Inglesby, D. A. Henderson, J. G. Bartlett, M. S. Ascher, E. Eitzen, A. D. Fine, J. Hauer, M. Layton, S. Lillibridge, M. T. Osterholm, T. O'Toole, G. Parker, T. M. Perl, P. K. Russell, D. L. Swerdlow, K. Tonat et Biodefense Working Group on Civilian. 2001. "Botulinum toxin as a biological weapon: medical and public health management." *JAMA* 285 (8): 1059-70. <https://doi.org/10.1001/jama.285.8.1059>.
- Aubert, C. 2007. "Le traitement des déchets de couvoir par compostage en mélange avec du fumier de volailles." Septièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours (France).
- Baccella, S., A.L. Botta, S. Manfroni, A. Trincherà, P. Imperiale, A. Benedetti, M. Del Gallo et A. Lepidi. 2002. "Use of actinobacteria in composting of sheep litter." Dans *Microbiology of Composting*, 505-516. : Springer.
- Bagge, E., M. Persson et K-E. Johansson. 2010. "Diversity of spore-forming bacteria in cattle manure, slaughterhouse waste and samples from biogas plants." *Journal of Applied Microbiology* 109 (5): 1549-1565. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04790.x>.
- Bagge, E., L. Sahlström et A. Albihn. 2005. "The effect of hygienic treatment on the microbial flora of biowaste at biogas plants." *Water research* 39 (20): 4879-86. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2005.03.016>.
- Balloy, D., C. Facon, X. Chatenet et J. Durand. 2009. "Botulisme aviaire, les constats de terrain." Huitièmes Journées de la Recherche Avicole (JRA), Saint Malo, 25 et 26 mars.
- Barash, J. R. et S. S. Arnon. 2014. "A novel strain of *Clostridium botulinum* that produces type B and type H botulinum toxin." *The Journal of infectious diseases* 209 (2): 183-91. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit449>.
- Barr, J. R., H. Moura, A. E. Boyer, A. R. Woolfitt, S. R. Kalb, A. Pavlopoulos, L. G. McWilliams, J. G. Schmidt, R. A. Martinez et D. L. Ashley. 2005. "Botulinum neurotoxin detection and differentiation by mass spectrometry." *Emerging infectious diseases* 11 (10): 1578-83. <https://doi.org/10.3201/eid1110.041279>.
- Bauza-Kaszewska, J., Z. Paluszak et K. Skowron. 2014. "Viability of *Clostridium sporogenes* spores after CaO hygienization of meat waste." *Annals of agricultural and environmental medicine* : AAEM 21 (3): 485-8. <https://doi.org/10.5604/12321966.1120588>.
- Bayle, S., A. Drapeau, J. Rocher, F. Laurent, V. Métayer, M. Haenni, J.Y. Madec et C. Valat. 2021. "Characterization of cultivable airborne bacteria and their antimicrobial resistance pattern in French milking parlour." *Environmental Science and Pollution Research* 28: 11689-11696. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-11974-8>.
- Béline, F., P. Dabert, P. Peu et R. Girault. 2010. "La méthanisation des effluents d'élevage en France et en Europe: principe, état des lieux et perspectives." *Fourrages* 203: 155-161.
- Bhardwaj, S. K., N. Bhardwaj, V. Kumar, D. Bhatt, A. Azzouz, J. Bhaumik, K-H. Kim et A. Deep. 2021. "Recent progress in nanomaterial-based sensing of airborne viral and bacterial pathogens." *Environment International* 146: 106183. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.106183>.
- Blinov, V., K. Volchek, C. Brown et E. Rohonczy. 2014. "Cold weather decontamination/disinfection methods and technologies." Proceedings of the Thirty-Seventh Arctic and Marine Oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar.

- Blondel, V., G. Huard, JP. Vaillancourt et M. Racicot. 2018. *Bases du nettoyage et de la désinfection dans les exploitations agricoles*. Ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation (Québec), 13 p.
- Böhnel, H. et K. Lube. 2000. "Clostridium botulinum and Bio-compost. A contribution to the analysis of potential health hazards caused by bio-waste recycling." *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 47 (10): 785-795. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1439-0450.2000.00426.x>.
- Boutant, J. et M. Mellal. 2020. "Suivi longitudinal d'un foyer de botulisme récurrent en dinde de chair : identification de la source et suivi de la persistance." Journée d'échanges sur le botulisme animal, 26 novembre 2020.
- Brachet, M. 2015. "Quels apports nutritionnels permis par le parcours ?" Dans *Alimentation des volailles en agriculture biologique (Cahier technique)*, édité par C. Bordeaux et A. Roinsard, 69 p. : ITAB, IBB, Chambres d'Agriculture, INRA, ITAVI.
- Braun, U., K. Feige, G. Schweizer et A. Pospischil. 2005. "Clinical findings and treatment of 30 cattle with botulism." *The Veterinary record* 156 (14): 438-41. <https://doi.org/10.1136/vr.156.14.438>.
- Brazier, J. S., B. I. Duerden, V. Hall, J. E. Salmon, J. Hood, M. M. Brett, Lauchlin J. Mc et R. C. George. 2002. "Isolation and identification of Clostridium spp. from infections associated with the injection of drugs: experiences of a microbiological investigation team." *Journal of medical microbiology* 51 (11): 985-989. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-51-11-985>.
- Brunt, J., A. H. M. van Vliet, F. van den Bos, A. Carter et M. W. Peck. 2016. "Diversity of the germination apparatus in Clostridium botulinum Groups I, II, III, and IV." *Frontiers in Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01702>.
- Brygoo, E. R. 1953. "[Resistance of botulins diluted in water]." *Annales de l'Institut Pasteur* 84 (6): 1039-40.
- Burrows, W. D. et S. E. Renner. 1999. "Biological warfare agents as threats to potable water." *Environmental Health Perspectives* 107 (12): 975-984.
- Cambra-López, M., A.J.A. Aarnink, Y. Zhao, S. Calvet et A. G. Torres. 2010. "Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem." *Environmental pollution* 158 (1): 1-17.
- Carlin, F. 2011. "Origin of bacterial spores contaminating foods." *Food Microbiology* 28 (2): 177-182. <https://doi.org/DOI: 10.1016/j.fm.2010.07.008>.
- Carlin, F., A. Braconnier, V. Broussolle et P. Fach. 2004. "How much Clostridium botulinum in foods?" Food Microbiology and sporulation of the genus Clostridium, Oslo, Norway.
- Chhetri, R. K., S. Di Gaetano, A. Turolla, M. Antonelli et H. R. Andersen. 2020. "Ecotoxicity Evaluation of Pure Peracetic Acid (PAA) after Eliminating Hydrogen Peroxide from Commercial PAA." *International journal of environmental research and public health* 17 (14). <https://doi.org/10.3390/ijerph17145031>.
- Connan, C., C. Deneve, C. Mazuet et M. R. Popoff. 2013. "Regulation of toxin synthesis in Clostridium botulinum and Clostridium tetani." *Toxicon* 75: 90-100. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.06.001>.
- Cruz-Morales, P., C. A. Orellana, G. Moutafis, G. Moonen, G. Rincon, L. K. Nielsen et E. Marcellin. 2019. "Revisiting the Evolution and Taxonomy of Clostridia, a Phylogenomic Update." *Genome Biology and Evolution* 11 (7): 2035-2044. <https://doi.org/10.1093/gbe/evz096>.
- Cunault, C. C., A.M. Pourcher et C. H. Burton. 2011. "Using temperature and time criteria to control the effectiveness of continuous thermal sanitation of piggery effluent in terms of set microbial indicators." *Journal of Applied Microbiology* 6: 1492-504.

- DasGupta, B. R. 2006. "Botulinum neurotoxins: perspective on their existence and as polyproteins harboring viral proteases." *The Journal of general and applied microbiology* 52 (1): 1-8. <https://doi.org/10.2323/jgam.52.1>.
- Derman, Y., H. Korkeala, E. Salo, T. Lonnqvist, H. Saxen et M. Lindstrom. 2014. "Infant botulism with prolonged faecal excretion of botulinum neurotoxin and *Clostridium botulinum* for 7 months." *Epidemiology and Infection* 142 (2): 335-9. <https://doi.org/10.1017/S0950268813001258>.
- Derongs, L., C. Druilhe, C. Le Maréchal, F. Barbut, L. Heurtevent, J. Buffet, L. Martin, C. Ziebal, T. Poezevara, S. Rouxel, E. Houard, R. Syed Zaidi, J. Couturier et A.M. Pourcher. 2021. "Influence of operating conditions on the persistence of *E. coli*, *enterococci*, *Clostridium perfringens* and *Clostridioides difficile* in semi-continuous mesophilic anaerobic reactors." *Waste Management* 134: 32-41. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2021.08.003>.
- Després, V. R., J. A. Huffman, S. M. Burrows, C. Hoose, A.S. Safatov, G. Buryak, J. Fröhlich-Nowoisky, W. Elbert, M.O. Andreae, U. Pöschl et R. Jaenicke. 2012. "Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review." *Tellus B: Chemical and Physical Meteorology* 64 (1). <https://doi.org/10.3402/tellusb.v64i0.15598>.
- Dharmasena, M., X. Jiang et E. G. Dudley. 2018. "Isolation of Toxigenic *Clostridium difficile* from Animal Manure and Composts Being Used as Biological Soil Amendments." *Applied and Environmental Microbiology* 84 (16): e00738-18. <https://doi.org/doi:10.1128/AEM.00738-18>.
- Diao, M. M., S. Andre et J. M. Membre. 2014. "Meta-analysis of D-values of proteolytic *Clostridium botulinum* and its surrogate strain *Clostridium sporogenes* PA 3679." *International Journal of Food Microbiology* 174: 23-30. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.029>.
- Dressler, D., K. Kollwe, T. H. C. Kruger, N. Gade, S. Sikorra et H. Bigalke. 2019. "Botulinum toxin type D blocks autonomic cholinergic synapses in humans: discussion of a potential therapeutic use." *Journal of Neural Transmission* 126 (10): 1337-1340. <https://doi.org/10.1007/s00702-019-02029-5>.
- Driehuis, F., J. M. Wilkinson, Y. Jiang, I. Ogunade et A. T. Adesogan. 2018. "Silage review: Animal and human health risks from silage." *Journal of dairy science* 101 (5): 4093-4110. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13836>.
- Dyer, C., L. P. Hutt, R. Burky et L. T. Joshi. 2019. "Biocide Resistance and Transmission of *Clostridium difficile* Spores Spiked onto Clinical Surfaces from an American Health Care Facility." *Applied and Environmental Microbiology* 85 (17). <https://doi.org/10.1128/AEM.01090-19>.
- Eklund, M. W., F. T. Poysky, J. A. Meyers et G. A. Pelroy. 1974. "Interspecies conversion of *Clostridium botulinum* type C to *Clostridium novyi* type A by bacteriophage." *Science* 186 (4162): 456-8. <https://doi.org/10.1126/science.186.4162.456>.
- Eklund, M. W., F. T. Poysky, M. E. Peterson et J. A. Meyers. 1976. "Relationship of bacteriophages to alpha toxin production in *Clostridium novyi* types A and B." *Infection and immunity* 14 (3): 793-803. <https://doi.org/10.1128/iai.14.3.793-803.1976>.
- Eleopra, R., V. Tugnoli, O. Rossetto, C. Montecucco et D. De Grandis. 1997. "Botulinum neurotoxin serotype C: a novel effective botulinum toxin therapy in human." *Neuroscience Letters* 224 (2): 91-94. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(97\)13448-6](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0304-3940(97)13448-6).
- Elmnasser, N., S. Guillou, F. Leroi, N. Orange, A. Bakhrouf et M. Federighi. 2007. "Pulsed-light system as a novel food decontamination technology: a review." *Canadian journal of microbiology* 53 (7): 813-821.
- Espelund, M. et D. Klaveness. 2014. "Botulism outbreaks in natural environments - an update." *Frontiers in Microbiology* 5. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00287>.

- Fett, W. F. 2000. "Naturally occurring biofilms on alfalfa and other types of sprouts." *Journal of food protection* 63 (5): 625-32. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-63.5.625>.
- Fontana, A., M. Soldano, P. Bellassi, C. Fabbri, F. Gallucci, L. Morelli et F. Cappa. 2020. "Dynamics of *Clostridium* genus and hard-cheese spoiling *Clostridium* species in anaerobic digesters treating agricultural biomass." *AMB Express* 10 (1): 102. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01040-4>.
- Franciosa, G., L. Fenicia, C. Caldiani et P. Aureli. 1996. "PCR for detection of *Clostridium botulinum* type C in avian and environmental samples." *Journal of Clinical Microbiology* 34 (4): 882-885.
- Fröschle, B., U. Messelhäusser, C. Höller et M. Lebuhn. 2015. "Fate of *Clostridium botulinum* and incidence of pathogenic clostridia in biogas processes." *Journal of applied microbiology* 119 (4): 936-47. <https://doi.org/10.1111/jam.12909>.
- Fukuzaki, S. 2006. "Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes." *Biocontrol science* 11 (4): 147-157.
- Galey, F. D., R. Terra, R. Walker, J. Adaska, M. A. Etchebarne, B. Puschner, E. Fisher, R. H. Whitlock, T. Rocke, D. Willoughby et E. Tor. 2000. "Type C Botulism in Dairy Cattle from Feed Contaminated with a Dead Cat." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 12 (3): 204-209. <https://doi.org/10.1177/104063870001200302>.
- Gantzer, C., P. Gaspard, L. Galvez, A. Huyard, N. Dumouthier et J. Schwartzbrod. 2001. "Monitoring of bacterial and parasitological contamination during various treatment of sludge." *Water Research* 35 (16): 3763-3770. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354\(01\)00105-1](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0043-1354(01)00105-1).
- GDS Bretagne, DDPP22 et Anses-laboratoire de Ploufragan. 2019. "Des contaminations croisées avec les fumiers de volailles." Paysan Breton, du 27 septembre au 3 octobre.
- Gelinas, P., J. Goulet, G. M. Tastayre et G. A. Picard. 1984. "Effect of temperature and contact time on the activity of eight disinfectants-a classification." *Journal of food protection* 47 (11): 841-847.
- Gessler, F. et H. Böhnel. 2006. "Persistence and mobility of a *Clostridium botulinum* spore population introduced to soil with spiked compost." *FEMS microbiology ecology* 58 (3): 384-93. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2006.00183.x>.
- Girardin, H., C. E. Morris, C. Albagnac, N. Dreux, C. Glaux et C. Nguyen-The. 2005. "Behaviour of the pathogen surrogates *Listeria innocua* and *Clostridium sporogenes* during production of parsley in fields fertilized with contaminated amendments." *FEMS microbiology ecology* 54 (2): 287-95. <https://doi.org/10.1016/j.femsec.2005.04.003>.
- Gosling, R. J., I. Mawhinney, K. Vaughan, R. H. Davies et R. P. Smith. 2017. "Efficacy of disinfectants and detergents intended for a pig farm environment where *Salmonella* is present." *Veterinary microbiology* 204: 46-53.
- Graham, J.M., G.R. Smith, Borland. E.D. et J.W. MacDonald. 1978. "Avian botulism in winter and spring and the stability of *Clostridium botulinum* type C toxin." *The Veterinary record* 102 (2): 40-1. <https://doi.org/10.1136/vr.102.2.40>.
- Heaton, J.C. et K. Jones. 2008. "Microbial contamination of fruit and vegetables and the behaviour of enteropathogens in the phyllosphere: a review." *Journal of Applied Microbiology* 104 (3): 613-626. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03587.x>.
- Hill, K.K., G. Xie, B.T. Foley, T.J. Smith, A.C. Munk, D. Bruce, L.A. Smith, T.S. Brettin et J.C. Detter. 2009. "Recombination and insertion events involving the botulinum neurotoxin complex genes in *Clostridium botulinum* types A, B, E and F and *Clostridium butyricum* type E strains." *BMC Biology* 7 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-66>.
- Hodowanec, A. et T. P. Bleck. 2015. "*Clostridium botulinum* (Botulism)." Dans *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*, 2763. Philadelphia: Elsevier Saunders.

- Hogg, R., C. Livesey et J. Payne. 2008. "Diagnosis and implications of botulism." *In Practice* 30: 392-397. <https://doi.org/10.1136/inpract.30.7.392>.
- Hogg, R., J. Payne, S. Hepple et R. McCamley. 2011. "Use of broiler litter as a bedding material for livestock." *The Veterinary record* 168 (18): 488-9. <https://doi.org/10.1136/vr.d2784>.
- Houot, S., M-N. Pons, M. Pradel, A. Tibi, C.C. Aubry, L. Augusto, R. Barbier, P. Benoit, H. Brugère, M.A. Caillaud, M. Casellas, A. Chatelet, P. Dabert, S. De Mareschal, I. Doussan, C. Etrillard, J. Fuchs, S.S. Générmont, L. Giamberini, A. Hélias, E. Jardé, S. Le Perchec, S. Lupton, N. Marron, S. Menasseri-Aubry, A. Mollier, C. Morel, C. Mouglin, C. Nguyen, V. Parnaudeau, D. Patureau, A.M. Pourcher, G. Rychen, I. Savini, E. SMOLDERS, E. Topp, L. Vieublé et C. Viguié. 2014. *Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier. Impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques*. Ministère de l'Agriculture. <https://hal.inrae.fr/hal-03148748>, 930 p.
- Hubálek, Z. et J. Halouzka. 1988. "Thermal sensitivity of *Clostridium botulinum* type C toxin." *Epidemiology & Infection* 101 (2): 321-325.
- Hubálek, Z. et J. Halouzka. 1991. "Persistence of *Clostridium botulinum* type C toxin in blow fly (Calliphoridae) larvae as a possible cause of avian botulism in spring." *Journal of wildlife diseases* 27 (1): 81-5. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-27.1.81>.
- Huneau-Salaün, A., V. Michel, L. Balaine, I. Petetin, F. Eono, F. Ecobichon et S. Le Bouquin. 2010. "Evaluation of common cleaning and disinfection programmes in battery cage and on-floor layer houses in France." *British Poultry Science* 51 (2): 204-212. <https://doi.org/10.1080/00071661003745794>.
- Huss, H. H. 1980. "Distribution of *Clostridium botulinum*." *Applied and environmental microbiology* 39 (4): 764-769.
- ICMSF. 2010. *Microbiology of Food 6. Second Edition. Microbial Ecology of Food Commodities*. New York: Kluwer Academic.
- Jiang, Y., S. H. Xie, C. Dennehy, P. G. Lawlor, Z. H. Hu, G. X. Wu, X. M. Zhan et G. E. Gardiner. 2020. "Inactivation of pathogens in anaerobic digestion systems for converting biowastes to bioenergy: A review." *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 120: 109654. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.109654>.
- Jo, S. H. et J. M. Park. 2019. "The dark side of organic vegetables: interactions of human enteropathogenic bacteria with plants." *Plant Biotechnology Reports* 13 (2).
- Johnston, M. D., S. Lawson et J. A. Otter. 2005. "Evaluation of hydrogen peroxide vapour as a method for the decontamination of surfaces contaminated with *Clostridium botulinum* spores." *Journal of Microbiological Methods* 60 (3): 403-411. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.021>.
- Johnstone, K. 1994. "The trigger mechanism of spore germination: current concepts." *Journal of Applied Bacteriology* 76 (S23): 17S-24S. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb04354.x>.
- Joubert, L., C. Chirol et P. Beaureau. 1969. "A propos de sept cas de botulisme bovin d'origine féline." *Bull. Soc. Sci. Vét. Comparée Lyon* 71: 96-101.
- Junior, C.A.O., R.O.S. Silva, F.C.F. Lobato, M. A. Navarro et F. A. Uzal. 2020. "Gas gangrene in mammals: a review." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 32 (2): 175-183.
- Kabelitz, T., C. Ammon, R. Funk, S. Munch, O. Biniash, U. Nubel, N. Thiel, U. Rosler, P. Siller, B. Amon, A.J.A. Aarnink et T. Amon. 2020. "Functional relationship of particulate matter (PM) emissions, animal species, and moisture content during manure application." *Environment International* 143: 105577. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2020.105577>.
- Kabelitz, T., O. Biniash, C. Ammon, U. Nubel, N. Thiel, D. Janke, S. Swaminathan, R. Funk, S. Munch, U. Rosler, P. Siller, B. Amon, A. J. A. Aarnink et T. Amon. 2021. "Particulate matter emissions during field application of poultry manure - The influence of moisture

- content and treatment." *Science of the Total Environment* 780: 146652. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146652>.
- Kłapeć, T., A. Wójcik-Fatla, A. Cholewa, G. Cholewa et J. Dutkiewicz. 2016. "Microbiological characterization of vegetables and their rhizosphere soil in Eastern Poland." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 23 (4): 559-565. <https://doi.org/10.5604/12321966.1226846>.
- Krüger, M., M. Skau, A.A. Shehata et W. Schrödl. 2013. "Efficacy of *Clostridium botulinum* types C and D toxoid vaccination in Danish cows." *Anaerobe* 23: 97-101. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2013.06.011>.
- Lai, H.T.L., A.J.A. Aarnink, M. Cambra-López, T.T.T. Huynh, H.K. Parmentier et P.G. Koerkamp. 2014. "Size distribution of airborne particles in animal houses." *Agricultural Engineering International: CIGR Journal* 16: 28-42.
- Le Bouquin, S., A. Huneau-Salaun, D. Huonnic, L. Balaine, S. Martin et V. Michel. 2013. "Aerial dust concentration in cage-housed, floor-housed, and aviary facilities for laying hens." *Poultry Science* 92 (11): 2827-33. <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03032>.
- Le Bouquin, S., A. Schmitz, M. Pertusa, A. Scoizec, N. Rousset et N. Eterradosi. 2017. "Évaluation de la survie des virus Influenza aviaires H5N8 dans les lisiers d'élevages de palmipèdes gras." *Le Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation* n°80 (4): 17-20.
- Le Gratiot, T., F. Anniballi, J. Boutant, M. Mellal, S. Rouxel, T. Poezevara, E. Houard, V. Rose, F-X. Briand, M. Chemaly et C. Le Maréchal. 2022. "Caractérisation de *Clostridium botulinum* dans le cadre d'épisodes de botulisme aviaire en France: évaluation d'un nouvel outil." Journées de la Recherche Avicole et des palmipèdes à foie gras, Tours, 9&10 mars.
- Le Gratiot, T., T. Poezevara, S. Rouxel, E. Houard, C. Mazuet, M. Chemaly et C. L. Marechal. 2020. "Development of An Innovative and Quick Method for the Isolation of *Clostridium botulinum* Strains Involved in Avian Botulism Outbreaks." *Toxins (Basel)* 12 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins12010042>.
- Le Maréchal, C. 2020. "Evaluation de la contamination des sols français par *C. botulinum*." Journée d'échanges sur le botulisme animal - 2^{ème} édition Ploufragan (France).
- Le Maréchal, C., C. Druilhe, E. Repérant, E. Boscher, S. Rouxel, S. Le Roux, T. Poëzévara, C. Ziebal, C. Houdayer, B. Nagard, F. Barbut, A. M. Pourcher et M. Denis. 2019a. "Evaluation of the occurrence of sporulating and nonsporulating pathogenic bacteria in manure and in digestate of five agricultural biogas plants." *MicrobiologyOpen* 8 (10): e872. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/mbo3.872>.
- Le Maréchal, C., S. Fourour, V. Ballan, S. Rouxel, R. Souillard et M. Chemaly. 2018. "Detection of *Clostridium botulinum* group III in environmental samples from farms by real-time PCR using four commercial DNA extraction kits." *BMC Research Notes* 11 (1): 441. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3549-5>.
- Le Maréchal, C., O. Hulin, S. Mace, C. Chuzeville, S. Rouxel, T. Poezevara, C. Mazuet, F. Pozet, E. Sellal, L. Martin, A. Viry, C. Rubbens et M. Chemaly. 2019b. "A Case Report of a Botulism Outbreak in Beef Cattle Due to the Contamination of Wheat by a Roaming Cat Carcass: From the Suspicion to the Management of the Outbreak." *Animals (Basel)* 9 (12). <https://doi.org/10.3390/ani9121025>.
- Le Maréchal, C., S. Rouxel, T. Poëzévara, C. Druilhe, A.M. Pourcher et M. Denis. 2019c. "Optimization of the detection of *Clostridium botulinum* in pig and cattle manures and digestates after anaerobic digestion in agricultural biogas plants." 13th International Symposium On Epidemiology and Control Of Foodborne Pathogens In Pork (Safepork), Berlin, Allemagne.
- Le Maréchal, Caroline, Cédric Woudstra et Patrick Fach. 2016. "Botulism." Dans *Clostridial Diseases of Animals*, 303-330. : John Wiley & Sons, Inc.

- Le Toquin, E., S. Faure, N. Orange et F. Gas. 2018. "New biocide foam containing hydrogen peroxide for the decontamination of vertical surface contaminated with *Bacillus thuringiensis* spores." *Frontiers in microbiology* 9: 2295.
- Léorat, J. et D. Martin. 2003. " La décontamination : méthodologie pour comparer l'activité de différents désinfectants sur *Clostridium perfringens*." Cinquièmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, 26-27 mars.
- Li, M., J. Qi, H. Zhang, S. Huang, L. Li et D. Gao. 2011. "Concentration and size distribution of bioaerosols in an outdoor environment in the Qingdao coastal region." *Science of the Total Environment* 409 (19): 3812-9. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.06.001>.
- Lindström, M. et H. Korkeala. 2006. "Laboratory diagnostics of botulism." *Clinical Microbiology Review* 19 (2): 298-314. <https://doi.org/10.1128/cmr.19.2.298-314.2006>.
- Lloret, E., L. Pastor, P. Pradas et J.A. Pascual. 2013. "Semi full-scale thermophilic anaerobic digestion (TAnd) for advanced treatment of sewage sludge: Stabilization process and pathogen reduction." *Chemical Engineering Journal* 232: 42-50. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.cej.2013.07.062>.
- Lonc, E. et K. Plewa. 2010. "Microbiological Air Contamination in Poultry Houses." *Polish Journal of Environmental Studies* 15: 15-19.
- Lund, B.M. et M.W. Peck. 2013. *Clostridium botulinum*. Edité par R.G. Labbe et S. Garcia. *Guide to Foodborne Pathogens, 2nd Edition*.
- Luukkonen, T., H. Prokkola et S.O. Pehkonen. 2020. "Peracetic acid for conditioning of municipal wastewater sludge: Hygienization, odor control, and fertilizing properties." *Waste Management* 102: 371-379. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.wasman.2019.11.004>.
- Lv, Z., X. Wu, B. Zhou, Y. Wang, Y. Sun, Y. Wang, Z. Chen et J. Zhang. 2019. "Effect of one step temperature increment from mesophilic to thermophilic anaerobic digestion on the linked pattern between bacterial and methanogenic communities." *Bioresource technology* 292: 121968.
- Macarasin, D., J. Patel, G. Bauchan, J. A. Giron et S. Ravishankar. 2013. "Effect of Spinach Cultivar and Bacterial Adherence Factors on Survival of *Escherichia coli* O157:H7 on Spinach Leaves." *Journal of Food Protection* 76 (11): 1829-1837. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-12-556>.
- Marois-Fiset, J.-T., A. Carabin, A. Lavoie et C. C. Dorea. 2013. "Effects of temperature and pH on reduction of bacteria in a point-of-use drinking water treatment product for emergency relief." *Applied and environmental microbiology* 79 (6): 2107-2109.
- Martikainen, M.V., T. Tossavainen, M. Taubel, K. Wolczkiewicz, A. Lahde et M. Roponen. 2021. "Toxicological and microbiological characterization of cow stable dust." *Toxicology In Vitro* 75: 105202. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2021.105202>.
- Masters, A.M. et D.G. Palmer. 2021. "Confirmation of botulism diagnosis in Australian bird samples by ELISA and RT rtPCR." *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 33 (4): 684-694. <https://doi.org/10.1177/10406387211014486>.
- McCrea, B.A. et K.S. Macklin. 2006. "Effect of different cleaning regimens on recovery of *Clostridium perfringens* on poultry live haul containers." *Poultry science* 85 (5): 909-913.
- McDonnell, G. et A.D. Russell. 1999. "Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance." *Clinical microbiology reviews* 12 (1): 147-179.
- McEachran, A.D., B.R. Blackwell, J.D. Hanson, K. J. Wooten, G.D. Mayer, S. B. Cox et P.N. Smith. 2015. "Antibiotics, bacteria, and antibiotic resistance genes: aerial transport from cattle feed yards via particulate matter." *Environmental Health Perspectives* 123 (4): 337-43. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408555>.

- McLaren, I., A. Wales, M. Breslin et R. Davies. 2011. "Evaluation of commonly-used farm disinfectants in wet and dry models of Salmonella farm contamination." *Avian Pathology* 40 (1): 33-42. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.537303>.
- McLaughlin, M. R., J. P. Brooks, A. Adeli et D. M. Miles. 2015. "Using broiler litter and swine manure lagoon effluent in sawdust-based swine mortality composts: Effects on nutrients, bacteria, and gaseous emissions." *The Science of the total environment* 532: 265-80. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.05.119>.
- Misra, S., C. E. van Middelaar, K. Jordan, J. Upton, A. J. Quinn, I. J. M. de Boer et K. O'Driscoll. 2020. "Effect of different cleaning procedures on water use and bacterial levels in weaner pig pens." *PLoS One* 15 (11): e0242495. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242495>.
- Moore, R.J. et J.A. Lacey. 2019. "Genomics of the Pathogenic Clostridia." *Microbiology spectrum* 7 (3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0033-2018>.
- Moreira, C., M.R.A. Ferreira, C.E.P. Da Cunha, R.A. Donassolo, P.F. Finger, G.M.S.G. Moreira, D.Y. Otaka, L.A. De Sousa, J.D. Barbosa, Â.N. Moreira, F.M. Salvarani et F.R. Conceição. 2018. "Immunogenicity of a Bivalent Non-Purified Recombinant Vaccine against Botulism in Cattle." *Toxins* 10 (10): 381.
- Narula, N., E. Kothe et R.K. Behl. 2012. "Role of root exudates in plant-microbe interactions." *Journal of applied botany and food quality* 82: 122-130.
- Nevas, M., M. Lindstrom, A. Virtanen, S. Hielm, M. Kuusi, S.S. Arnon, E. Vuori et H. Korkeala. 2005. "Infant botulism acquired from household dust presenting as sudden infant death syndrome." *Journal Of Clinical Microbiology* 43 (1): 511-3. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.1.511-513.2005>.
- Notermans, S. 1993. "Control in fruits and vegetables." Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A.H.W. Hauschild et K.L. Dodds, In Food Science and Technology, 233-260. New York: Marcel Dekker.
- Notermans, S., J. Dufrenne et J. Oosterom. 1981. "Persistence of *Clostridium botulinum* type B on a cattle farm after an outbreak of botulism." *Applied and environmental microbiology* 41 (1): 179-83.
- Odey, E.A., Z. Li, X. Zhou et Y. Yan. 2018. "Optimization of lactic acid fermentation for pathogen inactivation in fecal sludge." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 157: 249-254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.075>.
- Oguma, K. 1976. "The stability of toxigenicity in *Clostridium botulinum* types C and D." *J Gen Microbiol* 92 (1): 67-75. <https://doi.org/10.1099/00221287-92-1-67>.
- Oie, S., A. Obayashi, H. Yamasaki, H. Furukawa, T. Kenri, M. Takahashi, K. Kawamoto et S.-I. Makino. 2011. "Disinfection methods for spores of *Bacillus atrophaeus*, *B. anthracis*, *Clostridium tetani*, *C. botulinum* and *C. difficile*." *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 34 (8): 1325-1329.
- Ortiz, N. E. et G. R. Smith. 1994. "Landfill sites, botulism and gulls." *Epidemiology and Infection* 112 (2): 385-391. <https://doi.org/10.1017/S0950268800057794>.
- Orzi, V., B. Scaglia, S. Lonati, C. Riva, G. Boccasile, G.L. Alborali et F. Adani. 2015. "The role of biological processes in reducing both odor impact and pathogen content during mesophilic anaerobic digestion." *The Science of the total environment* 526: 116-26. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.04.038>.
- Palmer, J.S., R.L. Hough, H.M. West et L.M. Avery. 2019. "A review of the abundance, behaviour and detection of clostridial pathogens in agricultural soils." *European Journal of Soil Science* 70 (4): 911-929. <https://doi.org/10.1111/ejss.12847>.
- Park, S., B. Szonyi, R. Gautam, K. Nightingale, J. Anciso et R. Ivanek. 2012. "Risk factors for microbial contamination in fruits and vegetables at the preharvest level: a systematic review." *Journal of food protection* 75 (11): 2055-81. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.Jfp-12-160>.

- Payne, J.H., R.A. Hogg, A. Otter, H.I. Roest et C.T. Livesey. 2011. "Emergence of suspected type D botulism in ruminants in England and Wales (2001 to 2009), associated with exposure to broiler litter." *Veterinary Record* 168 (24): 640. <https://doi.org/10.1136/vr.d1846>.
- Peck, M.W., T.J. Smith, F. Anniballi, J.W. Austin, L. Bano, M. Bradshaw, P. Cuervo, L.W. Cheng, Y. Derman, B.G. Dorner, A. Fisher, K.K. Hill, S.R. Kalb, H. Korkeala, M. Lindström, F. Lista, C. Lúquez, C. Mazuet, M. Pirazzini, M.R. Popoff, O. Rossetto, A. Rummel, D. Sesardic, B.R. Singh et S.C. Stringer. 2017. "Historical Perspectives and Guidelines for Botulinum Neurotoxin Subtype Nomenclature." *Toxins (Basel)* 9 (1): 38. <https://doi.org/10.3390/toxins9010038>.
- Peng Chen, Z., J.G.Jr. Morris, R.L. Rodriguez, A. Wagle Shukla, J. Tapia-Núñez et M.S. Okun. 2012. "Emerging opportunities for serotypes of botulinum neurotoxins." *Toxins* 4 (11): 1196-1222. <https://doi.org/10.3390/toxins4111196>.
- Perez, J., V.S. Springthorpe et S.A. Sattar. 2005. "Activity of selected oxidizing microbicides against the spores of *Clostridium difficile*: relevance to environmental control." *American Journal of Infection Control* 33 (6): 320-5. <https://doi.org/10.1016/j.ajic.2005.04.240>.
- Pertusa, M., N. Rousset, A. Schmitz, P. Ponchant et S. Le Bouquin. 2017. "L'assainissement des lisiers de palmipèdes, un point critique à maîtriser dans le plan de biosécurité." *TeMA* n°43: 15-20.
- Piessens, V., E. Van Coillie, B. Verbist, K. Supre, G. Braem, A. Van Nuffel, L. De Vuyst, M. Heyndrickx et S. De Vlieghe. 2011. "Distribution of coagulase-negative Staphylococcus species from milk and environment of dairy cows differs between herds." *Journal of Dairy Science* 94 (6): 2933-44. <https://doi.org/10.3168/jds.2010-3956>.
- Plowman, J. et M.W. Peck. 2002. "Use of a novel method to characterize the response of spores of non-proteolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F to a wide range of germinants and conditions." *Journal of applied microbiology* 92 (4): 681-94. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01569.x>.
- Popoff, M.R. 1989. "Revue sur l'épidémiologie du botulisme bovin en France et analyse de sa relation avec les élevages de volailles." *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)* 8(1): 129-145. <https://doi.org/10.20506/rst.8.1.404>.
- Popoff, M.R. 2017. "*Clostridium botulinum* et autres *Clostridium* producteurs de neurotoxines botuliques." Dans *Risques microbiologiques alimentaires*, édité par Lavoisier.
- Portinha, I.M., F.P. Douillard, H. Korkeala et M. Lindström. 2022. "Sporulation Strategies and Potential Role of the Exosporium in Survival and Persistence of *Clostridium botulinum*." *International journal of molecular sciences* 23 (2). <https://doi.org/10.3390/ijms23020754>.
- Poulain, B. et M.R. Popoff. 2019. "Why Are Botulinum Neurotoxin-Producing Bacteria So Diverse and Botulinum Neurotoxins So Toxic?" *Toxins (Basel)* 11 (1). <https://doi.org/10.3390/toxins11010034>.
- Pourcher, A.M., C. Le Maréchal, C. Druilhe, E. Repérant, C. Ziebal, L. Martin, S. Michel-Leroux, E. Boscher, L. Heurtevent, S. Rouxel, J. Buffet, T. Poëzévara, G. Nunes, C. Houdayer, P. Peu, B. Nagard, L. Derongs, F. Barbut et M. Denis. 2018. *Devenir des Clostridium et de bactéries pathogènes non sporulantes au cours de la digestion anaérobie mésophile des effluents d'élevage*. <https://librairie.ademe.fr/dechets-economie-circulaire/4250-clodia.html>, 87p.
- Prévot, A.R. et E.R. Brygoo. 1953. "Nouvelles recherches sur le botulisme et ses 5 types toxiques." *Annales de l'institut Pasteur*.
- Pulvirenti, A., D. Ronga, M. Zaghi, A.R. Tomasselli, L. Mannella et N. Pecchioni. 2015. "Pelleting is a successful method to eliminate the presence of *Clostridium* spp. from the digestate of biogas plants." *Biomass and Bioenergy* 81: 479-482.

- Rainisalo, A., M. Romantschuk et M.H. Kontro. 2011. "Evolution of clostridia and streptomycetes in full-scale composting facilities and pilot drums equipped with on-line temperature monitoring and aeration." *Bioresource Technology* 102 (17): 7975-83. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.05.087>.
- Ramaswamy, H.S., Y. Shao et S. Zhu. 2010. "High-pressure destruction kinetics of *Clostridium sporogenes* ATCC 11437 spores in milk at elevated quasi-isothermal conditions." *Journal of Food Engineering* 96 (2): 249-257. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.07.019>.
- Relun, A., L. Dorso, A. Douart, C. Chartier, R. Guatteo, C. Mazuet, M.R. Popoff et S. Assie. 2017. "A large outbreak of bovine botulism possibly linked to a massive contamination of grass silage by type D/C *Clostridium botulinum* spores on a farm with dairy and poultry operations." *Epidemiology and Infection* 145 (16): 3477-3485. <https://doi.org/10.1017/S0950268817002382>.
- Roberts, T.A. et Angela M. Gibson. 1979. "The relevance of *Clostridium botulinum* type C in public health and food processing." *International Journal of Food Science & Technology* 14 (3): 211-226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1979.tb00866.x>.
- Roque, K., G.-D. Lim, J.-H. Jo, K.-M. Shin, E.-S. Song, R. Gautam, C.-Y. Kim, K. Lee, S. Shin, H.-S. Yoo, Y. Heo et H.-A. Kim. 2016. "Epizootiological characteristics of viable bacteria and fungi in indoor air from porcine, chicken, or bovine husbandry confinement buildings." *Journal of Veterinary Science* 17: 531-538
- Rossetto, O., M. Pirazzini et C. Montecucco. 2014. "Botulinum neurotoxins: genetic, structural and mechanistic insights." *Nature Reviews Microbiology* 12 (8): 535-49. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3295>.
- Rulff, R., W. Schrodler, S. Basiouni, J. Neuhaus et M. Kruger. 2015. "Is downer cow syndrome related to chronic botulism?" *Polish journal of veterinary sciences* 18 (4).
- Russell, A. D. 1990. "Bacterial spores and chemical sporicidal agents." *Clinical microbiology reviews* 3 (2): 99-119.
- Sahlström, L., E. Bagge, E. Emmoth, A. Holmqvist, M.L. Danielsson-Tham et A. Albiñ. 2008. "A laboratory study of survival of selected microorganisms after heat treatment of biowaste used in biogas plants." *Bioresource technology* 99 (16): 7859-65. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.09.071>.
- Sakaguchi, Y., T. Hayashi, K. Kurokawa, K. Nakayama, K. Oshima, Y. Fujinaga, M. Ohnishi, E. Ohtsubo, M. Hattori et K. Oguma. 2005. "The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (48): 17472-17477. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505503102>.
- Sandler, R.J., T.E. Rocke et T.M. Yuill. 1998. "The inhibition of *Clostridium botulinum* type C by other bacteria in wetland sediments." *Journal of wildlife diseases* 34 (4): 830-3. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-34.4.830>.
- Schmid, A., U. Messelhäusser, S. Hörmansdorfer, C. Sauter-Louis et R. Mansfeld. 2013. "Occurrence of zoonotic Clostridia and Yersinia in healthy cattle." *Journal of Food Protection* 76: 1697-1703.
- SciCom. 2017. *Risque associé à l'épandage de fumiers et de digestats contaminés par Clostridium botulinum*. Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire, 34p.
- Scott, A., Y.C. Tien, C.F. Drury, W.D. Reynolds et E. Topp. 2018. "Enrichment of antibiotic resistance genes in soil receiving composts derived from swine manure, yard wastes, or food wastes, and evidence for multiyear persistence of swine *Clostridium* spp." *Canadian Journal of Microbiology* 64 (3): 201-208. <https://doi.org/10.1139/cjm-2017-0642>.
- Segner, W.P. et C.F. Schmidt. 1971. "Heat resistance of spores of marine and terrestrial strains of *Clostridium botulinum* type C." *Applied microbiology* 22 (6): 1030-1033.

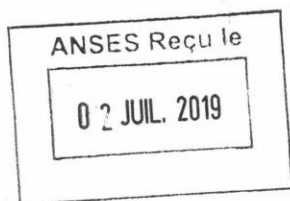
- Setlow, P. 2014. "Germination of spores of *Bacillus* species: what we know and do not know." *Journal of bacteriology* 196 (7): 1297-1305.
- Setlow, P., S.W. Wang et Y.Q. Li. 2017. "Germination of Spores of the Orders Bacillales and Clostridiales." Dans *Annual Review of Microbiology, Vol 71*, édité par S. Gottesman, 459-477.
- Sevenier, V., S. Delannoy, S. André, P. Fach et F. Remize. 2012. "Prevalence of *Clostridium botulinum* and thermophilic heat-resistant spores in raw carrots and green beans used in French canning industry." *International Journal of Food Microbiology* 155 (3): 263-268. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.009>.
- Shen, A., A.N. Edwards, M.R. Sarker et D. Paredes-Sabja. 2019. "Sporulation and germination in clostridial pathogens." *Microbiology spectrum* 7 (6): 7.6. 3. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0017-2018>.
- Siegel, L.S. 1993. "Destruction of Botulinum Toxins in Food and Water " Dans *Clostridium botulinum. Ecology and control in foods*, édité par A. H. W. Haushchild et K. L. Dodds, 323-332. New York: Marcel Dekker.
- Sieminski, M. 2001. "Environmental health threats." *Wydawnictwo Naukowe PWN*.
- Skarin, H., T. Håfström, J. Westerberg et B. Segerman. 2011. "Clostridium botulinum group III: a group with dual identity shaped by plasmids, phages and mobile elements." *BMC Genomics* 12 (1): 185. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-185>.
- Skarin, H. et B. Segerman. 2014. "Plasmidome interchange between *Clostridium botulinum*, *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum* converts strains of independent lineages into distinctly different pathogens." *PLoS One* 9 (9): e107777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107777>.
- Smart, J.L., T.O. Jones, F.G. Clegg et M.J. McMurtry. 1987. "Poultry waste associated type C botulism in cattle." *Epidemiology and Infection* 98 (1): 73-79.
- Smith, G. R. 1978. "Botulism, Waterfowl and Mud." *British Veterinary Journal* 134 (5): 407-411. [https://doi.org/10.1016/s0007-1935\(17\)33381-x](https://doi.org/10.1016/s0007-1935(17)33381-x).
- Smith, G.R. et R.A. Milligan. 1979. "*Clostridium botulinum* in soil on the site of the former Metropolitan (Caledonian) Cattle Market, London." *Epidemiology and Infection* 83 (2): 237-241.
- Smith, G.R. et A. Turner. 1989. "The production of *Clostridium botulinum* toxin in mammalian, avian and piscine carrion." *Epidemiology and infection* 102 (3): 467-71. <https://doi.org/10.1017/s0950268800030181>.
- Smith, G.R. et A.M. Young. 1980. "*Clostridium botulinum* in British soil." *The Journal of hygiene* 85 (2): 271-274. <https://doi.org/10.1017/s0022172400063300>.
- Smith, L.D. 1975. "Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil." *Applied microbiology* 30 (2): 319-323.
- Snow, D.M., R.R. Cobb, J. Martinez, I. Finger-Baker, L. Collins, S. Terpening, E.S. Syar, N. Niemuth, D. Kobs, R. Barnewall, S. Farr-Jones, J.D. Marks et M.T. Tomic. 2021. "A Monoclonal Antibody Combination against both Serotypes A and B Botulinum Toxin Prevents Inhalational Botulism in a Guinea Pig Model." *Toxins* 13 (1): 31.
- Souillard, R., Le Maréchal C., L. Balaine, S. Rouxel, T. Poezevara, V. Ballan, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2020. "Manure contamination with *Clostridium botulinum* after avian botulism outbreaks: management and potential risk of dissemination." *The Veterinary record* 187 (6): 233. <https://doi.org/10.1136/vr.105898>.
- Souillard, R., D. Grosjean, T. Le Gratiot, T. Poezevara, S. Rouxel, L. Balaine, S. Mace, L. Martin, F. Anniballi, M. Chemaly, S. Le Bouquin et C. Le Maréchal. 2021. "Asymptomatic Carriage of *C. botulinum* Type D/C in Broiler Flocks as the Source of Contamination of a Massive Botulism Outbreak on a Dairy Cattle Farm." *Frontiers in Microbiology* 12: 679377. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.679377>.

- Souillard, R. et G. Kuntz. 2020. "Niveau de contamination des sols par *C. botulinum* après épandage dans les filières avicoles et bovines." Journée d'échanges sur le botulisme animal - 2^{ème} édition Ploufragan (France).
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, F. Mahé, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2017a. "A bovine botulism outbreak associated with a suspected cross-contamination from a poultry farm." *Veterinary Microbiology* 208: 212-216. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.07.022>.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, V. Ballan, S. Rouxel, D. Leon, L. Balaine, T. Poezevara, E. Houard, B. Robineau, C. Robinault, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2017b. "Investigation of a type C/D botulism outbreak in free-range laying hens in France." *Avian Pathology* 46 (2): 195-201. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1240355>.
- Souillard, R., C. Le Maréchal, F. Hollebecque, S. Rouxel, A. Barbe, E. Houard, D. Leon, T. Poezevara, P. Fach, C. Woudstra, F. Mahe, M. Chemaly et S. Le Bouquin. 2015. "Occurrence of *C. botulinum* in healthy cattle and their environment following poultry botulism outbreaks in mixed farms." *Veterinary Microbiology* 180 (1-2): 142-5. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.07.032>.
- Souillard, R., C. Woudstra, C. Le Maréchal, M. Dia, M. H. Bayon-Auboyer, M. Chemaly, P. Fach et S. Le Bouquin. 2014. "Investigation of *Clostridium botulinum* in commercial poultry farms in France between 2011 and 2013." *Avian Pathology* 43 (5): 458-64. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.957644>.
- Stampi, S., G. De Luca, M. Onorato, E. Ambrogiani et F. Zanetti. 2002. "Peracetic acid as an alternative wastewater disinfectant to chlorine dioxide." *Journal of Applied Microbiology* 93 (5): 725-731. <https://doi.org/https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01732.x>.
- Steger, K., Å.M. Sjögren, Å. Jarvis, J.K. Jansson et I. Sundh. 2007. "Development of compost maturity and Actinobacteria populations during full-scale composting of organic household waste." *Journal of Applied Microbiology* 103 (2): 487-498. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03271.x>.
- Steindl, G., A. Fiedler, S. Huhulescu, G. Wewalka et F. Allerberger. 2015. "Effect of airborne hydrogen peroxide on spores of *Clostridium difficile*." *Wiener klinische Wochenschrift* 127 (11): 421-426.
- Steinman, A., N. Galon, A. Arazi, Y. Bar-Giora et N. Y. Shpigel. 2007. "Cattle immune response to botulinum type D toxoid: results of a vaccination study." *Vaccine* 25 (44): 7636-40. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.08.051>.
- Tehran, D.A. et Marco Pirazzini. 2018. "Novel Botulinum Neurotoxins: Exploring Underneath the Iceberg Tip." *Toxins* 10 (5): 190.
- Thiel, N., S. Munch, W. Behrens, V. Junker, M. Faust, O. Biniash, T. Kabelitz, P. Siller, C. Boedeker, P. Schumann, U. Roesler, T. Amon, K. Schepanski, R. Funk et U. Nubel. 2020. "Airborne bacterial emission fluxes from manure-fertilized agricultural soil." *Microbial Biotechnology* 13 (5): 1631-1647. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13632>.
- Travel, A., A. Fournier, P. Marchand, A. Venisseau, S. Le Bouquin, V. Allain, A Thébault, A. Mahé, V. Grammont, R. Badreddine, S. Jurjanz, C. Feidt et C. Jondreville. 2012. "Transfert de polluants organiques persistants vers l'œuf de consommation : état des lieux, modalités et facteurs de risques." *Innovations Agronomiques* 25: 313-330
- Uwamahoro, M.C., R. Massicotte, Y. Hurtubise, F. Gagne-Bourque, A. A. Mafu et L. Yahia. 2018. "Evaluating the Sporicidal Activity of Disinfectants against *Clostridium difficile* and *Bacillus amyloliquefaciens* Spores by Using the Improved Methods Based on ASTM E2197-11." *Front Public Health* 6: 18. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00018>.
- Vacheyrou, M., A.C. Normand, P. Guyot, C. Cassagne, R. Piarroux et Y. Bouton. 2011. "Cultivable microbial communities in raw cow milk and potential transfers from stables of sixteen French farms." *International Journal of Food Microbiology* 146 (3): 253-62. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.02.033>.

- Valancony, H., P. Buffet, P. Drouin, F. Humbert et L. Balaine. 2001. "Comparaison entre la thermo-désinfection et l'épandage de chaux vive pour la décontamination des sols des poulaillers en terre battue." 4èmes Journées de la Recherche Avicole, Nantes, 27-29 mars.
- Valancony, H., P. Drouin, P. Buffet, F. Humbert et L. Balaine. 2000. "Study of the efficiency of thermo-disinfection for the disinfection of the poultry house mud floors." *Sciences et Techniques Avicoles (France)*.
- Wachnicka, E., S.C. Stringer, G.C. Barker et M.W. Peck. 2016. "Systematic Assessment of Nonproteolytic *Clostridium botulinum* Spores for Heat Resistance." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (19): 6019-29. <https://doi.org/10.1128/AEM.01737-16>.
- Wang, K., W. Li, X. Li et N. Ren. 2015. "Spatial nitrifications of microbial processes during composting of swine, cow and chicken manure." *Scientific Reports* 5 (1): 14932. <https://doi.org/10.1038/srep14932>.
- Weingart, O.G., T. Schreiber, C. Mascher, D. Pauly, M.B. Dorner, T.F. Berger, C. Egger, F. Gessler, M.J. Loessner, M.A. Avondet et B.G. Dorner. 2010. "The case of botulinum toxin in milk: experimental data." *Applied and Environmental Microbiology* 76 (10): 3293-300. <https://doi.org/10.1128/AEM.02937-09>.
- Winkel, A., J. Mosquera, P.W.G. Groot Koerkamp, N.W.M. Ogink et A.J.A. Aarnink. 2015. "Emissions of particulate matter from animal houses in the Netherlands." *Atmospheric Environment* 111: 202-212. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.03.047>.
- Wood, J.P. et A.C. Adrion. 2019. "Review of decontamination techniques for the inactivation of bacillus anthracis and other spore-forming bacteria associated with building or outdoor materials." *Environmental science and technology* 53 (8): 4045-4062.
- Worbs, S., U. Fiebig, R. Zeleny, H. Schimmel, A. Rummel, W. Luginbühl et B.G. Dorner. 2015. "Qualitative and quantitative detection of botulinum neurotoxins from complex matrices: Results of the first international proficiency test." *Toxins* 7 (12): 4935-4966.
- Woudstra, C., H. Skarin, F. Anniballi, L. Fenicia, L. Bano, I. Drigo, M. Koene, M.-H. Bâyon-Auboyer, J.-P. Buffereau et D. De Medici. 2012. "Neurotoxin gene profiling of *Clostridium botulinum* types C and D native to different countries within Europe." *Applied and environmental microbiology* 78 (9): 3120-3127.
- Wright, K.M., L. Crozier, J. Marshall, B. Merget, A. Holmes et N.J. Holden. 2017. "Differences in internalization and growth of *Escherichia coli* O157:H7 within the apoplast of edible plants, spinach and lettuce, compared with the model species *Nicotiana benthamiana*." *Microbial Biotechnology* 10 (3): 555-569. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/1751-7915.12596>.
- Xu, C., H. Salsali, S. Weese et K. Warriner. 2016. "Inactivation of *Clostridium difficile* in sewage sludge by anaerobic thermophilic digestion." *Canadian Journal of Microbiology* 62 (1): 16-23. <https://doi.org/10.1139/cjm-2015-0511>.
- Zeiller, M., M. Rothballer, A.N. Iwobi, H. Bohnel, F. Gessler, A. Hartmann et M. Schmid. 2015. "Systemic colonization of clover (*Trifolium repens*) by *Clostridium botulinum* strain 2301." *Frontiers in Microbiology* 6: 1207. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01207>.
- Zhang, S., F. Lebreton, M.J. Mansfield, S.I. Miyashita, J. Zhang, J.A. Schwartzman, L. Tao, G. Masuyer, M. Martínez-Carranza, P. Stenmark, M.S. Gilmore, A.C. Doxey et M. Dong. 2018. "Identification of a Botulinum Neurotoxin-like Toxin in a Commensal Strain of *Enterococcus faecium*." *Cell Host & Microbe* 23 (2): 169-176.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2017.12.018>.
- Zhao, Q. et Y. Liu. 2019. "Is anaerobic digestion a reliable barrier for deactivation of pathogens in biosludge?" *Science of The Total Environment* 668: 893-902. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.063>.

ANNEXES

Annexe 1 : Lettre de saisine



2019-SA-0113



MINISTÈRE DE L'AGRICULTURE ET DE L'ALIMENTATION

Direction générale de l'alimentation
Mission des urgences sanitaires

Le Directeur général de l'alimentation

Suivi par : Lilian Calvo
Tel : 01 49 55 84 54

à

mus.dgal@agriculture.gouv.fr

Monsieur le Directeur Général de l'Agence
nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation,
de l'environnement et du travail

251 rue de Vaugirard
75732 PARIS CEDEX 15

Paris,

25 JUIN 2019

Objet : Mise à jour des connaissances et évaluation des risques en appui sur la décontamination et les mesures de gestion des sous-produits animaux lors de cas de botulisme bovin et aviaire.

Conformément aux dispositions de l'article L. 1313-1 et 1313-3 du Code de la santé publique j'ai l'honneur de solliciter l'avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments sur une demande d'actualisation de connaissances relatives à l'assainissement en élevage et au risque lors de manipulation de sous-produits animaux potentiellement contaminés par le *C. botulinum* dans la filière bovine et aviaire.

Les cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D en élevages sont fréquents en France avec, dans certains cas, des impacts non négligeables pour l'élevage infecté.

Actuellement en France, le botulisme est classé comme un danger sanitaire de première catégorie pour toutes les espèces sensibles. Et, à ce jour, dans le diagnostic de botulisme animal sont recherchés les types toxiques suivants :

- Volaille : C, D, C/D, D/C et E
- Bovin: C, D, C/D, D/C

En 2002, l'Afssa a publié une évaluation du risque sanitaire relative au risque de transmission à l'homme de *C. botulinum* à partir de la consommation de produits (lait, viande, œufs) à l'état frais et transformé, provenant d'un lot d'animaux atteints de cette maladie, susceptibles de contenir de la neurotoxine et/ ou des formes végétatives ou encore des spores de *C. botulinum* d'animaux malades ou infectés dans les filières aviaire et bovine.

Postérieurement, dans sa réponse à la saisine 2008-SA-0334, l'Afssa s'est prononcée sur des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre le botulisme aviaire en distinguant notamment des mesures de gestion selon le type de toxine botulinique identifiée

(C, D, E, A, ou B). Une évaluation du risque liée à la consommation de certains produits (œufs, viandes et intestins) issus d'animaux sains, c'est-à-dire en bonne santé, sans signe clinique de maladie voire sans lésion si abattu provenant d'un foyer confirmé de botulisme était également faite.

Toutefois, les informations disponibles ne permettent pas pleinement la gestion proportionnée de cas de botulisme de type C, D ou mosaïque C et D.

L'état actuel des connaissances sur la persistance de spores et de formes végétatives de *C. botulinum*, ainsi que la sensibilité aux biocides sporicides (en complément de l'avis 2015-SA-0178) ne permettent pas d'évaluer l'efficacité des mesures d'assainissement des sous-produits animaux (lisier inclus), des eaux résiduaires, des bâtiments et matériels, du lait et des aliments (fourrage, foin, silo) contaminés ou exposés suite à un épisode de botulisme.

Dans ce contexte, il nous apparaît nécessaire de demander une actualisation des données sur les méthodes et les procédés d'inactivation des formes végétatives et sporulées de *C. botulinum*, ainsi que sur la résistance et la persistance des spores dans les sols.

Des questions listées ci-dessous qui visent à compléter et à actualiser les préconisations émises dans les avis précédents sont également soumises.

Cette évaluation concerne le botulisme de type C ou D ou mosaïque (C/D, D/C) et tout autre sérotype présent en élevage qui serait pertinent en termes d'évaluation de la santé publique. Si des spécificités sont mises en évidence pour les DROM, il est demandé de les traiter dans un 2^e temps.

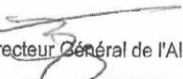
Dans l'hypothèse de matière non assainie,

- l'épandage des eaux résiduaires voire du lisier (ou fumier, litière usagée) présente-t-il un risque au regard de la santé des animaux, notamment un risque inter-espèce ? Des recommandations notamment sur les distances avec des élevages et l'épandage par injection suffisent-ils ?
- les opérations d'épandage présentent-elles un risque au regard de la santé humaine ?
- lors de l'épandage de fumier à proximité ou sur des sols destinés à des cultures et/ou matières premières végétales, quel est le risque pour la consommation humaine ou animale de ces végétaux ?

Le traitement de fumier et la litière usagée à la chaux permet-il d'assainir suffisamment les matières précitées en contact des animaux potentiellement contaminés ?

La conversion des lisiers en biogaz avec pasteurisation (70°C /1h) ou en compostage (70°C/1h) permet-elle une destruction des spores et de la toxine ?

Je vous remercie de bien vouloir apporter votre réponse d'ici le 30 mai 2020


Le Directeur Général de l'Alimentation
Bruno FERREIRA

Annexe 2 : Impact des traitements thermiques sur *C. botulinum*

Deux paramètres D_T et z permettent de prévoir l'inactivation d'une souche microbienne par un couple temps/température donné.

D_T , temps de réduction décimale, est défini comme la durée de traitement thermique, exprimée généralement en minutes, nécessaire à la température T pour diviser par dix la charge microbienne.

Le paramètre z est l'élévation de température en °C réduisant D_T d'un facteur 10. Dans la pratique, cela signifie que lorsque la température augmente de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est divisé par 10. À l'inverse, lorsque la température est réduite de z °C, le temps nécessaire pour obtenir le même résultat en termes de destruction bactérienne est multiplié par 10.

Les formes sporulées ont, en général, un z compris entre 7 et 14°C et les formes végétatives un z compris entre 4 et 7°C pour des traitements thermiques en milieu humide. Le milieu dans lequel les micro-organismes sont étudiés peut modifier la valeur de z , beaucoup plus élevée pour des traitements thermiques en milieu sec.

La résistance à la chaleur en milieu humide des spores de *C. botulinum* est très bien documentée, et ce depuis le début du XX^{ème} siècle pour les spores des souches du groupe I (*C. botulinum* protéolytique, types A, B et F). Des méta-analyses récentes donnent une vision synthétique des paramètres D et z . Ainsi, $D_{121^\circ\text{C}}$ est estimé, à partir de 394 données, à 0,19 min pour les spores des *C. botulinum* protéolytiques, avec une valeur de z de 11,3°C (Diao *et al.* 2014). Pour les spores de *C. botulinum* non protéolytiques ($n = 549$), les estimations de $D_{80^\circ\text{C}}$ pour les types non protéolytiques B, E et F sont comprises entre 1 min et 1,5 min avec des valeurs de z comprises entre 6,5°C et 6,9°C (Wachnicka *et al.* 2016).

Les seules valeurs disponibles pour les spores des souches du Groupe III ont été publiées par Segner et Schmidt (1971) : les estimations de $D_{101^\circ\text{C}}$ pour les souches de type C testées sont comprises entre 0,07 et 2,44 min avec des valeurs de z comprises entre 5,0 et 6,2°C. Ces paramètres de résistance suggèrent une résistance bien supérieure à celle des spores des *C. botulinum* non protéolytiques (Groupe II), mais également très inférieure à celle des spores des *C. botulinum* protéolytiques (Groupe I).

Le tableau ww propose une estimation des temps de réduction décimale (D) en milieu aqueux de *Clostridium botulinum* des groupes I, II et III à des températures comprises entre 70°C et 120°C. Elles n'ont aucune pertinence pour estimer la résistance des spores dans un milieu à faible a_w .

Les valeurs de D aux différentes températures $T(D_T)$ ont été calculées à partir de valeurs D_{ref} , T_{ref} et z recueillies dans plusieurs sources documentaires et en utilisant le modèle dit « de

Bigelow » :
$$D_T = D_{ref} * 10^{\frac{T_{ref}-T}{z}}$$

Les estimations présentées dans le tableau résultent de fortes extrapolations (i.e. des estimations de valeurs de D_T à des températures près de 30°C inférieures ou supérieures aux domaines de températures où elles ont été acquises expérimentalement). Cependant, les modèles de Bigelow et l'équation d'Arrhénius semblent converger sur un domaine de température bien plus large que la gamme 70°C – 120°C considérée ici (André *et al.* 2019). En conséquence, les extrapolations des valeurs de D_T doivent être considérées avec prudence, mais, en l'absence de données expérimentales, ce sont des estimations raisonnables de la résistance à certaines températures. Par exemple, les estimations de $D_{70^\circ\text{C}}$

(> 12 h pour tous les groupes) suggèrent qu'un traitement d'une heure à 70°C n'aura quasiment aucun effet sur les spores des groupes I, II et III.

Temps de réduction décimale théoriques des *Clostridium botulinum* des groupes I, II et III à des températures comprises entre 70°C et 120°C.

Température T (°C)	Valeurs de D (min) à la température T sous différentes hypothèses de T_{ref} , D_{ref} et z				
	Référence	Groupe I (Lund et Peck 2013)	Groupe I (Diao <i>et al.</i> 2014)	Groupe II* (ACMSF 2020)	Groupe III, type C (Segner et Schmidt 1971)
D_{ref}^{**} (min)		0,21	0,19	10	0,71 ^{***}
T_{ref}^{**} (°C)		121,2	121,2	90	101
z (°C) ^{**}		10	11,3	6,7	10 ^{***} 5,7 ^{****}
120		0,28	0,24	-	0,01 0,00
110		2,8	1,9	-	0,09 0,02
100		28	14	0,32	0,89 1,1
90		277	110	10	8,9 60
80		2770	841	311	89 3400
70		28000	6450	9700	893 195000

* Traitement thermique permettant au moins six réductions logarithmiques de *C. botulinum* groupe II, en absence d'autres facteurs de maîtrise.

** D_{ref} est le temps de réduction décimale à la température T_{ref} et z l'élévation de température en °C réduisant D_T d'un facteur 10

***Moyenne des valeurs de $D_{101°C}$, n=6 (Segner et Schmidt 1971). Valeur de z estimée sur l'ensemble des données de la publication.

****La valeur de z la plus élevée communiquée par Segner et Schmidt (1971)

Annexe 3 : Perte d'activité des toxines botuliques de types C et D dans différents milieux et en fonction de la température

Type de toxine	Matrice	Température °C	Durée	Perte d'activité* (%)
C ⁽¹⁾	Non précisée	70	2 min	90
C ⁽¹⁾	Non précisée	80	2 min	99
C ⁽¹⁾	Non précisée	90	2 min	100
C ⁽²⁾	Eau du robinet pH non précisé	TA	6 jours	80
C ⁽³⁾	Eau d'un lac pH non précisé	TA	97 jours	10
C ⁽³⁾	Eau d'un lac pH non précisé	TA	344 jours	99
C ⁽⁴⁾	Contenu gastro-intestinal dilué en sérum physiologique pH 6,5	-70	> 5 ans	90
		-20	> 5 ans	99
		5	30 jours	90
		5	6 mois	99
		20	3 jours	90
		20	21 jours	99
		28	2 jours	90
		28	14 jours	99
		37	1 jour	90
		37	2 jours	99
		42	5 h	90
		42	9 h	99
		56	< 30 min	99
		60	< 20 min	99
80	< 5 min	99		
D ⁽¹⁾	Non précisée	80	2 min	0
D ⁽¹⁾	Non précisée	90	2 min	100
D ⁽²⁾	Eau du robinet pH non précisé	TA	3 jours	80

* La perte d'activité a été évaluée par un test de létalité souris. TA : température ambiante.

(1) Prévot et Brygoo (1953), (2) Brygoo (1953) (3) Graham *et al.* (1978) (4) Hubálek et Halouzka (1988)

Annexe 4 : Estimation qualitative de la probabilité de survenue de l'évènement indésirable (contamination) résultant du croisement entre la probabilité d'émission et la probabilité d'exposition

		Probabilité d'émission										
		N	QN	M	EF	TF	F	PE	AE	E	TE	
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Probabilité d'exposition	N	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	QN	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	M	2	0	1	1	1	1	2	2	2	2	2
	EF	3	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3
	TF	4	0	1	1	2	2	3	3	3	4	4
	F	5	0	1	2	2	3	3	4	4	5	5
	PE	6	0	1	2	2	3	4	5	5	6	6
	AE	7	0	1	2	3	3	4	5	6	7	7
	E	8	0	1	2	3	4	5	6	7	8	8
	TE	9	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9

N=Nulle, QN=Quasi-nulle, M=Minime, EF=Extrêmement faible, TF=Très faible, F=Faible, PE=Peu élevée, AE=Assez élevée, E=Élevée, TE= Très élevée

Annexe 5 : Probabilités de survenue de l'évènement indésirable (contamination) résultant du croisement des probabilités d'émission et des probabilités d'exposition

Tableau I : Suite à l'épandage des effluents de volailles contaminés, après stockage

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement (litière, fumier, fientes ou lisier)	Herbe sur pied (pâturée)	8	0	0	9	8	0	0	9	8	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[2-4]	9	[2-4]	9	[2-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[7-8]	9	[7-8]	9	[7-8]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[2-4]	9	[2-4]	9	[2-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare...)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0	
Épandage avec enfouissement ou par injection (si lisier)	Herbe sur pied (pâturée)	[4-6]	0	0	9	[4-6]	0	0	9	[4-6]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[3-7]	9	[3-7]	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare...)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0	

Tableau II : Suite à l'épandage des effluents de volailles contaminés, après compostage

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement	Herbe sur pied (pâturée)	[6-7]	0	0	9	[6-7]	0	0	9	[6-7]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[5-6]	9	[5-6]	9	[5-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0	
Épandage avec enfouissement	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0

Tableau III : Suite à l'épandage des effluents de volailles contaminés, après méthanisation

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement	Herbe sur pied (pâturée)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[5-7]	9	[5-7]	9	[5-7]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	9	[2-3]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0
Épandage avec enfouissement ou par injection	Herbe sur pied (pâturée)	[3-6]	0	0	9	[3-6]	0	0	9	[3-6]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[2-6]	9	[2-6]	9	[2-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	9	[1-3]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	9	[6-8]	0	0	0	0	0	0

Tableau IV : Suite à l'épandage des effluents de bovins contaminés, après stockage

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement (litière, fumier ou lisier)	Herbe sur pied (pâturée)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[3-7]	9	[3-7]	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0	9	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-3]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	
Épandage avec enfouissement ou par injection (si lisier)	Herbe sur pied (pâturée)	[2-6]	0	0	9	[2-6]	0	0	9	[2-6]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[2-6]	9	[2-6]	9	[2-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	1	9	1	9	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0	9	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-2]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	

Tableau V : Suite à l'épandage des effluents de bovins contaminés, après compostage

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement	Herbe sur pied (pâturée)	[2-6]	0	0	9	[2-6]	0	0	9	[2-6]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[2-6]	9	[2-6]	9	[2-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-4]	9	[1-4]	9	[1-4]	0	0	9	[1-4]	9	[1-4]	9	[1-4]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-3]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-3]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare...)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	
Épandage avec enfouissement	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	1	9	1	9	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	1	9	1	9	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-4]	9	[1-4]	9	[1-4]	0	0	9	[1-4]	9	[1-4]	9	[1-4]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	1
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Eaux stagnantes (Etang, mare...)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0

Tableau VI : Suite à l'épandage des effluents de bovins contaminés, après méthanisation

Mode d'épandage	Probabilité d'émission		Probabilités d'exposition (Exp.) à une matrice contaminée et de survenue de l'évènement indésirable (Sur.) pour des organismes exposés													
	matrice	Émission	Bovins en stabulation		Bovins avec accès au pâturage		Volailles en bâtiment		Volailles avec parcours extérieur		Riverains exposés à la poussière de l'épandage		Personnes réalisant l'épandage		Consommation humaine	
			Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.	Exp.	Sur.
Épandage sans enfouissement	Herbe sur pied (pâturée)	[2-7]	0	0	9	[2-7]	0	0	9	[2-7]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[2-7]	9	[2-7]	9	[2-7]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	9	[1-7]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0	9	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-4]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-4]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	
Épandage avec enfouissement ou par injection	Herbe sur pied (pâturée)	[1-5]	0	0	9	[1-5]	0	0	9	[1-5]	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Bonne qualité)	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Enrubanné / ensilage d'herbe (Mauvaise qualité)	[2-5]	9	[2-5]	9	[2-5]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Foin	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Maïs grain, ensilage maïs, végétaux cultivés (alimentation animale)	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	9	[1-2]	0	0	0	0	0	0
	Contamination secondaire d'un aliment / litière contaminé par avifaune	1	9	1	9	1	9	1	9	1	0	0	0	0	0	0
	Poussières et aérosols au cours de l'épandage	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0	9	[1-5]	9	[1-5]	9	[1-5]	0	0
	Grandes cultures (céréales, oléagineux...) (consommation humaine)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Légumes issus des cultures maraîchères	[1-2]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	9	[1-2]
	Eaux courantes (rivière, fleuve...)	[1-6]	0	0	9	[1-6]	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Eaux stagnantes (Etang, mare..)	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	9	[3-7]	0	0	0	0	0	0	

Notes



anses

CONNAÎTRE, ÉVALUER, PROTÉGER

AGENCE NATIONALE DE SÉCURITÉ SANITAIRE
de l'alimentation, de l'environnement et du travail

14 rue Pierre et Marie Curie 94701 Maisons-Alfort Cedex
Tél : 01 42 76 40 40
www.anses.fr — @Anses_fr