

Techniques de Contrôle Microbiologique

Introduction

Les produits alimentaires contiennent généralement des microorganismes. Certains sont indispensables, car ils participent à l'élaboration ou à la transformation de l'aliment, assurent le développement de qualités organoleptiques particulières ou participent à sa conservation. Ils sont souvent issus de la flore normale de la matière alimentaire brute. D'autres germes sont néfastes pour la qualité propre de l'aliment au niveau de la fabrication ou de la conservation. Ce sont les germes banaux de contamination qui peuvent poser de graves problèmes dans l'industrie. D'autres enfin sont dangereux du point de vue sanitaire et peuvent causer des troubles graves chez le consommateur : il s'agit de germes pathogènes.

Les germes utiles, levures et bactéries lactiques essentiellement n'ont pratiquement jamais été impliqués dans des accidents d'ordre sanitaire. Du point de vue de la qualité de l'aliment, de la transformation duquel ils sont spécifiques ; ils peuvent entraîner des dommages industriels si leur utilisation est mal contrôlée.

Les germes banaux de contamination, ne participant pas aux fermentations utiles des produits fermentés, peuvent avoir des actions néfastes variées qui affectent la valeur alimentaire et commerciale des produits :

- ❖ Modification de texture et d'aspect par dégradation des macromolécules ou des substances colorantes, par formation de colorations parasites, par libération de gaz, etc...
- ❖ Altération de la valeur calorique et alimentaire par transformation de molécules à haute valeur énergétique en molécules à faible valeur ou en eau et en gaz carbonique.
- ❖ Altération des qualités organoleptiques par libération de substances organiques volatiles ou non, qui affectent le goût et l'odeur.
- ❖ Dégradation du conditionnement, par exemple le gonflement des emballages dû aux gaz libérés.

Ces germes peuvent aussi dans certaines conditions se révéler dangereux pour la santé en étant responsables d'intoxications dues à la formation de substances toxiques (histamines) par dégradation de l'aliment, ou responsable d'infection ou toxi-infection intestinales bénignes. De ce fait, le facteur quantitatif va donc intervenir au niveau de l'analyse pour cette flore.

Les germes pathogènes ayant de graves conséquences sur la santé ne pourront être tolérés même en petite quantité. Le contrôle à appliquer n'a pas besoin d'être quantitatif ; il suffit qu'il soit qualitatif, c'est-à-dire que l'absence de germes particulièrement dangereux soit démontrée dans l'aliment par une technique spécifique. Le problème quantitatif se posera cependant pour la définition de la quantité de produit alimentaire à analyser.

L'analyse des produits alimentaires peut être réalisée selon diverses optiques :

- 1. Contrôle industriel des matières alimentaires brutes :** il importe essentiellement de connaître la charge microbienne globale des produits sans identification des espèces et d'évaluer la valeur sanitaire par recherche des germes pathogènes en cas de risques graves ;

- 2. Contrôle de fabrication au niveau d'une chaîne industrielle :** l'identification de la flore banale de contamination ou le contrôle de l'action d'une flore de fabrication par dénombrement spécifique devront être ici ajoutés. Les études pourront être réalisées sur les produits alimentaires mais aussi sur les appareils, instruments, eaux de traitement et emballages (bouteilles vides par exemple). Les méthodes d'analyse seront relativement libres dans les deux cas ;
- 3. Contrôle des produits finis réalisés par l'industriel afin de respecter les dispositions légales.** Cette analyse peut être une analyse systématique dans le but d'assurer la maîtrise et le contrôle de la qualité ou sporadique pour vérification dans le cadre de l'option assurance gestion de la qualité ;
- 4. Contrôle des produits finis à l'usine ou au niveau de la distribution par le Service de la Répression des Fraudes et du Contrôle de la Qualité ou tout autre service officiel.** L'analyse à réaliser est alors complète, recouvrant les aspects de qualité commerciale et sanitaire ;
- 5. Contrôle des produits livrés à la consommation incriminés dans une intoxication par les Services d'Hygiène et d'Action Sanitaire.**

L'analyse microbiologique varie également en fonction du type d'aliment, du danger potentiel qu'il représente, des contaminants possibles, de ses caractéristiques de conservation, de consommation (cru ou cuit), etc. Les principes généraux sont cependant toujours les mêmes.

I. Le but de l'analyse

La qualité bactériologique d'un produit alimentaire présente deux aspects :

- La qualité hygiénique qui caractérise le risque pour la santé du consommateur.
 - La qualité commerciale qui caractérise l'existence ou le risque d'altération du produit.
- La maîtrise de cette qualité implique de bonnes pratiques de fabrication, de stockage et de distribution.

Le but de l'analyse microbiologique des aliments est de :

- S'assurer que le niveau de contamination du produit apte à être consommer ne présente aucun risque de prolifération bactérienne et surtout aucun danger pour la santé du consommateur.
- De conférer à l'aliment une protection intrinsèque contre la prolifération microbienne.

L'activité au sein du service de Bactériologie des aliments est très diverse. Il s'agit de contrôler :

- Les aliments produits au sein des unités de production, et les produits importés inspectés et échantillonnés par les vétérinaires inspecteurs aux postes frontières donc les produits finis. L'objectif est de vérifier la conformité du produit à des critères microbiologiques.

L'analyse consiste à :

- La recherche des micro-organismes responsables d'altération qui regroupent les germes capables d'altérer la qualité marchande de l'aliment (Flore aérobie totale, ASR, levures et moisissures.) ;

- Les germes témoins de contamination fécale (Coliformes totaux, coliformes fécaux, *Streptocoque D*) ;
- Le deuxième type d'analyse consiste à mettre en évidence les germes suspects d'être à l'origine de toxi-infections alimentaires (*Staphylococcus aureus*, *Salmonella mineurs*, *Campylobacter jejuni*, *Clostridium perfringens*, etc...). L'analyse se limite à prendre en charge le plat témoin et à rechercher les germes qui sont potentiellement pathogènes pour le consommateur.
- Le troisième type de contrôle touche les produits en cours de fabrication ou de préparation (cuisines) ou bien la vérification de l'état hygiénique des lieux de fabrication, de stockage. Pour ces produits des examens en cours de fabrication ou du produit fini sont intéressants et utiles dans un cadre préventif.

I.1. Rôle et signification des microorganismes dans les aliments

I.1.1. Sources primaires de microorganismes

Les aliments sont d'origine végétale et/ou animale : la flore normalement associée aux plantes et aux animaux est donc potentiellement présente. De plus, un apport microbien exogène est souvent inévitable (environnement, contact, manipulations, etc...).

a. Sol et eau

Bactéries : *Achromabacter*, *Enterobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Corynebacterium*, *Micrococcus*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Sarcina*, *Streptomyces*, etc...

Moisissures : *Aspergillus* ; *Rhizopus*, *Penicillium*, *Trichothecium*, *Bothrytis*, *Fusarium* etc...

Levures : *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torula* etc. souvent associées aux plantes donc dans le sol.

b. Plantes et produits dérivés

Le sol et l'eau sont les sources primaires des microorganismes des plantes (cf. ci-dessus) avec en plus des flores spécifiques :

Bactéries : *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Flavobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Paracolobactrum*, etc...

Moisissures : genres responsables de dégradations des fruits et végétaux

Levures : *Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Torula*, etc...

c. Animaux et produits dérivés

Le tractus intestinal de l'homme ou des animaux contient jusqu'à 10^{11} germes par g (gros intestin) : parmi les bactéries les plus fréquentes : *Bifidobacterium* (*Lactobacillus bifidus*), *Bacteroides*, *Escherichia*, *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Paracolobactrum*, *Pseudomonas*. Parmi les levures *Candida*, etc...

Les moisissures ne sont pas transmises par voie fécale. A partir du tractus digestif ces microorganismes se retrouvent souvent dans les eaux et le sol à partir desquels ils contaminent les plantes. Rappelons que la charge microbienne totale d'un homme sain est voisine de 10^{17} à 10^{19} .

La flore microbienne de la peau des animaux ou des manipulateurs (mains surtout) est fonction de l'environnement (sol, poussière, air, eau etc.) et de l'hygiène. Les charges microbiennes atteignent facilement des valeurs comprises entre 10^4 et 10^6 par cm^2 .

Gaffkya, Sarcina, Staphylococcus sont des hôtes fréquents de la main, du nez et de la bouche. Les cheveux sont de véritables “filtres à air” et leur flore dominante est donc celle de l’air et des poussières.

Si les conditions d’hygiène sont mal respectées, des microorganismes d’origine intestinale sont susceptibles d’être introduits dans nos aliments. La contamination des vêtements et ustensiles est fonction de l’environnement et des modes de contact.

d. Air et poussière

La plupart des bactéries et des moisissures et de très nombreuses levures y sont présentes.
Bactéries : *Bacillus, Sarcina, Micrococcus* sont fréquentes car résistantes aux basses HR
Moisissures : *Torulopsis*, etc.

e. Produits fermentés

Le développement contrôlé d’un ou plusieurs microorganismes dans une matière première donnée d’origine animale (lait, viande) ou végétale (choux, jus de fruit) permet d’obtenir des produits dont les propriétés physico-chimiques sont modifiées (texture, goût, couleur, odeur, pH, etc.).

De nombreux produits traditionnels sont obtenus après fermentation, la charge microbienne résiduelle étant très grande (lait fermenté) ou relativement faible (boissons fermentées).

Produits traditionnels : laits fermentés, fromages, charcuterie, choucroute, boissons fermentées.

Bactéries : *Lactobacillus, Streptococcus, Acetobacter*.

Levures : *Saccharomyces* et **moisissures** : *Penicillium, Aspergillus* dans les phénomènes de succession de flores.

f. Microorganismes aliments

Il s’agit de microorganismes cultivés le plus souvent sur des substrats issus de l’industrie pétro-chimique (*Candida, Pseudomonas, Spirulina*, etc..).

Rappelons que *Saccharomyces cerevisiae* est communément consommé sous forme séchée.

g. Contamination par les microorganismes de l’usine et son environnement

Lors des opérations de traitement et de transformation des aliments, ces produits sont contaminés par les microorganismes de l’environnement de l’usine, les produits donc sont re-contaminés par les germes du sol, l’air et de l’eau, auquelle s’ajoute d’autres facteurs de contamination qui sont propre à l’usine (surfaces, machines, ustensile ou personnel).

h. Evaluation des contaminations au cours des opérations technologiques

Les opérations technologiques modifient directement de façon quantitative et qualitative la flore des aliments, elles font varier les paramètres physico-chimiques du milieu : la composition, la température, AW, le potentiel red/ox, pH, qui ont une incidence direct sur la croissance et sur la sélection des germes présents dans le produit.

D’autres traitements utilisent des levains pour objectif l’implantation d’une flore fermentaire. On recherche ici une transformation microbiologique du produit.

La flore fermentaire devienne dominante (Bactéries lactiques, levures) et la flore banale et pathogène est fortement réduite c’est le cas des produits laitier fermentés, panifier et des salaisons.

i. Contaminations au cours de stockage, transport et commercialisation

Les produits à la sortie de l'usine doivent être protégés par les emballages qui empêchent toutes recontaminations.

La remontée de la température empêche la croissance des germes d'altération pathogène dans le produit réfrigéré : L'abaissement de la température permet la croissance des germes d'altération pathogène.

I.2. Les altérations microbiennes des aliments

I.2.1. Contamination “naturelle” suivie soit de la mort, de la survie ou de la prolifération des germes.

La charge microbienne “normale” de la plupart de nos aliments est de l'ordre de 10^4 UFC/g. Il y a **mort** quand les microorganismes ne trouvent pas dans l'aliment les conditions nécessaires à leur croissance (conditions physico-chimiques et nutritionnelles, composition, conditions d'entreposage, traitements antimicrobiens...).

La **survie** des microorganismes est liée à des conditions n'engendrant pas la mort mais ne permettant pas la multiplication (composition, froid ...).

Il y a prolifération quand les microorganismes trouvent les conditions nécessaires à leur croissance. Dans ce cas généralement défavorable il y a altération de la qualité marchande si les germes sont saprophytes et altération de la qualité sanitaire (et parfois marchande) si les germes sont “pathogènes”.

La notion de charge microbienne en relation avec la qualité du produit est fonction de la nature du produit et de la nature du germe présent.

I.2.2. Incidences sur la qualité marchande (modifications des qualités organoleptiques)

La prolifération de microorganismes dans un produit alimentaire se traduit par des modifications des qualités organoleptiques généralement détectables quand le nombre de germes dépasse les 10^6 par g de produit. Les modifications d'aspect (couleur, limon), de texture ou de flaveur (odeur et saveur) sont souvent défavorables : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Moraxella*, *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Flavobacterium*, *Clostridium*. Parfois cette prolifération engendre des modifications souhaitées (bière, vin, saucisson, beurre, fromages, yaourt, choucroute).

a) Modifications de l'odeur

Le développement de microorganismes dans un produit est d'abord détecté par des modifications d'odeurs en raison de la sensibilité de notre système olfactif. Le seuil de détection de composés organiques volatiles se situe en moyenne à 10^{-6} - 10^{-9} g (10^{-12} pour des dérivés de la pirazine).

Généralement, ces modifications sont biphasiques :

- 1) Une grande partie de l'aliment est transformée en un produit dominant (acide acétique - éthanol) : il peut s'agir d'une altération (aigre...) ou d'une transformation souhaitée.
- 2) Production d'odeurs caractéristiques liées à des composés organiques volatiles (odeur - goût) ou non (goût). Le seuil de détection de ces composés odorants varie de 10^{-6} à 10^{-12} g (dérivés de la pirazine).

Ces composés contribuent à la qualité de certains produits fermentés (vins, fromages) ou à la dépréciation quand ces odeurs sont désagréables (odeurs de relent, d'ammoniac, de mercaptans, d'amines, etc...). Les composés odorants produits par les microorganismes sont pour la plupart d'entre eux détectés quand la charge microbienne atteint 10^6 à 10^7 germes/g.

Il n'est généralement pas possible d'attribuer à chaque microorganisme la genèse d'une odeur particulière. Cette production est fonction de la composition d'aliment, de la température, de la souche etc. Néanmoins les moisissures engendrent souvent une odeur de moisi (complexe) ou de rance tandis que les bactéries génèrent des odeurs agréables, fruitées ou désagréables.

Pseudomonas : odeur de tilleul (milieux pauvres en matières organiques) ;

Achromobacter ou *Flavobacterium* : odeur de pomme ou de navet (bière) ;

Bacillus subtilis : odeur de melon pourri ;

Streptomyces : odeur de moisi.

* viandes : un développement microbien en surface se traduit par une odeur de relent à partir de 10^7 germes/g.

* poissons : la putréfaction génère des odeurs ammoniacales (formation de triméthylamine, de mercaptan, de diméthylsulfure, H₂S etc...).

* fromages : *Cl. butyricum* synthétise de l'acide butyrique à odeur désagréable caractéristique. Une odeur ammoniacale survient après protéolyse.

b) Modifications du goût

Elles sont liées à la présence de **composés volatils** ou **non**.

La plus fréquente correspond à une acidification liée à la production d'acide lactique. Cette modification est favorable avec certains produits (fromages, choucroute, saucisson). Dans le cas du vinaigre c'est l'acide acétique qui est produit.

Certains des goûts liés de quelques microorganismes sont décrits ci-après :

Goût de noisette : *Leuconostoc citrovorum* : diacétyle : beurre.

Ce même microorganisme induit un goût de margarine dans les jus d'agrume

Rancissement : *Pseudomonas*

Goût de malt : levures dans le lait

Goût caramélisé : levures ou *Streptococcus lactis* var. maltigenes dans le lait

Goût alcoolisé : levures

Goût douçâtre : levures (production de mannitol) : vin

Goût crayeux : levures (*Endomycopsis* ou *Trichosporum*) : pain

Goût amer : *Pediococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* transforment le glycérol en acroléine qui se combine avec des polyphénols : bière.

Goût piquant : production de CO₂

Goûts fruités (biotransformations).

c) Modifications de l'aspect et de la couleur

Ces modifications sont chronologiquement détectables visuellement bien après l'apparition d'odeurs. Dans une première phase il s'agit de petites zones qui présentent des caractéristiques variables quant à leur forme (rondes, plates, bombées, irrégulières...).

Leur **aspect** (opaque, mat, brillant, rugueux...) et/ou leur couleur (blanc, noir, jaune, rouge...) sont multiples. Ces zones sont constituées de bactéries, levures et de sécrétions muqueuses qui s'étendent à la surface de l'aliment et forment un revêtement souvent gluant, visqueux et poisseux : cette phase est qualifiée de **poissage**.

Les modifications de **couleur** résultent d'un ou plusieurs phénomènes :

- **synthèse d'un ou plusieurs pigments** par le microorganisme. Toutes les couleurs sont possibles (blanc -noir - bleu - vert - jaune - rouge..). Les genres producteurs de pigments les plus souvent rencontrés sont : *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Chromobacterium*, *Serratia*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Rhodotorula*.
- **transformation d'un pigment endogène** à l'aliment. Oxydation du carotène (perte de la couleur orange de nombreux produits végétaux).
- **destructions** cellulaires mettant en contact enzyme et substrat. Ce phénomène est courant chez les produits végétaux.
- **production d'un composant réactif et chromogène** (H_2S générant des sulfures divers noirs).

d) Structure et texture

La structure d'un produit alimentaire est liée à la présence de macromolécules comme les pectines, celluloses, hémicelluloses (amidon et protéines) chez les produits végétaux et les protéines chez les produits animaux.

Si les microorganismes contaminants synthétisent et excrètent des hydrolases (pectinases, protéases etc...) un ramollissement apparaît. Pour un germe donné, ce ramollissement est d'autant plus grand que la charge microbienne est élevée :

* Phénomène recherché (faisandage (= dégradation ou décomposition) par protéolyse ; éclaircissement des jus de fruits par pectinases)

* Phénomène défavorable : pertes de forme etc...

La production de gaz (CO_2 le plus souvent) induit la formation de fissures ou de bulles et altère les emballages.

La synthèse de polymères (dextrans à partir de saccharose avec *Leuconostoc*) augmente la viscosité de certains sirops ou jus.

e) Modification de la valeur alimentaire

Dans le cas de produits obtenus par fermentation, la structure, les qualités hygiéniques, organoleptiques et nutritionnelles sont actuellement bien contrôlées. **Les microorganismes intervenant dans ces processus consomment des molécules à valeur énergétique élevée ou la valeur calorique des produits fermentés est donc généralement inférieure à celle du produit initial.**

Ces mêmes microorganismes ont un rôle favorable en synthétisant des molécules à activité biologique comme des vitamines ou encore en catabolisant **des produits toxiques** ou **antinutritionnels** (glucides non fermentescibles C1-C6 : stachyose, protéines toxiques).

Pour la plupart de nos aliments, le développement d'une flore microbienne superficielle se fait à partir de glucides simples et d'azote non protéique. Ainsi dans le cas des viandes et poissons, l'altération de surface se traduisant par la formation de limon (poisse) et d'odeurs caractéristiques n'est pratiquement pas accompagnée de protéolyse, donc d'une modification sensible de valeur nutritionnelle jusqu'à 10^9 germes/cm². Quand des phénomènes de protéolyse apparaissent, ils sont suivis par la formation de dérivés d'acides aminés qui confèrent aux produits des odeurs, goûts et textures tels, qu'ils deviennent inconsommables.

Les **toxi-infections** sont produites par de très nombreux germes et correspondent à l'ingestion d'un produit alimentaire dans lequel la prolifération des microorganismes atteint 10^6 à 10^7 par gramme. La formation de métabolites toxiques à partir de protides est fréquente.

Les **intoxinations** résultent de l'ingestion d'une toxine préformée dans l'aliment. Il s'agit essentiellement des intoxications botuliniques, staphylococciques et à *Bacillus cereus*. Les microorganismes synthétisent ces toxines de nature protéique au cours de la phase exponentielle de croissance (*Clostridium botulinum*) ou en fin de cette phase (*S. aureus*).

Dans le cas de l'intoxination botulinique, le risque pour la santé du consommateur étant extrêmement grand, aucune norme ne peut permettre de contrôler l'innocuité du produit. Dans ce cas, il faut donc adopter des conditions de fabrication - conservation qui garantissent de façon absolue la qualité sanitaire du produit.

I.3. Expertise

Pour estimer la qualité d'un produit il est nécessaire de considérer les caractéristiques microbiologiques des matières premières, puis des produits finis, car les matières premières subissent un certain nombre de transformation pouvant modifier leur qualité, de la nécessité de considérer également la qualité de transformation. Donc les contrôles se font à plusieurs niveaux :

- ❖ Contrôle de la matière première ;
- ❖ Surveillance médical du personnel ;
- ❖ Surveillance de la chaîne de fabrication (prélèvements et contrôles) ;
- ❖ Contrôle sur le produit fini ;
- ❖ Contrôle de la charge microbienne du matériel et de l'environnement (air, eau), de l'efficacité du nettoyage ;
- ❖ Surveillance des conditions de stockage.
- ❖ Il peut s'agir également d'un autocontrôle réalisé par l'Enterprise en vérifiant la qualité des aliments et produits de consommation qu'elles produisent et en les assistants technique, ou sous-traité à un laboratoire compétent et/ou agréer (laboratoire du RNE « réseau national d'essais », laboratoire de la répression des fraudes, etc.), les activités de ce laboratoire contribuent ainsi à améliorer la qualité des produits et à permettre le développement de nouveaux projets.

I.4. Prévention

La prévention doit se faire à différents niveaux :

✓ Au niveau de la conception de l'usine

Aménagement de locaux incluant éventuellement des salles « microbiologiquement maîtrisées » et la sectorisation en fonction des risques « **marche en avant** » du produit sans recoupement des circuits, isolement des zones « matières premières », « produits finis » et « déchets » ; choix du matériel (facilement stérilisable) ; soit apporté à la distribution et à la qualité des fluides, air et eau (traitement, filtration), ou chauffage et à la climatisation, à l'élimination et/ou traitement des eaux usées et des déchets.

✓ Au niveau du personnel

Qui doit être compétent, informé et doit respecter les règles d'hygiènes : port de vêtements de protection, gants, masques, calottes, bottes ; nettoyage des mains, usage du pédiluve, etc.

✓ Au niveau du fonctionnement

Nettoyage soigné des locaux, du matériel avec désinfection si nécessaire, techniques de fabrication bien ou point, contrôle des surfaces, contrôle de l'hygiène de manipulation (propreté, perte de mauvaises habitudes, conscience professionnelle) avec surveillance si nécessaire, contrôle de l'humidité et de la température, etc...

- ❖ Audit interne, et éventuellement externe, de qualité et d'hygiène.
- ❖ Mis en place un système assurance/qualité HACCP et certification.

II. Les objectifs du contrôle microbiologique

L'objectif de l'analyse microbiologique est d'une part de rechercher ou de quantifier un certain nombre de germes indicateurs d'un ou plusieurs problèmes lors du procédé de fabrication ou présentant un danger pour la santé humaine, d'autre part, elle permet d'évaluer la propreté des surfaces de travail, la bonne hygiène des opérateurs ou encore la qualité de l'eau entrant dans le procédé de fabrication. C'est donc l'analyse microbiologique qui permettra de vérifier que le produit ne présente pas de risque pour la santé du consommateur lors de sa mise sur le marché, en prenant en considération la durée de vie, les conditions de conservation et de consommation et les constituants du produit c'est-à-dire les contrôles doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande de produit fabriqué et le troisième objectif est donc de garantir un bon rendement.

La qualité de produits alimentaires peut, au plan microbiologique, être définie de 2 façons :

II.1. La qualité marchande concerne essentiellement les caractéristiques organoleptiques et se traduit par un attrait ou une répugnance par les consommateurs. Ses incidences économiques sont déterminantes pour l'industrie alimentaire. Les caractéristiques nutritionnelles et technologiques de l'aliment contribuent à cette qualité.

II.1.1. La durée de vie : DLC ou DLUO

Dans le cas d'un aliment préemballé, la durée de vie est fixée sous la responsabilité du fabricant, qui doit tenir compte des conditions raisonnablement prévisibles de conservation, depuis sa fabrication jusqu'à sa consommation finale.

L'apposition d'une durée de vie sur les denrées a donc pour objectif de faire connaître au consommateur la limite au-delà de laquelle cet aliment peut être conservé sans être préjudiciable pour sa santé (notion de sécurité et d'innocuité) et/ou sans subir d'altération inacceptable (notion de salubrité).

La durée de vie microbiologique d'un aliment est la durée pendant laquelle le nombre de germes présents dans l'aliment est en-dessous de seuils fixés réglementairement ou déterminés par l'analyse des dangers propre à l'entreprise et au processus concerné.

Le terme **DLC** signifie « date limite de consommation » et se traduit sur l'étiquette par « *à consommer jusqu'au....* », suivie de l'indication du jour et du mois. La DLC indique une limite *impérative*. Elle s'applique à des denrées microbiologiquement *très périssables*, qui sont susceptibles de devenir rapidement dangereuses pour la santé humaine, du fait de leur instabilité microbiologique, et lorsque la température de conservation n'est pas maîtrisée.

La **DLUO** ou « date limite d'utilisation optimale » est exprimée sur les conditionnements par la mention « *à consommer de préférence avant le...* », complétée par le jour éventuellement, le mois et l'année. Elle s'applique aux produits non soumis à DLC, c'est-à-dire aux produits sur lesquels les germes pathogènes ou d'altération ne peuvent pas se développer à un niveau pouvant rendre l'aliment dangereux. Elle correspond donc à la date jusqu'à laquelle le produit conserve l'ensemble de ses qualités organoleptiques (aspect, texture, goût, odeur, etc...) (Tableau 1).

Tableau 1. Les différences entre DLC et DLUO (Bulletin numéro 4 d'information et de veille réglementaire de l'Atelier Technologique Agroalimentaire de FLORAC).

	DLC	DLUO
Exemple de produits concernés	Jus de fruits frais Salades composées Viande sous-vide ou en barquette Lait cru	Biscuits Jus de fruits pasteurisé Conerves de viande, de légumes Viandes séchées, fumées Fromages Produits surgelés
Mention sur l'étiquette	à consommer jusqu'au...	à consommer de préférence avant le...
Comment fixer la date	Analyses microbiologiques	Test de vieillissement en temps réel
Que faire si la date est dépassée	Retrait du marché à DLC	Possibilité de consommer

✓ Flores d'altération de la qualité marchande

La valeur marchande des aliments peut être affectée par la prolifération et l'action de microorganismes contaminants entraînant :

- La modification de l'aspect et de la texture du produit par digestion de macromolécules, par libération de gaz, par production de substances colorantes ;
- L'altération des caractéristiques organoleptiques par libération de substances, volatiles ou non, qui modifient le goût et l'odeur ;
- La détérioration du conditionnement par production de gaz (gonflement de l'emballage) ;
- La diminution de la valeur calorique et nutritionnelle par dégradation des molécules à haute valeur énergétique.

Une altération de la qualité marchande modifie la texture et la qualité organoleptique du produit, cette altération bien que généralement non dangereuse pour la santé du consommateur mais rend le produit non commercialisable. Cette altération survient lorsque la technologie mis en œuvre pour assurer la stabilité microbiologique a été déficiente. La nature des microorganismes de ces altérations dépend du type de produit et de la technologie mise en œuvre.

L'altération de la qualité marchande se produit longtemps au cours du stockage. Les contrôles microbiologiques ont pour objectif de détecter les microorganismes pouvant être responsable de ces altérations et vitrifier l'efficacité de technologie après application afin de stocker et de commercialiser des produits microbiologiquement stables.

II.2. La qualité hygiénique

L'innocuité d'un aliment correspond à une qualité seuil et la norme zéro défaut doit être atteinte pour certains systèmes aliment-microorganisme en particulier à partir du moment où la présence du microorganisme dans le produit risque d'avoir une incidence défavorable et parfois très grave sur la santé du consommateur. Une altération de la qualité hygiénique met en cause la santé des consommateurs. Le produit conduisant à des intoxications alimentaires de gravité diverse suivant la nature des microorganismes en cause, cette altération est invisible, elle est due à un développement de microorganismes pathogène fabriquant des toxines.

- ✓ La toxine est extraite dans le produit (Exotoxine) à partir d'une quantité de toxine, le produit est dangereux à consommer même si le microorganisme n'est plus vivant dans le produit, c'est le cas des staphylocoques pathogènes et de *Clostridium botulinum*.
- ✓ La toxine n'est pas extraite mais reste dans la cellule bactérienne (endotoxine), pour que le produit soit dangereux pour le consommateur, le microorganisme doit être présent et vivant c'est le cas des entérobactéries.

Pour les contrôles microbiologiques il s'agit donc d'éviter la présence des microorganismes pathogènes dans le produit fini pour détecter ces microorganismes s'ils sont présents dans les produits finis avant leur commercialisation.

II.3. La rentabilité

La rentabilité est la capacité d'une Entreprise à dégager des bénéfices à partir des moyens mis en œuvre. La longueur du délai de réponse d'une analyse microbiologique est un facteur gênant dans le contrôle industriel. L'analyse du produit fini permet de constater une défaillance et d'écartier le produit défectueux mais pas de remédier en temps utile à un incident de fabrication.

Dans l'industrie, le contrôle microbiologique doit donc permettre de surveiller la qualité du produit en cours de fabrication pour avoir l'assurance de détecter très rapidement une défaillance de façon à y remédier et éviter ainsi la perte du produit. Il s'agit de construire la qualité du produit en même temps que le produit lui-même. Le contrôle microbiologique à donc comme objectif de contrôler la qualité hygiénique et marchande des produits finis est encore plus de contrôler les conditions de fabrication ce qui permettre d'éviter la fabrication des produits défectueux perdus pour l'industriel.

Les produits doivent répondre à des exigences assurant la qualité commerciale. Pour être commercialisé, le produit alimentaire doit être conforme aux différents critères de la qualité :

- Nutritionnel : composition qualitative et quantitative en macronutriments (glucides, lipides, protides) et micronutriments (vitamines, oligoéléments), disponibilité de ces nutriments dans l'organisme ;
- Hygiénique : absence de composés toxiques ou de microorganismes susceptibles de nuire à la santé du consommateur ;
- Organoleptique : apparence (forme, couleur), flaveur (saveur), texture (consistance, résistance).

Pour ces trois critères, il convient de prendre en compte la stabilité du produit, imposant des conditions de stockage pour une bonne conservation ;

- Financier : le coût s'oppose souvent aux autres critères, il s'agit donc d'optimiser le rapport coût - qualité ;
- Technologique : ce critère prend en compte de nouveaux procédés qui doivent être bien maîtrisés pour permettre d'assurer la qualité.

Pendant de nombreuses années, le contrôle de cette qualité a consisté à vérifier l'innocuité des produits finis, c'est-à-dire leur conformité bactériologique et chimique avec la législation. Cet examen était effectué par le fabricant avant la distribution, et, éventuellement, par des laboratoires officiels de contrôle au niveau des détaillants.

Ce contrôle des produits finis présentait le désavantage majeur de nécessiter l'attente des résultats des analyses avant de pouvoir intervenir sur la chaîne de fabrication, ce qui entraînait un coût supplémentaire. Il devenait souhaitable de pouvoir anticiper d'éventuels résultats non satisfaisants par un procédé mieux adapté, ou d'intervenir sur le procédé par des rectifications en amont du produit fini. Il fallait donc effectuer des contrôles en cours de fabrication.

Les industries de production alimentaire ont donc commencé à développer un système qualité permettant d'assurer un produit fini conforme à la qualité définie pour ce produit par l'entreprise elle-même : en fonction de la qualité qu'elle souhaite pour le produit qu'elle fabrique elle convoit et réalise son procédé de fabrication en se référant au système qualité qu'elle a elle-même établi.

Aujourd'hui, pour les entreprises, le terme de qualité est donc employé avec un sens différent, il signifie : assurer la conformité d'un produit ou d'un service par rapport à ce qui a été prévu.

III. Politique de contrôle et assurance –qualité

III.1. Définitions

La qualité au sens de la norme ISO 8402 : « la qualité est l'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés (organoleptiques) ou implicites (par exemple la sécurité) ».

Pour un produit alimentaire, elle peut se décrire par la règle des 4 S (Satisfaction, Sécurité, Service, Santé).

Satisfaction : le produit alimentaire doit satisfaire le consommateur au niveau des sens : aspect, goût, odeur ... ; du prix, etc.

Service : dans ce critère, on pense à la praticité d'utilisation du produit, à son type de conditionnement et à son mode de distribution, etc.

Santé : ce critère se traduit par le besoin d'une nourriture plus naturelle et apparemment plus saine :

- Produits biologiques, sans conservateur, sans pesticide ;
- Produits plus riches : produits diététiques, produits enrichis en vitamines et en minéraux, etc.

Sécurité : la sécurité alimentaire se définit comme étant la maîtrise de la santé et de la sécurité du consommateur par :

- l'absence des contaminants naturels ou exogènes ;
- l'absence de pathogènes ;
- l'absence d'additifs à risque toxique.

L'audit qualité est un examen méthodique et indépendant en vue de déterminer si les activités et résultats relatifs à la qualité satisfait aux dispositions préétablies, et si ces dispositions sont mise en œuvre de façon efficace et apte à atteindre les objectifs.

- L'assurance qualité

A la différence du contrôle qualité qui est un simple constat de conformité ou de non-conformité fait au cours d'une inspection, l'assurance qualité est « un ensemble d'actions préétablies et systématiques permettant de s'assurer qu'un produit ou qu'un service satisfera aux exigences exprimées » (norme ISO 8402).

Le contrôle microbiologique occupe une place privilégiée dans les procédures de mise sous l'assurance –qualité. La mise sous l'assurance-qualité et la certification qui doit logiquement en découler implique le fonctionnement de l'activité concerné selon un mode bien précis conformément au nombre établit ISO 9000.

Il comporte quatre démarches en interactions :

- ❖ **L'évaluation** (par exemple d'un niveau de qualité existant) ;
- ❖ **La définition d'un objectif** (amélioration de la qualité) ;
- ❖ **La préparation** (mis en place de moyen nécessaire pour atteindre l'objectif retenu) ;
- ❖ **L'exécution** (réalisation de la production à l'aide des dispositifs mis en place).

C'est ce qu'on appelle le plan PDCA : le système qualité structuré selon les quatre étapes assure le maintien et l'amélioration du niveau de performance :

Signification de l'acronyme PDCA (Plan, Do, Check, Act)

P= Plan ou Planifier : définir ce que l'on va faire. Définir le plan projet, l'existant, les objectifs *must have ou nice to have*, les acteurs, les moyens, les jalons...

D = Do ou Développer : faire ce qui a été défini. La réalisation de l'œuvre. Durant cette étape, le responsable est la maîtrise d'œuvre.

C = Check ou Contrôler : contrôler que le travail (Do) correspond bien à ce qui était prévu (Plan). Cette étape utilise des moyens de contrôle divers, tels qu'indicateurs de performance... Cette étape est gérée par une cellule QA.

A = Act ou Ajuster. Dresser un bilan du projet. Lister les avantages et inconvénients de la solution, identifier les axes d'amélioration consiste à rechercher et mettre en œuvre les points d'améliorations. L'étape Act entraîne un nouveau projet et donc une nouvelle planification.

Assurance-qualité continue à être un élément compétitif pour les entreprises même dans l'environnement commercial où la certification fait sa partie et maintenant une pratique courante, l'avantage peut être obtenu par les exigences du système de la qualité de l'acheteur qui complète les exigences énormes de la série ISO 9000.

Le système **HACCP** (Hazard Analysis Critical Control Point) : ou en français **ADMPC** (=Analyse des dangers (risques) pour la maîtrise des points critiques), utilise une démarche de même type, en effet à chaque point critique en se basant sur des critères microbiologiques, on définit un niveau seuil des contaminations microbiologiques qui ne dépasse pas ce contrôle microbiologique, ou soit capable de passer au technique de laboratoire afin de l'évaluer. La maîtrise du point critique implique alors la mise en place d'un système de surveillance pour suivre l'évolution des critères par rapport à la valeur seuil retenue. Si la valeur seuil est dépassée on a recours à des procédures correctives.

Le contrôle microbiologique a donné deux fonctions distinguées :

- ❖ Evaluer la qualité, microbiologique d'un produit ou d'une matière première ;
- ❖ Maitriser un point critique sur une chaîne de production.

Dans le cas de produit fini l'analyse microbiologique à caractères hygiénique est réglementée, elle comprend la recherche de plusieurs catégories des microorganismes par les techniques de culture sur différents milieux sélectifs. Les délais d'incubation sont de 48h-5 jours suivant les microorganismes. Cette analyse permet d'éliminer les produits non conformes et aussi de protéger les consommateurs, en cours de fabrication ce type d'analyse n'est pas satisfaisant, en effet il est nécessaire de détecter les microorganismes spécifiques d'un danger ou d'un risque en fonction de produit ou des conditions de fabrication.

L'objectif principale est de détecter une défaillance dans le système de production afin de remédier le plus rapidement, l'analyse n'est donc plus un contrôle à posteriori mais un outil de maîtrise de la qualité pendant la fabrication faisant partie d'une boucle du contrôle.

Les critères à privilégier pour ce type d'analyse sont **la simplicité** de mise en œuvre et **la rapidité** des résultats. Il n'est pas nécessaire d'avoir une analyse complète sur les microorganismes de la réglementation mais il faut choisir **un indice** (un microorganisme ou un groupe de microorganismes) représentatif de la qualité microbiologique du produit ; dans le cas de traitement, de nettoyage/désinfection il est également impérative de pouvoir épaler l'efficacité de ces traitements avant la remise en route de la fabrication suivante.

III.2. Le niveau de contrôle

Il s'agit de contrôler les conditions de fabrication de produits défectueux perdus pour l'industriel. Il existe trois niveaux de contrôle :

- ❖ Les contrôles préventifs : effectués sur les matières premières et les différents adjutants ; Dans le cas où le processus fait intervenir une étape de fermentation des contrôles microbiologiques sur le levain sont nécessaire ;
- ❖ Contrôles en cours de fabrication comprennent les contrôles microbiologiques sur le produit lui-même mais aussi sur les facteurs ayant une influence sur la qualité de produit (comme l'hygiène des matériels, des locaux et du personnel), le nombre de contrôles est défini suivant la longueur de la chaîne de fabrication et les risques de contamination possible. C'est au cours de production qu'on permette de déterminer les points critiques ; il faut choisir la méthode d'analyse qui permet après interprétation de réagir sur la fabrication en amont par un véritable **feed-back** quant un défaut d'origine microbienne est détecté.
- ❖ Contrôles sur les produits finis qui sanctionnent la fabrication en déterminant la qualité microbiologique du produit fini et sa conformité aux normes.

Les méthodes d'analyse mise en œuvre doivent être **rapide, fiable, reproductibles** et si possible **simple** (et peu coûteuse), elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans nos aliments afin de maîtriser leur présence ou absence dans le cas de germes dangereux (responsable des maladies) et leur nombre dans le cas de germe peu dangereux, contaminant les produits alimentaires.

III.3. La fréquence des contrôles

Il n'y a pas de règles absolues quand la fréquence des contrôles à réaliser pour chaque type de fabrication, dans chaque usine, la fréquence à établir sur la base de l'existence et en fonction des moyens disponibles.

III.4. Les paramètres à contrôler

Les microorganismes à rechercher varient suivant la technologie et les caractéristiques physicochimiques du produit au cours de fabrication et du produit fini. Les microorganismes responsables de l'altération de la qualité hygiénique comme les genres témoins d'une contamination fécale (Entérobactéries), ou les germes pathogènes de contamination de manipulation (Staphylocoque), seront moins recherché dans les produits faisant intervenir une étape de biotechnologie que dans les autres produits alimentaires.

Certains produits par leur propriété physico-chimique (pH, activité de l'eau, alcool), ne permettent pas le développement de ces microorganismes. Cependant dans certains produits : lait fermenté, les yaourts, les additifs alimentaires ou produit à usage pharmaceutique, ces microorganismes, les coliformes en particulier doivent être recherché dans les produits finis.

- ❖ Les microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande et d'une perte de rendement devront être recherchés dès le début de la fabrication (matière première), jusqu'au produit fini.
- ❖ Les microorganismes à rechercher dépendent étroitement des produits au cours de fabrication, levures dans les produits sucrés ou acides, bactéries lactique et bactéries acétiques dans les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés.
- ❖ Dans la biotechnologie mettant en œuvre un levain bactérien les contaminants les plus rencontrés sont les phages, il convient donc de contrôler les levains de les prendre contre ce microorganisme au cours de fabrication.
- ❖ Le contrôle microbiologique de rétine d'un produit solide ou liquide consiste souvent en absence d'information sur l'éventuel implication de ce produit à une maladie infectieuse et toxi-infection ou une intoxication en :
 - ✓ Un contrôle de stérilité pour les produits soumis à des traitements antibactériens de stabilisation.
 - ✓ Une estimation du nombre contaminant (flore aérobies mésophiles totale, anaérobiose sulfato-réducteur, coliforme) ou leur détection-identification (*Salmonelle*, *Listeria*). Ce contrôle est long (plusieurs jours) ce qui implique souvent : de stocker le produit en attendant la réponse (impossible pour les produits très périssables).
 - ✓ De diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.

III.4.1. La contamination des denrées alimentaires par les micro-organismes et leurs métabolites

Les aliments peuvent être contaminés par divers micro-organismes, principalement bactéries, levures et moisissures que nous classons selon le schéma suivant :

- ❖ **utiles (biotechnologies)**
Lactobacillus acidophilus, *Streptococcus thermophilus*, *Acetobacter spp.*,
- Moisissures :** (*P. roqueforti*), *Saccharomyces cerevisiae* (levures).
 - ❖ **banales (inoffensives, altération)**
 Germes aérobies mésophiles, Levures, Moisissures (non toxinogènes).
 - ❖ **pathogènes (gastroentérites = toxi-infection)**
Escherichia coli, *Salmonella enteritidis*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*.
 - ❖ **toxinogènes (intoxications)**
Clostridium botulinum, *Staphylococcus aureus*, **Moisissures :** (*Aspergillus spp.*).
 - ❖ **pathogènes (graves -infections)**
Salmonella typhi, *Shigella sonnei*, *Brucella abortus*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*.

III.5. Les méthodes de contrôles

Les méthodes de contrôles doivent être **simples** afin de donner **une réponse suffisamment rapide** pour qu'une correction soit éventuellement possible dans la fabrication et doivent être **peu coûteuses** de façon à pouvoir multiplier le contre et mieux surveiller la fabrication sans alourdir excessivement les coûts de fabrication, on distingue :

a. Les techniques microbiologiques représentées par :

- L'observation directe (état frais) ; - Les colorations usuelles (coloration de Gram), et les colorations spéciales ; - La microscopie en fluorescence (immunofluorescence).

Ces techniques sont caractérisées par **la simplicité, la rapidité et le faible coût**, toutefois **la sensibilité** n'étant pas suffisante pour toujours, il est recommandé de faire en plus un contrôle par des méthodes classiques de culture sur les produits finis. L'observation technologique est **utilisable dans toutes les biotechnologies faisant intervenir une phase de fermentation**. Cette phase peut alors contrôler efficacement par la recherche des contaminants sur des préparations microscopiques.

b. Les techniques de quantification (des bactéries et des levures) :

Cytométrie en flux (CMF) : Mesure (-métrie) des propriétés optiques de cellules (cyto-) transportées par un liquide vecteur (flux) jusqu'à une source d'excitation lumineuse (souvent un laser). Elle est utilisée pour mettre en évidence et dénombrer des molécules ou cellules, mortes ou vivantes, en leur faisant traverser un laser. Les particules passent à grande vitesse dans le faisceau du laser, et un ordinateur analyse leurs particularités physiques et leur nombre. Grâce à la cytométrie en flux, la morphologie des cellules est déterminée, et permet de mettre en évidence d'éventuelles malformations cellulaires.

Il s'agit d'une technique de caractérisation individuelle quantitative et qualitative **qui analyse les signaux optique** ou physique émis par des cellules ou particules lors du passage devant une source lumineuse d'un laser. La CMF permet d'obtenir un résultat très **rapide** puisque le comptage de microorganisme est effectué en une minute, après 10-15 min la sensibilité de la méthode est de l'ordre de 10^2 à 10^3 /ml pour les levures et 10^4 /ml à $5 \cdot 10^4$ /ml pour les bactéries.

c. Les méthodes classiques par :

- ☞ Dénombrement en cellule, en milieu liquide et en milieu solide par filtration sur membrane ou par opacimétrie (Mesure de l'opacité d'une substance par mesure du flux lumineux transmis) ;
- ☞ **Mesure de la biomasse** par peser, par dosage d'azote ;
- ☞ **Mesure de l'activité microbienne** par mesure de la consommation du substrat par dosage d'un produit du métabolisme.

d. Contrôle des paramètres physicochimiques

Pour les contrôles en cours de fabrication les techniques microbiologiques classiques peuvent quelque fois être efficacement remplacées par des contrôles des paramètres physicochimiques liés à la présence des contaminations pH-acidité.

e. Technique de culture

Les techniques de culture sur différents milieux sélectifs ou non (ensemencement, isolement), et des techniques de dénombrement et d'appréciation de la croissance peuvent être utilisées pour les contrôles de qualité. Dans chaque filière il est nécessaire de choisir une politique du contrôle microbiologique dépendant **du type de produit** fabriqué et du niveau de risque.

VI. Réalisation des contrôles (Contrôle microbiologique de la chaîne de production)

VI.1. Les différentes catégories de contrôle en industrie alimentaire

Les contrôles en industrie alimentaire sont de deux types :

A. soit ils sont diligentés par des organismes administratifs ou des associations afin de contrôler la conformité à un critère établi, d'une matière première ou d'un produit fini mis sur le marché.

Ces contrôles peuvent être officiels (ou réglementaires), et permettent d'autoriser la distribution du produit s'il est conforme ou de sanctionner et d'interdire sa vente dans le cas contraire (ou non) ;

B. soit ils sont décidés au sein de l'entreprise et concernent certaines étapes de la fabrication du produit : ce sont les autocontrôles.

Ces autocontrôles sont effectués par des laboratoires internes à l'entreprise ou sous-traités par des laboratoires externes : ils font alors partie de la construction de la qualité dans l'entreprise.

VI.2. Niveaux de contrôle microbiologique dans la fabrication

Les contrôles microbiologiques au cours d'une production industrielle peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluer la qualité microbiologique d'une matière première à l'aide d'un autocontrôle ;
- maîtriser la qualité et, notamment, la pureté du levain dans le cas d'une production mettant en jeu une fermentation (autocontrôle) ;
- ✓ évaluer le niveau de contamination en vue de maîtriser un point critique de contamination ou de multiplication d'un microorganisme sur une chaîne de fabrication : contrôle du produit en cours de fabrication, contrôle des locaux, du matériel et du personnel ;
- ✓ évaluer la qualité microbiologique d'un produit fini à l'aide d'un autocontrôle ou d'un contrôle officiel.

La figure 1 situe au cours de la fabrication du produit l'ensemble de ces contrôles.

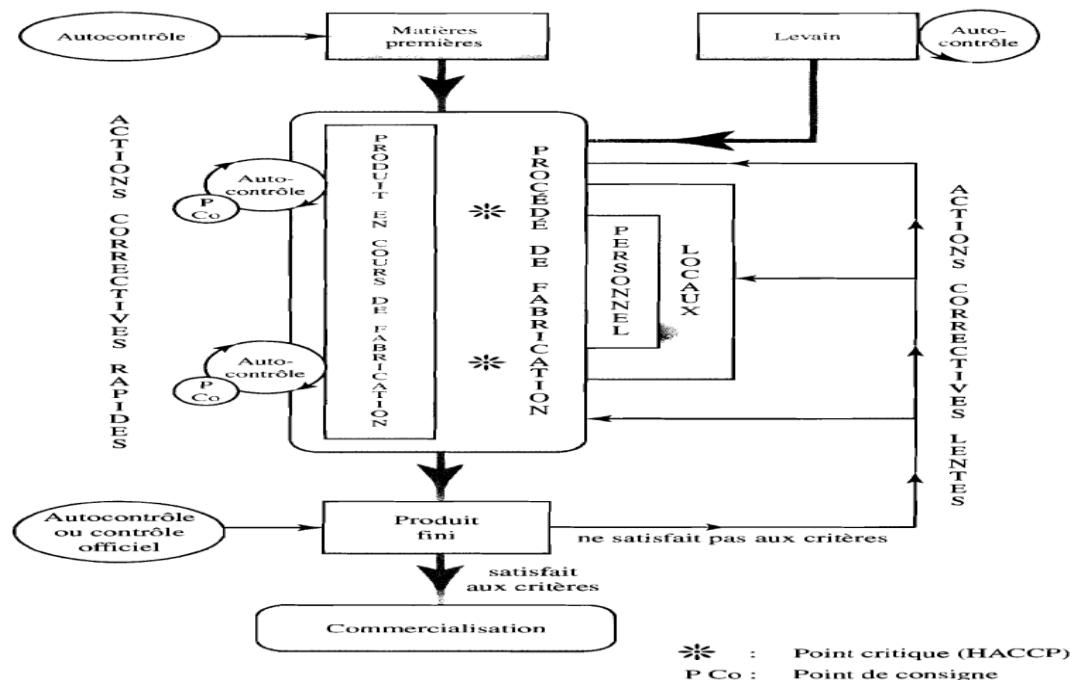


Figure 1. Niveaux de contrôle microbiologique en industrie de production alimentaire (Bonnefoy *et al.*, (2002)).

VI.2.1. Le contrôle des matières premières

Cet autocontrôle effectué par l'entreprise doit permettre de vérifier le niveau de contamination général et la présence de microorganismes particuliers susceptibles de gêner la fabrication ou d'altérer le produit fini lorsqu'ils ne sont pas détruits lors de la fabrication.

La qualité microbiologique des matières premières doit donc être conforme au cahier des charges. Celui-ci pourra à différent pour une transformation mettant en jeu une fermentation ; dans ce cas, on peut tolérer un milieu faiblement contaminé.

Actuellement, le développement de l'assurance qualité parmi les fournisseurs de matières premières doit permettre de limiter de plus en plus ces contrôles. Si le fournisseur garantit une qualité ISO 9002 (maîtrise de la production) ou ISO 9003 (conformité des produits livrés), l'entreprise peut alléger les contrôles sur les matières premières.

Le contrôle microbiologique des matières premières doit permettre de vérifier que celle-ci ne renferme pas de microorganismes responsables de gêner le déroulement de la fabrication ou les microorganismes qui ne peuvent être éliminés par les technologies mise en œuvre pourraient altérer les produits finis. On distingue les biotechnologies comprenant une étape de fermentation et les autres (sans fermentation).

a. Avec fermentation

Pour qu'une fermentation se déroule dans de bonnes conditions, il faut ensemencer le levain dans un milieu stérile, sauf dans les cas particuliers comme la cidrerie où la fermentation est conduite avec des germes indigènes.

Le contrôle des matières premières dans les industries de fermentation est donc basé sur un contrôle de stérilité ou un contrôle de propreté microbiologique du milieu. En effet si pour certain industrie (ATB, AA), les milieux doivent être stériles pour d'autres comme la brasserie, un milieu faiblement contaminé et suffisant, au temps qu'il ne renferme pas des microorganismes dangereux pour cette industrie.

Dans le cas des industries de fermentation nécessitant un milieu stérile au départ le barème de stérilisation étant calculé largement de temps en temps des contrôles de niveau des germes de contamination, leur nature sur le milieu avant la stérilisation permet de vérifier ou de modifier le barème de stérilisation.

b. Sans fermentation

Dans le cas de bioindustrie ne mettant pas une fermentation, la qualité microbiologique doit être maintenue à l'aide des facteurs physico-chimiques habituels (pH, T°C, l'activité de l'eau). Au niveau des matières premières les contrôles microbiologiques consistent donc à rechercher les microorganismes dangereux compte tenu des conditions technologiques ultérieures.

VI.2.2. Contrôle des levains

Lorsqu'un levain est utilisé dans la fabrication, sa qualité est contrôlée avant l'ensemencement de la cuve de fermentation. On cherche à détecter un contaminant, même présent en faible quantité, car, après ensemencement de la cuve, celui-ci serait susceptible de se multiplier plus rapidement que le ferment sélectionné.

Une technique de contrôle de levain doit être sensible de façon à détecter une contamination rapide. Trois grands types de levains sont utilisés :

- Levain à *Saccharomyces* (levure) ;
- Levain à moisissures (Antibiotique) ;
- Levain bactérien.

Ex : 1. Les levures peuvent être contaminées par des levures sauvages ou des bactéries lactiques ou acétiques ;

2. Les moisissures par des bactéries ;

3. Les levains lactiques par des bactéries à développement plus rapide ou par des bactériophages.

A côté des contaminants le contrôle des levains est d'abord un contrôle de viabilité et de l'activité physiologique pour les levains à *Saccharomyces*. Le contrôle d'activité peut être un pouvoir fermentaire (cinétique de dégagement de CO₂ ou de consommation du sucre), dans des conditions standards pour les levains lactiques, ce contrôle peut être par l'étude de la cinétique d'acidification d'un lait dans des conditions standards.

a. Contaminants microbiens

Les recherches des contaminants microbiens se font le plus souvent par des techniques microbiologiques ou par d'autres techniques plus ou moins utilisées comme technique par culture ou technique d'immunofluorescence peuvent utiliser des milieux correspondants au milieu de fermentation, dans ce cas l'aspect des colonies obtenues renseigne sur la présence éventuelle du contaminant ; ces techniques par culture dépendante ont des réponses de 1 à 8 jours.

Les techniques microbiologiques sont simples et rapides, toutefois elles ne sont pas très sensibles. La recherche peut se faire par une observation microbiologique après coloration de Gram ou de bleu de méthylène. Dans le cas de la recherche spécifique de levure contaminantes dans un levain à *Saccharomyces*, il est nécessaire d'employer une technique d'immunofluorescence, cette réaction est basée sur la complémentarité spécifique (Ag-Ac).

b. Les phages

Les phages peuvent être recherchés dans les levains dans les premières étapes de la propagation de culture avant l'inoculation de fermenteur, la technique la plus utilisée est la technique de la double couche. Le filtrat de la culture à contrôler est étalé sur la gélose déjà ensemencée avec des cellules de levains, des zones de lyse indiquent la présence du phage spécifique des bactéries étalées.

VI.2.3. Autocontrôles en cours de fabrication

L'objectif recherché ici est de contrôler le procédé de fabrication du point de vue microbiologique pour mieux le maîtriser. Il faut donc localiser les points de la chaîne où il y a le plus de risques de contamination. Cette analyse des points critiques fait partie de l'étude HACCP conduite pour l'ensemble du procédé de fabrication.

Ces autocontrôles sont un peu comme les capteurs d'une boucle de régulation. Ils doivent permettre de mettre en évidence rapidement un problème de fabrication afin de pouvoir modifier une partie du procédé et d'améliorer les résultats de l'analyse au << point critique >>.

Dans les industries de fermentations les contrôles consistent essentiellement à apprécier l'évolution des populations microbiennes dans le milieu au cours de temps aussi bien le développement du levain que l'apparition et le développement des contaminants.

Les techniques microscopiques sont les plus utilisées pour ce contrôle :

- ✓ **Les techniques compte cellules** permettent de faire une numération approximative des cellules de levain. Les techniques de coloration permettent d'évaluer une contamination bactérienne dans des cas de levains à champignons et des levains bactériens ;
- ✓ **Les techniques d'immunofluorescence** peuvent être utilisées pour la recherche des bactéries contaminantes dans les moûts de fermentation ;
- ✓ **La cytométrie en flux** permet de détecter plusieurs types de microorganismes séparément cela peut être appliquée au suivi de fermentation en culture pure ou en culture mixte ;
- ✓ **Méthodes de culture** peuvent également être mise en œuvre quant un certain délai de réponse est toléré.

Dans l'industrie qui utilise des cultures aérées, des contrôles sur l'efficacité des systèmes de filtration stérilisante de l'air sont nécessaires.

Dans les biotechnologies ne présentant pas une étape de fermentation les paramètres de transformation s'ils sont bien maîtrisés ne permettant que quelques développements microbiens. Les contrôles microbiens au cours des processus consistent à rechercher la présence de microorganismes potentiellement dangereux.

VI.2.3.1. Contrôles des conditions de fabrication (contrôle de l'hygiène des locaux et du personnel)

Les conditions de fabrication peuvent elles mêmes être contrôlées, ceci concerne les locaux dont la conception même doit assurer de bonnes conditions d'hygiène (contrôle de surface et contrôle de l'air ambiant), effectués à intervalles de temps réguliers, ces contrôles peuvent faire évaluer le dispositif mis en place dans le cadre de l'assurance-qualité.

Le matériel de fabrication doit être conçu de façon à éviter les zones de prolifération microbienne (angles morts...). Enfin, le personnel, source majeure de contamination, doit souscrire des règles d'hygiène très rigoureuses.

Entre deux fabrications, les locaux et les installations doivent être nettoyés et désinfectés avant d'être réutilisés. Les barèmes de désinfection (nature de produit, concentration, temps de contact), sont définis en fonction de la nature et du nombre des microorganismes à détruire.

Après réalisation, il est nécessaire de contrôler l'efficacité de la désinfection. Différentes techniques sont applicables suivant les matériels à contrôler.

- Pour les contrôles microbiens des surfaces, les techniques les plus utilisées sont les techniques **par impression** (boîtes contact, tampon de gélose au lame gélosées).
- Pour les contrôles des dispositifs moins accessibles (robinets, canules...), il est recommandé d'utiliser la technique **d'écouvillonnage**.
- La technique d'ATP-métrie (**L'ATP-métrie**) est une technique de biologie moléculaire, basée sur le principe de la bioluminescence, qui permet de mesurer la quantité d'ATP présente dans un échantillon. Plus la lumière détectée est élevée moins la surface est propre., est bien adaptée au contrôle de traitement de matériel ou la surface à contrôler. L'ATP est ensuite mesurée sur la solution de rinçage de l'écouvillon, cette valeur est un indice de propreté de la surface contrôlée qui représente un indice aussi bien l'ATP microbienne que l'ATP de cellule animale ou végétale.

VI.2.4. Contrôle du produit fini

C'est un contrôle effectué à posteriori pour évaluer la qualité d'un produit après sa fabrication et avant sa distribution. Au titre d'autocontrôle, il est commandité par l'industriel pour valider la production et libérer les stocks pour la distribution.

Il ne peut y avoir qu'une incidence limitée sur la chaîne de production car les résultats demandent souvent 24 à 48 heures au minimum. Lorsque, au cours de ce contrôle terminal, une défaillance conduisant à la suppression du produit défectueux est détecté :

- ✓ la modification de la chaîne de production entraîne alors des délais d'intervention sur la fabrication du produit beaucoup plus longs que lors d'un autocontrôle en cours de fabrication.

Les contrôles officiels de routine sont effectués de façon systématique pour vérifier la conformité des produits fabriqués aux critères microbiologiques officiels afin de protéger le consommateur. Il s'agit alors d'un contrôle de nature répressive.

Les contrôles microbiologiques des produits finis portent sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande et sont plus ou moins importants suivant la nature des produits et leur destination. En effet dans certains cas, le contrôle est ramené à une recherche de quelques microorganismes dangereux pour le produit, mais dans d'autres cas les produits doivent d'être stériles, les contrôles sont beaucoup plus nombreux et sévères par ailleurs, il existe pour certains produits des normes ou des critères de qualité microbiologiques les contrôles porteront alors sur ces paramètres.

❖ Conclusion

Le contrôle microbiologique en biotechnologie doit permettre de surveiller pas à pas les fabrications et d'éviter ainsi des pertes importantes dues à des interventions trop tardives.

Les produits alimentaires fabriqués selon les bonnes pratiques de fabrication (**BPF**) et les bonnes pratiques d'hygiène (**BPH**) par définition les BPF et BPH sont des mesures préventives et des dispositifs acceptables. Elles constituent un ensemble de règles d'hygiène concernant la conception des locaux et les équipements de protection de l'environnement de la fabrication. Le comportement du personnel, les différents flux de circulation, traitement de l'eau utilisée à l'usine et l'identification des produits.

Les bonnes pratiques peuvent être réalisées grâce aux sept principes dénommés **AMCADER** :

A= planifier, construire, outiller et faire fonctionner les **Atelier** industriels en respectant les règles d'hygiène ;

M= fournir les **Matières** premières de la plus haute qualité microbiologique possible ;

C= veiller au **Comportement** du personnel s'entrainer à l'autocontrôle et à l'autocorrection ;

A= veiller à l'**Assainissement** des produits dangereux pour éviter toute re-contamination ;

D= assurer la **Distribution** des produits finis dans des conditions de transport, de stockage et de vente empêchant toute contamination ou toute prolifération microbienne ;

E= réaliser des **Examens** microbiologiques périodique pour dépister et remédier sans délai à tout accident ;

R= **Retrouver** la confiance du public dans l'innocuité des procédés d'assainissement couramment appliqués dans l'industrie alimentaire.

V. Hygiène des locaux, du matériel et du personnel

Avec l'apparition des décrets, les professionnels exerçant une activité de production et de commercialisation des denrées animales devraient appliquer une réglementation précise concernant les règles d'hygiène (hygiène du personnel, des manipulations, des locaux), en fonction des risques et des objectifs à atteindre et s'assurer de leur efficacité par des autocontrôles fondés sur la méthode HACCP.

Au niveau microbiologique, la maîtrise de ces risques concerne :

- à l'air ambiant ; - aux surfaces des locaux et du matériel ; - au personnel.

V.1. Classement des locaux en zones de sensibilité

Les locaux des usines agroalimentaires sont classés en zones de sensibilité, selon les opérations effectuées sur le produit. Les différents niveaux sont déterminés soit par le nombre de germes par m^3 , soit par le degré d'empoussièrement. Statistiquement, il est admis que 10 000 particules de $0,5\mu m$ correspondent à 1 germe. Le niveau d'empoussièrement est rapidement évalué par spectrophotométrie laser, et plus facile à déterminer que le nombre de germes.

Le classement en zone inerte, sensible ou ultra-sensible correspond à l'évaluation des risques de biocontaminations. La maîtrise de la biocontamination à chaque étape d'élaboration du produit impose des niveaux d'hygiène pour l'air, les surfaces et le personnel.

V.1.1. Zone inerte (zone à risque faible ou moyen : niveau 1)

En général, le produit n'est pas en contact avec l'air (sauf pour les zones de cuisson). L'air distribué dans ce type de zone sera, si nécessaire, à température et hygrométrie contrôlées.

✓ Les cas sont les suivants

- zones de réception/ stockage de matières premières (produits emballés ou en bacs), à basse température ;
- zones de réception/stockage des matières premières sèches (épices...), avec classement hygrométrique ;
- zones de cuisson ;
- zones d'emballage/encartonnage des produits pré-conditionnés.

V.1.2. Zone sensible (zone à risque élevé : niveaux 2 et 3)

En général, les opérations sur le produit sont réalisées à l'air libre dans des salles propres. Il s'agit, en zone sensible, de classe d'empoussièrement, 350 000 et 3 500 000.

• Niveau de risque 2

- Contrôle de l'empoussièrement
→ 3 500 000 particules de $0,5 \mu m/m^3$ → moins de 350 germes/ m^3 ;
- Nettoyage et désinfection
→ $\leq 2 \text{ microorganismes}/cm^2$;

• Niveau de risque 3

- Contrôle de l'empoussièrement
→ 350 000 particules de $0,5 \mu m/m^3$ → moins de 35 germes/ m^3 ;
- Nettoyage et désinfection
→ $\leq 0-2 \text{ microorganisme}/cm^2$.

✓ **Les cas sont les suivants**

- tranchage, découpe, transformation de produits (viande par exemple) ;
- pré-conditionnement (pouvant également être classé en zone ultra-sensible selon le type de produit considéré).

V.1.3. Zone ultra-sensible (zone à risque très élevé : niveau 4)

Zone dans laquelle le produit est rendu très sensible aux bio-contaminations suite aux opérations qui lui sont appliquées ou aux manipulations humaines. Dans ce type de zone microbiologiquement maîtrisée, les règles sont strictes et couteuses :

- épuration de l'air ;
- contrôle de l'empoussièvement de classe 3 500 soit :
 - 3 500 particules de **0,5 µm/m³** → moins de **0.35 germes/m³** ;
- nettoyage et désinfection → moins de 0,2 microorganisme/cm² ;
- contrôle des contaminations par les entrants et sortants ;
- contrôle de l'accès du personnel ;
- tenues vestimentaires appropriées ;
- importance de la formation du personnel.

Les hottes à flux laminaire sont une solution moins onéreuse mais ne sont utilisables que dans le cas où les opérations de transformation peuvent se faire sur un plan de travail. Le local sera alors classé en zone sensible.

✓ **Les cas sont les suivants**

- zones de broyage (steaks hachis...) ;
- zones de sortie de refroidissement avant pré-conditionnement (le produit doit être refroidi à une température $\leq 10^{\circ}\text{C}$ en moins de 2 heures) ;
- zones d'assemblage/pré-conditionnement (plats cuisinés...).

V.2. Aérobio-contamination

V.2.1. Contamination de l'air

L'air est un important vecteur de contaminations en milieu industriel pour les aliments non protégés par un emballage.

V.2.1.1. Flore microbienne de l'air

L'air est un véhicule qui transporte des microorganismes sur des particules de tailles différentes, provenant de milieux naturels (sols, eaux...), des plantes, des animaux et de l'homme.

a. Flore saprophyte

Cette flore de base est constituée par les germes de l'environnement, composés de quelques bactéries et de spores de champignons microscopiques. Elle est retrouvée constamment dans les prélèvements sur un milieu de culture standard.

Les bactéries retrouvées régulièrement dans les prélèvements d'air sont des bactéries à Gram positif, généralement les plus résistantes dans le milieu extérieur : *Micrococcus* ou bacilles sporulés comme les *Bacillus*.

La flore mycélienne est très diversifiée et plus abondante en été et en automne (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Alternaria*, *Botrytis*). Des levures appartenant aux genres *Rhodotorula*, *Pichia*, *Kloeckera* peuvent également être rencontrées.

b. Flore accidentel d'origine humaine, animale ou hydro-tellurique

Cette flore vient sur-contaminer la flore de base.

Les microorganismes d'origine humaine ou animale peuvent se diviser en deux groupes :

- ceux dont la durée de vie sera limitée dans le milieu extérieur et qui seront rarement retrouvés dans les prélèvements (virus et bactéries fragiles) ;
- ceux capables de survivre pendant un temps plus ou moins prolongé dans le milieu extérieur et qui seront les indicateurs d'une contamination d'origine fécale (*E. coli*, *Enterococcus* ...), rhinopharyngée ou cutané (*Staphylococcus*, *Neisseria*, *Corynebacterium*).

Les microorganismes d'origine hydro-tellurique (bactéries telles que *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter*, champignons microscopiques et leurs spores), ont une vie indépendante de la présence humaine. Ils prolifèrent avec parois de faibles quantités de substances nutritives (*Pseudomonas*). La détection de cette flore accidentelle nécessite souvent l'utilisation de milieux spécifiques.

V.2.2. Contrôle de la qualité microbiologique des ambiances

V.2.2.1. Objectifs de l'étude

Les objectifs sont :

- soit de détecter une source de contamination capable de disséminer des microorganismes dans l'air ;
- soit d'estimer la charge microbienne de l'air, c'est-à-dire une estimation à la fois quantitative et qualitative,
- soit de réaliser des tests d'efficacité de produits bactéricides et fongicides dans l'air.

Les valeurs observées pourront être comparées à des valeurs usuelles ou à des valeurs officielles, si elles existent.

V.3. Hygiène des surfaces et des matériaux

V.3.1. Nettoyage et désinfection

Les surfaces, les récipients et les matériels en contact avec les produits alimentaires doivent être un bon niveau de propreté. Trois types d'opérations contribuent au maintien d'une bonne hygiène des surfaces :

- le nettoyage qui a pour but d'éliminer les souillures visibles : il s'agit, en général, de substances organiques provenant des matières premières ou du produit en cours de fabrication. C'est la propreté physique ;
- la désinfection qui peut être réalisée simultanément au nettoyage, mais qui est plus efficace lorsqu'elle intervient après un nettoyage et un rinçage soigneux des surfaces. La norme AFNOR NF T 72-101 définit le terme désinfection : « Opération au résultat momentané, permettant d'éliminer ou de tuer les microorganismes et/ou d'inactiver les virus indésirables portés par des milieux inertes contaminés, en fonction des objectifs fixés. Le résultat de cette opération est limité aux microorganismes présents au moment de l'opération. » C'est la propreté microbiologique ;
- le rinçage est destiné à éliminer toute trace de produit utilisé précédemment, sans évidemment apporter une nouvelle souillure ou de nouveaux microorganismes. C'est la propreté chimique. Un rinçage mal effectué peut être à l'origine de la présence dans l'aliment de résidus indésirables de détergents et de désinfectants.

Selon les zones à risque, il convient de définir une procédure de nettoyage et de désinfection :

- zone à risque faible : un simple nettoyage peut être mis en œuvre ;

- zone à risque moyen : une procédure en trois points est appliquée, c'est-à-dire un prélavage, un nettoyage-désinfection et un rinçage final ;
- zone à risque élevé : une procédure en cinq points est utilisée, c'est-à-dire un prélavage, un nettoyage, un rinçage, une désinfection et un rinçage final ;
- zone à risque très élevé : il s'agit des salles microbiologiquement maîtrisées nécessitant également une procédure en cinq points.

V.3.2. Contrôle de la propreté microbiologique

Des prélèvements effectués sur la surface à traiter permettent de révéler le ou les types de microorganismes présents et d'évaluer le degré de contamination. Les modalités de la procédure de nettoyage et de désinfection sont alors déduites des résultats obtenus.

La propreté microbiologique est ensuite contrôlée en procédant à des prélèvements, qui sont effectués en général entre une et deux heures après l'opération de nettoyage et de désinfection. Ces tests permettent de contrôler l'efficacité, et donc de valider la procédure mise en œuvre. Le suivi de la qualité microbiologique de la procédure peut être réalisé, semaine après semaine, dans chaque atelier et, dès que la qualité descend en dessous d'un seuil acceptable, il faut déclencher des opérations correctives permettant de revenir à un bon niveau de qualité.

Il est nécessaire de définir, par atelier et par matériel, les points à contrôler car il n'est pas possible de réaliser un très grand nombre de prélèvements pour s'assurer qu'un appareil ou un local est propre. Ces points doivent être représentatifs de l'état de propreté général.

V.3.2.1. Techniques de prélèvement de surface

Il existe principalement deux types de méthodes pour détacher les microorganismes présents sur une surface :

- **l'écouvillonnage** : dans des endroits peu accessibles aussi bien que sur les surfaces planes ou bombées ;
- **l'adhérence sur un milieu gélosé** (la technique d'impression sur gélose).

V.4. Contrôle de l'hygiène du personnel

Certaines industries sont très automatisées, mais d'autres font intervenir du personnel dans de nombreuses opérations au cours de la fabrication d'un aliment (manipulation, contrôle...). La pratique de l'hygiène n'est souvent pas assez rigoureuse puisque 80% de la contamination des produits serait d'origine humaine.

Un individu émet de très nombreuses particules dans son environnement proche, pouvant provoquer une contamination directe du produit, et des contaminations secondaires par dissémination des microorganismes dans l'atmosphère. Il convient de prendre en compte les points suivants lors de l'étude des dangers potentiels liés à l'hygiène du personnel :

- l'état de santé ;
- la propreté (en particulier l'hygiène des mains) ; la tenue vestimentaire.

Mais l'analyse d'autres éléments tels que :

- le comportement au poste occupé ;
- la formation assurée et la circulation du personnel, représente une part essentielle dans le système HACCP pour assurer la sécurité microbiologique d'un produit alimentaire.

V.4.2. Propreté

V.4.2.1. Propreté de la chevelure (barbe et moustache)

Même bien entretenues, la chevelure, la barbe ou la moustache hébergent des microorganismes, principalement des bactéries.

Aussi, dans les zones sensibles ou ultra-sensibles, les cheveux doivent être correctement recouverts par une coiffe.

V.4.2.2. Hygiène des mains

C'est souvent par des mains «sales», c'est-à-dire colonisées par une flore transitoire potentiellement pathogène, que se fait le transfert aux aliments. Les mains sont le support de nombreux microorganismes qui se trouvent en général en plus grand nombre au bout des doigts, en particulier sous les ongles, ainsi qu'entre les doigts. Le port de bagues et de bracelets est à proscrire, car ils sont source de nids microbiens.

Le lavage des mains doit être fait selon une méthode et une fréquence établies. Il doit être réalisé systématiquement avant tout geste sur du matériel propre et après tout geste contaminant, en particulier après le passage aux toilettes, afin de prévenir les risques d'intoxications alimentaires. Le lavage simple permet d'éliminer les souillures, les squames cutanés et de réduire la flore transitoire de 30 à 40%. Le lavage antiseptique ou hygiénique diminue la flore cutanée de 80%. Il agit sur la flore en superficie et un peu sur les germes dans les couches profondes de la peau. S'il y a port de gants, ils doivent être utilisés à bon escient.

V.4.3. Tenue de travail

Les vêtements souillés de matière organique par contact avec des aliments en cours de fabrication deviennent d'excellents supports pour le développement de microorganismes et peuvent être à l'origine de contaminations secondaires ; ils doivent être changés à une fréquence déterminée, lavés et désinfectés entre deux utilisations.

Il doit exister des vêtements vestimentaires pour revêtir une tenue adaptée, c'est-à-dire d'un niveau de protection plus ou moins important en fonction des types de zone et du niveau de risque de contamination du produit :

- zone inerte : tenue normale ;
- zone sensible : blouse, coiffe et gants ;
- zone ultra-sensible : blouse, coiffe, sur-chaussures, gants et masque.

Le contrôle microbiologique des vêtements peut se faire en réalisant une empreinte sur un milieu gélosé (boîte contact, lames gélosées).

V.5. Les risques au laboratoire de microbiologie

Il est clair que les risques liés à la manipulation de microorganismes, dont l'identité et le pouvoir pathogène sont souvent inconnus dans les premières étapes de leur analyse doivent être parfaitement maîtrisés par des pratiques et un environnement sans défaut.

Il faut que le microbiologiste soit toujours conscient des risques liés à la manipulation de bactéries et à un degré moindre de levures et moisissures, en particulier après leur amplification nécessaire à leur étude. Rappelons qu'une colonie est constituée d'environ 10^9 à 10^{10} cellules et qu'une turbidité appréciable d'un milieu de culture liquide correspond à environ 10^8 cellules par ml.

La maîtrise du risque microbiologique passe par la parfaite connaissance :

- des germes manipulés ou recherchés ;
- des voies de "pénétration" de ces germes dans l'organisme ;
- des meilleures méthodes de manipulation pour minimiser ce risque.

Les microorganismes sont classés en 4 groupes en fonction des risques potentiels qu'ils représentent :

- ✓ Le **groupe 1** comprend des microorganismes peu dangereux pour le microbiologiste et son environnement ;
- ✓ Le **groupe 2** correspond à des germes faisant courir des risques modérés aux manipulateurs et des risques limités à la communauté ;
- ✓ Le **groupe 3** est constitué de microorganismes à haut risque pour le manipulateur et à risque modéré pour la communauté ;
- ✓ Le **groupe 4** correspond à de microorganismes très dangereux pour le manipulateur et son environnement.

Les voies de l'infection sont essentiellement :

- **Buccale** (ingestion) : pipetage, porté à la bouche des doigts ou d'objets contaminés comme des cigarettes, des stylos, des aliments etc. Ce type de contamination résulte d'un travail "aseptique" incorrect ou encore de projections, renversements ou actions divers non contrôlés.
- **Aérienne** (trachée artère, poumons) par des aérosols (particules liquides ou non en suspension dans l'air et porteuses de germes). Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques (homogénéisateur, centrifugeuse, etc.) et leur pouvoir de contamination est très grand.
- Par **contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou encore *Pseudomonas* par exemple) ou au niveau de muqueuses ou d'organes comme les yeux.
- Par **pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au niveau d'une plaie).

V.5.1. Le laboratoire

Le laboratoire d'analyse microbiologique doit être à même de réaliser des analyses de routine (contrôle de qualité par rapport à une norme, évaluation de la qualité des matières premières), mais aussi de permettre l'évaluation de la qualité des opérations de transformation ou de préparation, la recherche et la maîtrise des éventuels points critiques (HACCP), l'évaluation de l'efficacité des traitements antimicrobiens de conservation, d'emballage ou de nettoyage etc. Les microorganismes susceptibles d'être rencontrés appartiennent pour la plupart aux groupes 1, 2 et éventuellement 3.

Ceci impose donc des règles fondamentales de conception et de fonctionnement du laboratoire d'analyse microbiologique.

Le laboratoire doit être composé de trois parties principales (Figure 2) :

- Le laboratoire proprement dit où sont réalisées les analyses ;
- La salle de préparation des milieux de culture ;
- La laverie qui traite les produits et matériels utilisés pour l'analyse et qui fournit la verrerie et le matériel propre et stérile. La laverie et la salle de préparation peuvent ne constituer qu'une seule pièce.

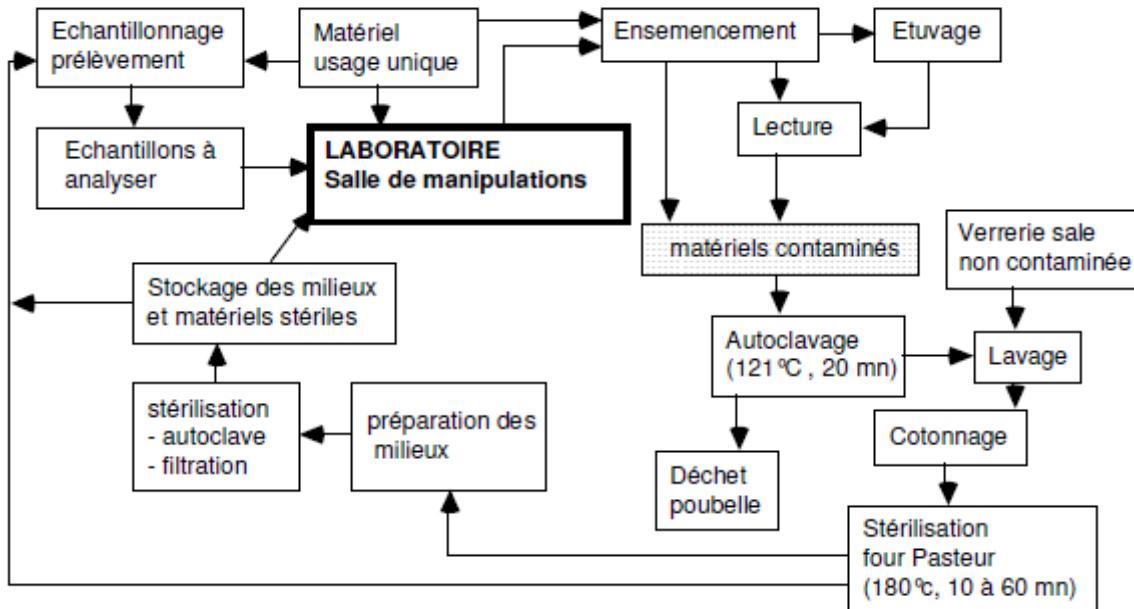


Figure 2. Les principales parties d'un laboratoire de microbiologie.
 (Jean-Louis CUQ, <http://mon.univ-montp2.fr/claroline/backends/download.php>)

Le laboratoire d'analyse doit disposer :

- d'un espace suffisant avec une circulation limitée. Deux ou trois parties sont souhaitables mais non nécessaires.
- de murs, plafonds et sol lisses mais non glissants, non absorbants, faciles à nettoyer et à désinfecter.
- d'un éclairage naturel ou artificiel de bonne qualité. Les fenêtres coulissantes avec montants aluminium équipées de volets roulants conviennent bien.
- de plans de travail lisses et résistants.
- de lampes UV disposées au plafond et équipées d'une minuterie au moins dans la salle de travail.

Le plan présenté sur la figure 3 est une proposition type de conception du laboratoire. Il ne faut pas perdre de vue que le bon fonctionnement du laboratoire requiert, en particulier aux niveaux des manipulations, des personnels qualifiés. Propreté et règles d'hygiène strictes doivent y régner.

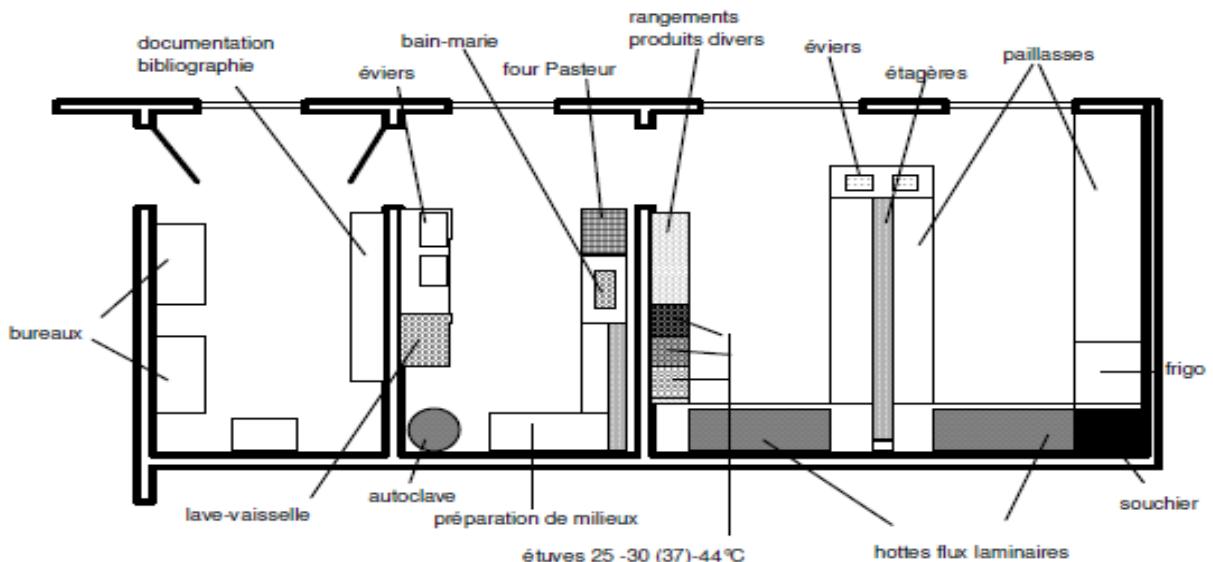


Figure 3. Schéma type d'un laboratoire d'analyse microbiologique
(Jean-Louis CUQ, <http://mon.univ-montp2.fr/claroline/backends/download.php>)

IV. Analyse des risques pour la maîtrise des points critiques : HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)

IV.1. Principes généraux du système HACCP

HACCP est l'acronyme bien connu de *Hazard Analysis Critical Control Point*. En français, il s'agit d'un système d'analyse des dangers et de points critiques pour leur maîtrise. Cette méthode est devenue, au plan mondial, synonyme de sécurité des aliments. À l'origine, le concept du HACCP a été développé comme un système de sécurité microbiologique au début du programme spatial américain, dans les années 1960, pour garantir la sécurité des aliments pour les astronautes (éviter les courantes en apesanteur par exemple). Le système d'origine a été conçu par *Pillsbury Company*, en coopération avec la *National Aeronautics and Space Administration* (NASA) aux États-Unis et les Laboratoires de l'armée américaine.

Il s'agit d'une méthode structurée qui permet d'intervenir à la fois sur le plan préventif et sur le plan correctif.

Le risque est un « danger éventuel plus ou moins prévisible ». Or le danger est « ce qui menace ou compromet la sûreté ». Il s'agit donc d'analyser l'éventualité de survenue d'un évènement qui menace ou compromet la sûreté.

Le système assurance qualité et sa certification donnent confiance aux clients quant à l'organisation et à la mise en place de documents relatifs aux procédures diverses de l'entreprise. Mais le respect des normes ISO 9000 ne spécifie pas la sécurité mise en place lors de la fabrication du produit, pour l'obtention d'un produit sain et de « qualité ».

Le système assurance qualité doit donc être complété par d'autres mesures permettant de donner satisfaction aux clients en garantissant la fabrication d'un produit sain et « qualité ». Pour vérifier ce point, les contrôles ne sont plus seulement effectués comme auparavant sur le produit fini, mais aussi sur la chaîne de fabrication. Les contrôles sur les seuls produits finis sont souvent mal adaptés. L'entreprise cherche à maîtriser les points critiques de sa production en amont du produit fini.

C'est l'objectif de la démarche HACCP : Ce système vise à contrôler la fabrication du produit depuis l'achat des matières premières jusqu'à la consommation du produit. Le procédé de fabrication peut mettre en jeu jusqu'à 80 étapes différentes et il est impossible de les contrôler toutes. Il s'agit donc de localiser les étapes les plus dangereuses potentiellement pour pouvoir ensuite les maîtriser.

L'analyse des risques permet de déterminer à quel moment il peut y avoir danger potentiel par déviation d'une procédure «normale» (point critique). L'évaluation du risque consiste à déterminer la probabilité d'une conséquence inacceptable de cette déviation. Il faut donc utiliser des connaissances techniques. Un danger est considéré comme inacceptable s'il permet la croissance et la survie d'un organisme pathogène ou la contamination par un tel organisme ou s'il induit la fabrication ou la persistance de toxines microbiennes dans le produit alimentaire ou son environnement. Cette analyse des risques conduit à l'identification des **points critiques à Contrôler et à maîtriser**.

Un **point critique** est le point d'un procédé où un défaut de prévention de la contamination peut être détecté par des examens de laboratoire avec une efficacité suffisante (FDA 1972). Pour l'ICMSF (1986), il s'agit d'un point ou procédé dans lequel l'absence de maîtrise peut conduire à un risque sanitaire inacceptable.

Un **danger** est une éventualité inacceptable pour le fabricant, le produit, l'utilisateur ou le consommateur. Il peut être de nature microbiologique, chimique, physique, administrative, réglementaire etc.

La probabilité d'apparition d'un danger est désignée sous le vocable de **risque**.
On évalue les causes d'un danger en calculant par exemple un **indice de risque (IR)**.

La démarche HACCP s'insère généralement dans une démarche contrôle qualité – certification :

- ❖ **Contrôle de la qualité** : vérification de la conformité à des données préétablies, suivie d'un jugement ;
- ❖ **Assurance de la qualité** : mise en œuvre d'un ensemble approprié de dispositions préétablies et systématiques destinées à satisfaire à l'obtention de la qualité requise.

L'entreprise doit mettre en œuvre pour donner pleine confiance à ses clients et non seulement pour ses produits. Une entreprise peut se faire certifier à différents stades de son activité et il existe trois niveaux de certification pour la norme ISO 9000 :

- La norme **ISO 9001** touche toute la chaîne de production depuis la conception jusqu'à l'arrivée du produit fini chez le client et son service après-vente ;
- La norme **ISO 9002** assure la qualité d'un processus plus court : de la production à l'installation / arrivée chez le client ;
- La norme **ISO 9003** ne s'attache qu'à la qualité des produits finis et non à la production.

Une certification ce n'est pas un "diplôme" obtenu définitivement et indéfiniment. En fait c'est un engagement de l'entreprise à entrer dans la dynamique du progrès qualité en adoptant une démarche vers la maîtrise totale de la qualité.

Il existe d'autres normes ISO. La norme **ISO 14000** se préoccupe de l'environnement de «l'industrie».

C'est un système qui permet d'améliorer l'efficacité dans la fabrication alimentaire en faisant de la prévention, au lieu d'éliminer un produit fini jugé non consommable après contrôle final. Ainsi, tout produit fabriqué est consommable car toutes les étapes ou il risquait de se contaminer sont maîtrisées.

IV.2. Le système HACCP en tant que démarche structuraliste et intégrée

Ce système est caractérisé par sa **primaute**. Il s'agit d'un enchaînement d'actions dans un ensemble cohérent et coordonné.

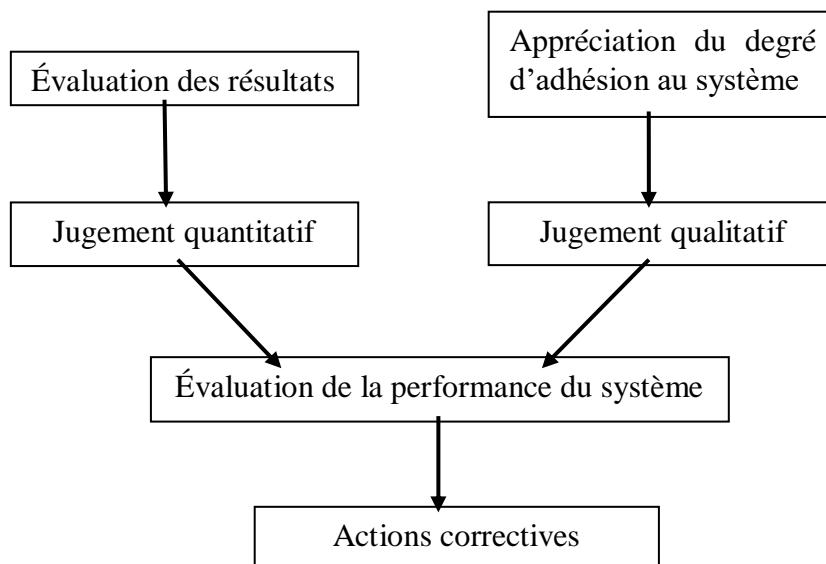
Le système HACCP comprend :

- L'analyse des risques : identification des risques et évaluation de leur gravité (Exemple : contamination par *Salmonella* lors de la fabrication du lait en poudre) ;
- La détermination des points critiques ou les contrôles sont nécessaires pour maîtriser les risques identifiés (Exemple : contamination du lait frais, contamination lors de l'entreposage, contamination lors du transport à la fabrique) ;
- La spécification des critères indicatifs pour l'efficacité du contrôle permettant la maîtrise du risque et des limites de tolérance. Un critère est défini comme limite (de nature physique, chimique ou biologique) ou caractéristique spécifiée (exemple : absence de *Salmonella* dans 100 mL) ;
- L'établissement et la mise en place des procédures de surveillance donnant lieu à la rédaction d'un document ;
- L'exécution d'actions correctives lorsque les critères ne sont pas atteints.

L'application d'une démarche HACCP permet d'intégrer l'hygiène dans une démarche qualité. Les résultats d'une étude HACCP sont spécifiques des produits et du type de chaîne de production.

Ce système implique une **méthode de travail associant** :

- **un idéal d'intelligibilité** identification puis évaluation des risques ; identification des points critiques) ;
- **une démarche formalisée** par le choix des options de maîtrise et de surveillance, par la réalisation du contrôle ;
- **une intention critique.**



Le HACCP est un modèle de l'**assurance qualité**, assurance qui est selon l'AFNOR, l'ensemble des dispositions préétablies et systématiques destinées à donner confiance.

IV.3. Principes du système HACCP

IV.3.1. Procéder à une analyse des risques

Il s'agit d'établir, pour chaque étape du processus, la liste des dangers qui sont raisonnablement susceptibles de se produire. Puis d'analyser les risques, c'est-à-dire pondérer ces dangers en fonction de leur gravité, probabilité d'apparition, facilité de détection, persistance dans le produit...

Pour enfin mettre en place des mesures visant à prévenir l'apparition de tels dangers.

IV.3.2. Déterminer les points critiques pour la maîtrise (CCP)

Un point critique pour la maîtrise ou CCP (Critical Control Point) est défini par le Codex Alimentaire comme suit : « stade auquel une surveillance peut être exercée est essentielle pour prévenir ou éliminer un danger menaçant la salubrité de l'aliment, le ramener à un niveau acceptable ». Il convient de déterminer quelle(s) étape(s) constitue(ent) le(s) point(s) critique(s) pour chaque danger retenu.

Notion de **risque** : la probabilité d'apparition d'un danger est la conséquence de contamination et/ou développement de microorganismes pathogènes et/ou responsables d'altérations à un niveau inacceptable, le danger restant potentiel pendant la vie commerciale et/ou d'utilisation du produit.

Cette notion s'applique au niveau des matières premières et des produits susceptibles de renfermer des microorganismes ou de permettre leur survie ou leur développement depuis la production jusqu'à la distribution et la présentation domestique.

Il s'agit d'abord de déterminer, au niveau des matières premières et/ou des produits, la probabilité de présence de microorganismes et/ou de leur développement. Deux opérations sont à réaliser dans ce sens :

1) Une démarche formelle et de laboratoire qui requiert des informations :

- Commerciales (germes responsables d'altérations, enquêtes sur les produits déjà commercialisés, stabilité, analyses de laboratoire) ;
- Épidémiologiques pour les germes pathogènes (programme de surveillance, informations sur les maladies transmissibles, les TIA). Informations sur les microorganismes concernés, les denrées à risques, la sensibilité des consommateurs ;
- Écologique : flores présentes au niveau des matières premières aux plans qualitatif et quantitatif ; germes introduits au cours de la production, transformation, distribution, utilisation ; biologie de ces germes et relations substrat – microorganisme ;
- Techniques sur la structure, composition des matières premières et des produits (nature, formule, pH, activité de l'eau, conservateurs, conditionnement etc.) ;
- Techniques sur les traitements, la distribution, la préparation, la survie, le développement ou la mort des microorganismes (facteurs intrinsèques et extrinsèques implicites au développement microbien dans un produit donné dans des conditions données).

2) La caractérisation des ingrédients, des produits et des « conditions de fabrication »

- des ingrédients sont susceptibles d'être des vecteurs de risques ;
- la fabrication n'inclut pas d'étapes capables de détruire les microorganismes ;
- il existe des possibilités d'erreurs dans la fabrication ou la distribution pouvant entraîner l'altération ou rendre le produit dangereux.

❖ Evaluation de l'indice de risque IR

Cet indice IR prend en compte 3 critères liés à la cause des dangers :

- ✓ **1^{er} critère : la gravité G** de la cause des dangers

(G varie entre 1 : gravité mineure à 8 : gravité catastrophique en passant par les valeurs entières comprises entre 1 et 8) ;

- ✓ **2^{ème} critère : la probabilité de détection D** de la cause de dangers

(D varie entre 1 et 4 ; D = 1 signifie que la probabilité de détection est très élevée ; une valeur de 4 signifie que la détection est très délicate).

- ✓ **3^{ème} critère : la fréquence F** d'apparition de la cause de dangers.

Elevée si le risque se répète souvent. Les valeurs de F adoptées sont généralement comprises entre 1 et 3 (1 : faible et 3 : élevée).

L'indice de risque est obtenu en multipliant les valeurs des trois critères G, D et F.

$$\text{IR} = \text{G. D. F}$$

Plus le risque est élevé et plus les valeurs attribuées aux trois critères G, D et F sont élevées, et donc plus IR est élevé (1 < IR < 96). IR permet d'évaluer chaque cause de danger.

IV.3.3. Etablir les limites (seuils) critiques aux CCP

Les limites critiques séparent l'acceptable de l'inacceptable, c'est-à-dire le produit conforme du produit non conforme, le respect de ces limites atteste de la maîtrise effective des CCP.

Un **point critique (CCP)** correspond à un point, une étape ou encore une procédure qui peut et qui doit être maîtrisée afin d'éliminer les dangers ou réduire leur probabilité d'apparition à un niveau acceptable.

Un point critique correspond à une étape clé de la chaîne logistique ou de fabrication au niveau de laquelle les moyens mis en œuvre doivent être concentrés et intensifiés pour garantir l'amélioration de la qualité ou tout au moins son maintien. Toutes les causes de danger ne sont pas des points critiques. Les points critiques sont généralement identifiés grâce à la réalisation d'un **organigramme appelé arbre décisionnel du Codex alimentarius**.

Leur identification est évidente par analyse d'un diagramme de fabrication et des risques : points de contamination, point de survie, zone de multiplication etc.

Si une cause de danger n'est pas un point critique cela signifie que :

- la prévention de cette étape n'est pas nécessaire pour la sécurité de la denrée alimentaire, des utilisateurs, des bénéficiaires ...etc.
- et/ou le danger ne peut pas apparaître à cette étape ni évoluer jusqu'à un niveau inacceptable ;
- et/ou une étape ultérieure éliminera le danger ou on le réduira en l'occurrence à un niveau acceptable.

IV.3.4. Etablir un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP.

Le système de surveillance doit permettre de s'assurer de la maîtrise effective des CCP. Il s'agit de surveiller par des séries programmées d'observations ou de mesure des paramètres (autocontrôles) que les limites critiques ne sont pas dépassées. Ces autocontrôles doivent être définis et mis en place et leurs conditions de réalisation doivent être déterminées et documentées.

IV.3.5. Déterminer les mesures correctives

Déterminer les actions nécessaires pour rectifier les écarts et l'orientation du produit en cas de dépassement des seuils.

IV.3.6. Appliquer les procédures de vérification afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement.

IV.3.7. Actions correctives (prévision)

Constituer un dossier dans lequel figurera toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application.

Ces dossiers sont indispensables pour garantir la bonne application du plan HACCP. Il s'agit des procédures relatives aux CCP, des enregistrements de surveillance des CCP, des actions correctives mises en place, de la conclusion de la vérification du système... (Figure 4).

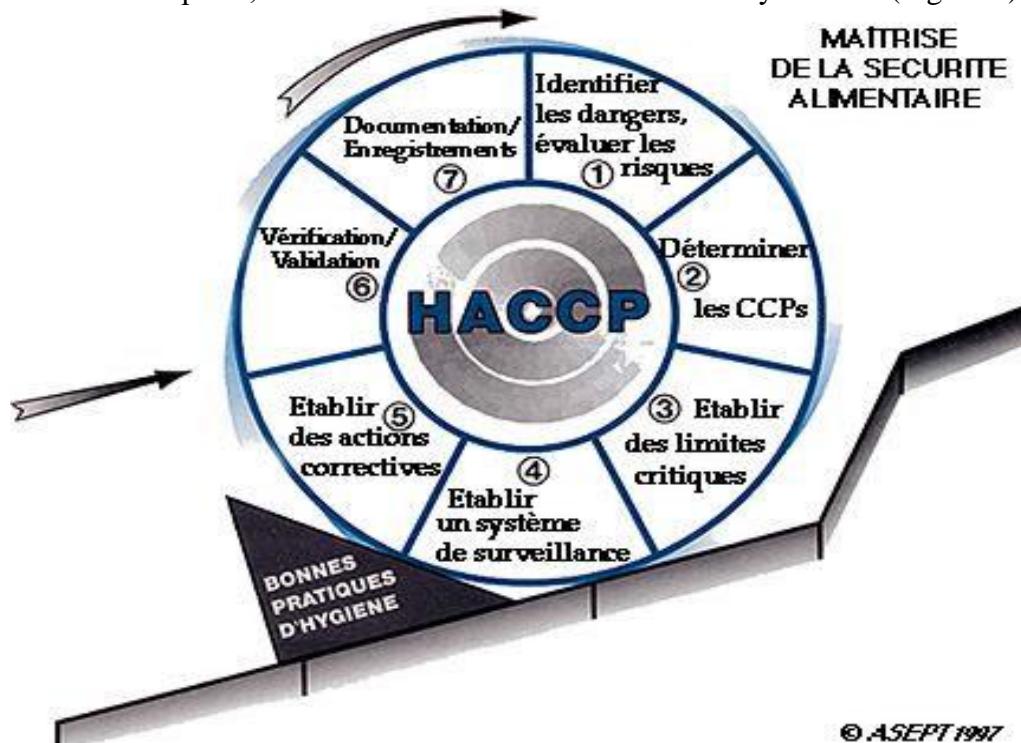


Figure 4. Le système HACCP.

(Perret du Cray, 2008).

IV.4. Etapes de la mise en place du système HACCP

La mise en application des sept principes de la méthode HACCP passe par la réalisation d'une série d'activités se succédant dans un ordre logique et correspondant à un véritable « plan de travail » comprenant, selon l'indication du Codex Alimentarius, 12 étapes de base (Figure 7).

Etape 1 : Construire l'équipe HACCP

Constituez une équipe multidisciplinaire composée de représentants des départements de la production, des installations sanitaires, de la maîtrise de la qualité et de la microbiologie alimentaire. Chaque membre de l'équipe doit être chargé de segments spécifiques de la chaîne alimentaire devant être couverts par le système HACCP et œuvrer au développement du système décrit à partir de l'étape 2. La direction doit accorder un appui total à cette équipe.

Etape 2 : Décrire le produit fini

Il faut définir tous les paramètres pour l'obtention du produit fini : matières premières, ingrédients, formulation et composition du produit : volume, forme, structure, texture, caractéristiques physico-chimiques (pH, Aw, conservateurs) et températures de stockage, de cuisson et de distribution ainsi que l'emballage

Etape 3 : Identifier l'utilisation attendue du produit fini

L'utilisation attendue du produit se réfère à son usage normal par le consommateur. L'équipe HACCP doit spécifier à quel endroit le produit sera vendu, le groupe de consommateurs ciblés, surtout lorsqu'il s'agit de personnes sensibles (nourrissons, femmes enceintes, personnes âgées ou immunodéprimées).

L'identification de l'utilisation attendue du produit consiste également à la détermination de la durée de vie du produit (date limite de consommation ou de conservation), et des instructions éventuelles d'utilisation.

Etape 4 : Etablir le diagramme de fabrication

Il reprend les principales étapes du processus de fabrication (de la réception des matières premières jusqu'à l'expédition du produit fini). Le diagramme doit être accompagné d'un schéma illustrant les mouvements de matières, ingrédients, emballages.... Ce schéma doit aider à repérer toutes les zones de contamination croisée potentielle dans l'établissement (les vestiaires, les toilettes, les cafétérias).

Etape 5 : Confirmer le diagramme de fabrication

Etude HACCP, Cette phase se base sur les 7 principes HACCP. Elle détermine les points critiques à maîtriser (CCP).

Etape 6 : Analyse des dangers (principe 1)

L'analyse des dangers est l'étape permettant d'énumérer tous les dangers auxquels on peut raisonnablement s'attendre à chacune des étapes du diagramme de fabrication : réception, production, transformation, stockage, distribution et consommation finale.

a. énumération des dangers potentiels

Il s'agit dans un premier temps de lister l'ensemble des dangers qui peuvent apparaître au cours des phases de vie du produit.

Les groupes de dangers à considérer sont les suivants :

- **Chimiques** : sont les produits chimiques risquant d'entrer en contact avec le produit (résidus de nettoyage, antibiotiques, allergènes, OGM...) ;
- **Physiques** : sont l'ensemble des corps étrangers susceptibles de contaminer le produit (os, métal, bois, carton, verre, plastique...) ;
- **Micro biologiques et biologiques** : sont d'une part les types d'êtres vivants pouvant être à l'origine de contaminations et d'autre part les microorganismes et les toxines pouvant contaminer et/ou se développer dans les matières premières et/ou le produit fini (germes pathogènes, germes indicateurs d'hygiènes, possibilité de survie de toxines produites par des microorganismes).

Pour chaque danger, on définit une origine. Les dangers peuvent être classés selon 5 origines : personnel, équipement, environnement, matières premières, processus. Pour trouver cette origine on peut utiliser la méthode des 5 M (Matières premières, Mode opératoire, Milieu, Main d'œuvre, Méthode) (Figure 5).

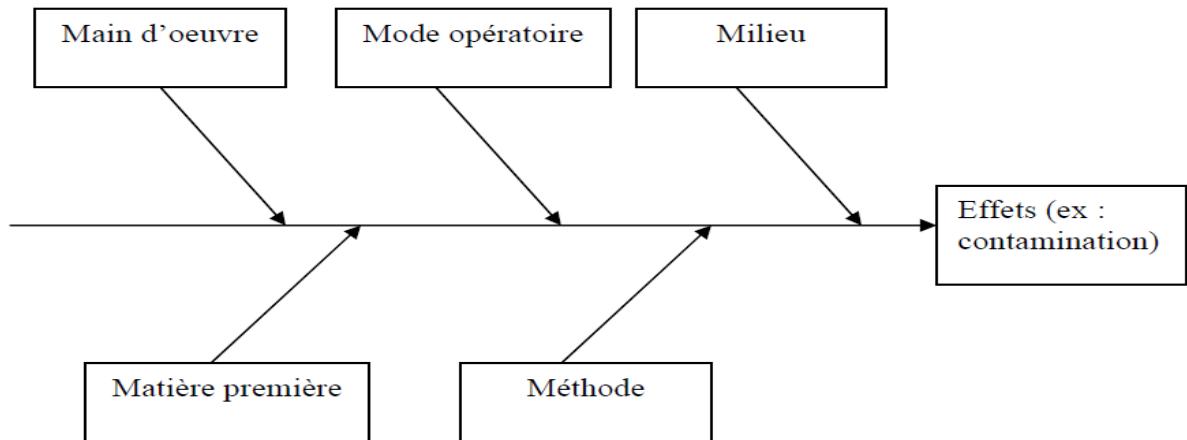


Figure 5. Le diagramme cause effet (Chauvel, 1994).

b. analyse des risques

Le risque est une fonction de la probabilité d'un effet néfaste sur la santé et de la gravité de cet effet résultant d'un ou de plusieurs dangers dans un aliment.

Une évaluation qualitative (conséquence, gravité) et éventuellement quantitative (probabilité d'apparition, fréquence) des dangers doit être effectuée pour évaluer le degré du risque.

A partir de ces données, une hiérarchisation des dangers peut être réalisée.

c. établissement des mesures de maîtrise

Les mesures de maîtrise sont des actions, activités, matériels ou facteurs nécessaires pour éliminer les dangers ou réduire leur probabilité d'apparition à un niveau acceptable.

Les mesures sont définies à partir :

- Des causes identifiées et de leur évaluation.
- Des moyens et ressources de l'entreprise (matériel, technique, humains)

Les mesures de maîtrise doivent être formalisées sous forme de procédures ou d'instructions.

Etape 7 : Détermination des CCP à l'aide de l'arbre de décision (principe 2)

Un CCP ou contrôle du point critique est une procédure où étape ou la perte de maîtrise entraîne un risque inacceptable. Il faut retenir que globalement un CCP est une opération pour laquelle, en cas de perte de maîtrise, aucune opération ne viendra compenser la déviation qui s'est produite et qui entraînera un risque inacceptable.

L'utilisation de l'arbre de décisions proposé par le codex alimentarius est un outil pour la détermination des CCP parmi l'ensemble des dangers listés à l'étape précédente (Figure 6).

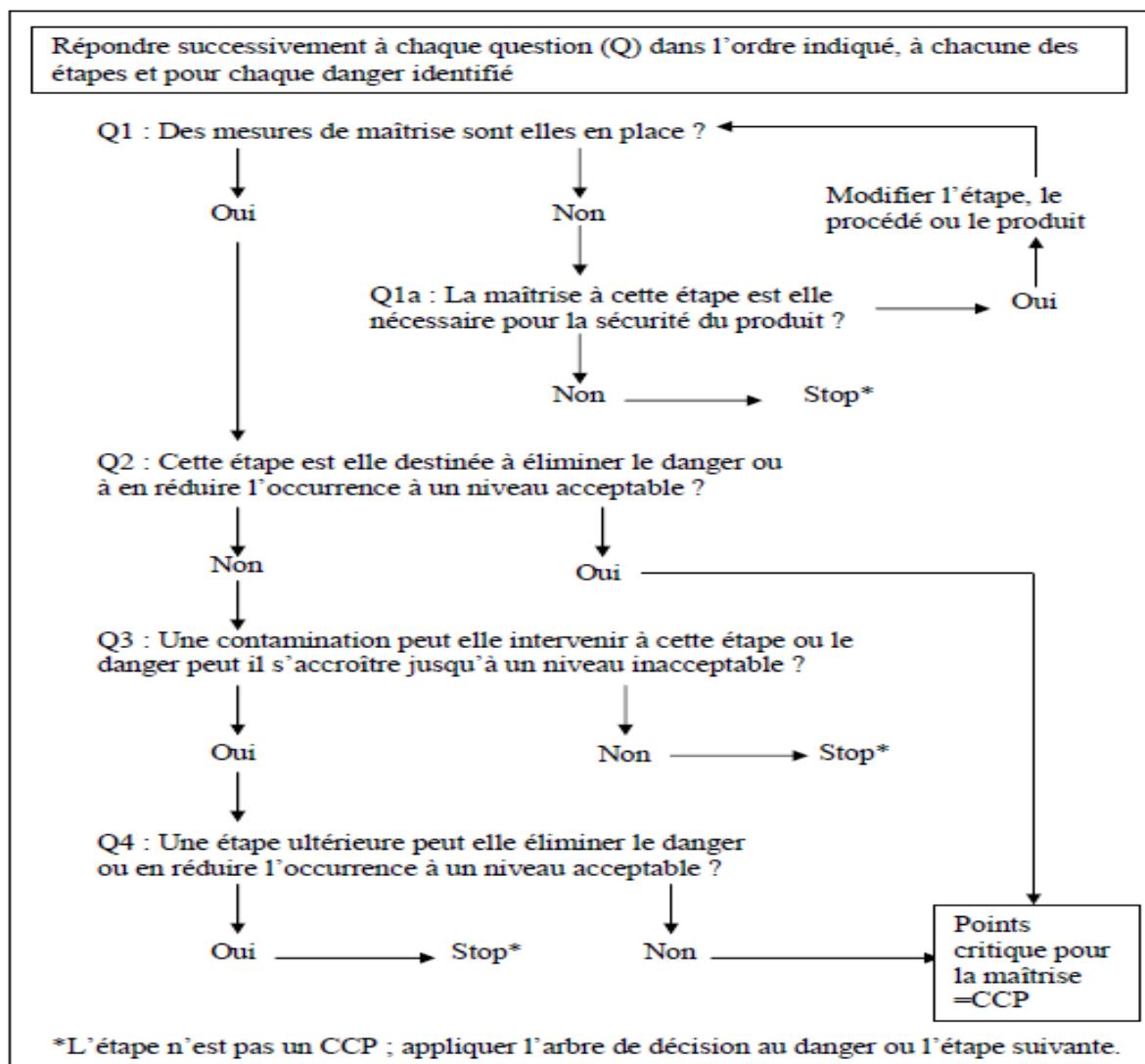


Figure 6. Arbre de décision pour la détermination des CCP sur les étapes de fabrication (Codex Alimentarius). <http://www.who.int/fsf/Codexreview/diagramCodexHACCP.pdf>

Les limites critiques fixent les frontières de l'acceptabilité. Elles peuvent être des valeurs chiffrées, des paramètres sensoriels ou des réalisations.

Etape 9 : Etablir un système de surveillance des CCP (principe 4)

Cette étape doit permettre de mesurer ou d'observer les seuils critiques correspondant à un CCP. Les mesures sont des actions de surveillance enregistrées afin d'apporter la preuve de la maîtrise du CCP. Les procédures appliquées doivent être en mesure de détecter toute perte de maîtrise.

Pour chaque action de surveillance, à travers une procédure, doivent être précisés si nécessaire :

- La méthode utilisée pour la surveillance ;
- Le mode opératoire ;
- Les responsabilités d'exécution et d'interprétation des résultats ;
- La fréquence de l'observation ;
- Le plan d'échantillonnage ;
- Les modalités d'enregistrement des résultats.

Il existe deux types de surveillance :

- ✓ La surveillance continue qui permet de conserver l'enregistrement de la surveillance et d'agir en temps réel, notamment lors du déclenchement d'actions correctives.
- ✓ La surveillance discontinue qui demande des réponses accessibles rapidement du type oui ou non (check list) à une fréquence définie.

Etape 10 : Etablir des mesures correctives (principe 5)

Des mesures correctives doivent être prévues pour chaque CCP afin de pouvoir rectifier les écarts. Ces mesures doivent garantir que le CCP a été maîtrisé et prévoir le sort qui sera réservé au produit en cause : destruction, déclassement, retouche, identification et traçabilité.

Etape 11 : Etablir des procédures de vérification (principe 6)

Cette étape consiste à vérifier l'efficacité du système mais également son application effective. On peut avoir recours à des méthodes, des procédures et des tests de vérification et d'audit, notamment au prélèvement et à l'analyse d'échantillons aléatoires, pour déterminer si le système fonctionne correctement.

Etape 12 : Etablir un système documentaire (principe 7)

Le système documentaire doit comporter deux types de document :

- ❖ Le manuel HACCP qui comprend l'ensemble des documents définis lors de l'énumération des différentes étapes :
 - diagramme de fabrication, liste de dangers, définitions des responsabilités...
 - Les enregistrements.

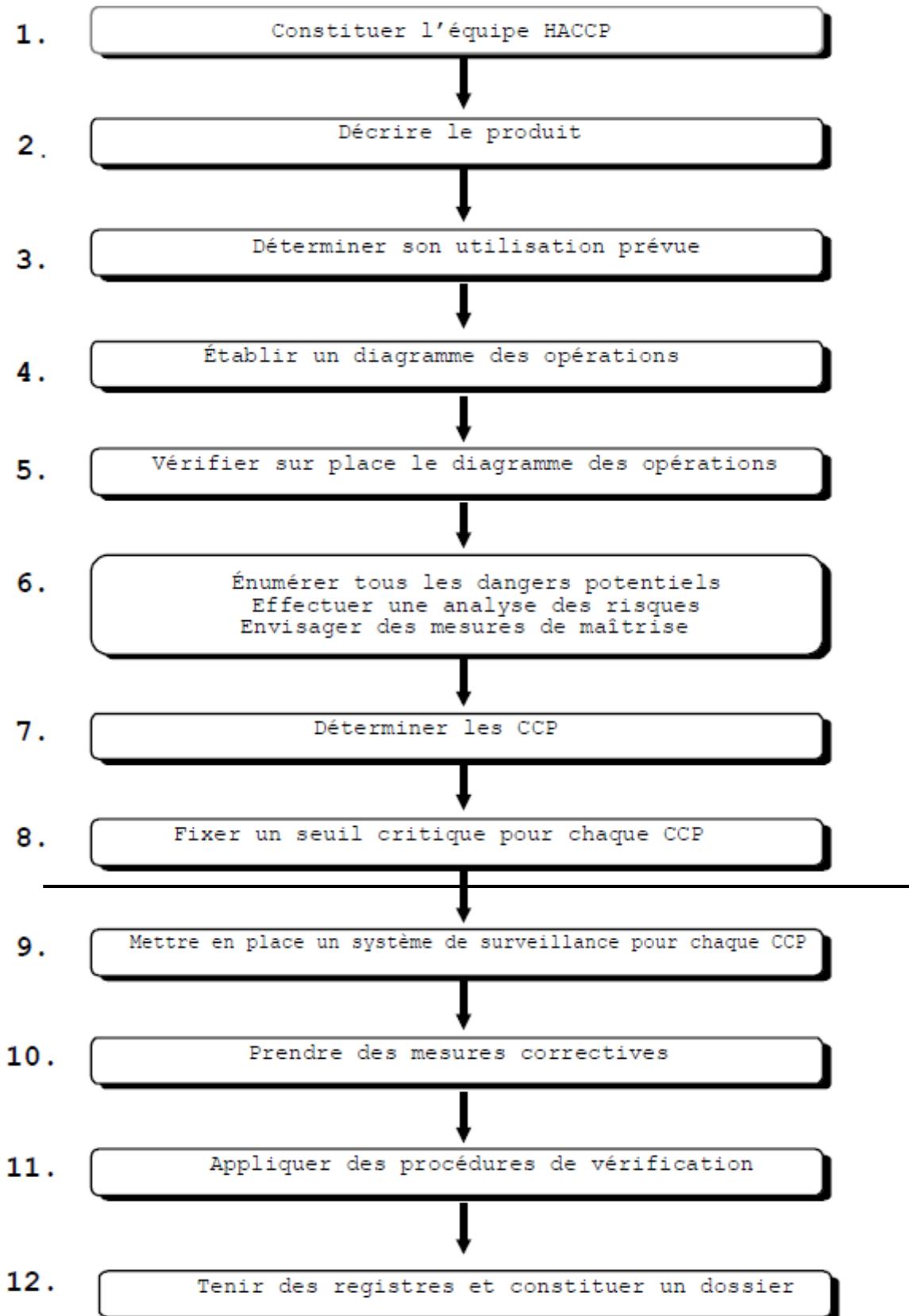


Figure 7. Séquence logique d'application du HACCP
(Codex Alimentarius, CAC/RCP 1-1969, rév. 4, 2003).