

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 26 août 2015

## **AVIS**

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

**relatif à « l'évaluation du protocole d'échantillonnage et d'analyse de (i) graines destinées à la production de graines germées et de (ii) graines germées**

---

*L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.*

*L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.*

*Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.*

*Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).*

*Ses avis sont rendus publics.*

---

L'Anses a été saisie le 8 août 2013 par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) et la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : Évaluation du protocole d'échantillonnage et d'analyse de (i) graines destinées à la production de graines germées et de (ii) graines germées.

#### **1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE**

Suite à l'apparition dans l'Union Européenne en 2011 d'épidémies de syndromes hémolytiques urémiques dues à la consommation de graines germées contaminées par des *E. coli* productrices de shigatoxines (STEC), le règlement (CE) n°209/2013 modifie le règlement (CE) n°2073/2005 pour y introduire un critère microbiologique relatif aux *E. coli* STEC pour les graines germées au stade de leur mise sur le marché.

Ce règlement prévoit notamment des règles d'échantillonnage pour l'analyse préalable de chaque lot de graines et d'analyses en cours de production de graines germées. Il précise au point A.1 que « *les exploitants du secteur alimentaire producteurs de germes<sup>1</sup> procèdent à l'analyse préalable d'un échantillon représentatif de tous les lots<sup>2</sup> de graines. Un échantillon représentatif doit comprendre au moins 0,5% du poids du lot de graines en sous-échantillons de 50 g ou être sélectionné sur la base d'une stratégie d'échantillonnage structurée, statistiquement équivalente et contrôlée par l'autorité compétente* ».

---

<sup>1</sup> Germe : « Produit obtenu par germination et développement d'une graine dans l'eau ou dans un autre milieu, récolté avant que les premières feuilles ne se développent et destiné à être consommé entier, avec la graine. » Règlement d'exécution (UE) n°208/2013, article 2.

<sup>2</sup> Lot : « Quantité de germes ou de graines destinées à la production de germes ayant le même nom taxonomique, expédiées le même jour à partir d'un même établissement vers une même destination. Un envoi peut être constitué d'un ou plusieurs lots. » Règlement d'exécution (UE) n°208/2013, article 2.

L'Association française des producteurs de graines germées (AFPGG) a élaboré, en 2011, une « Charte qualité et sécurité – engagement des producteurs » qui prévoit également des procédures d'échantillonnage pour l'analyse préalable du lot de graines et d'analyses en cours de production des germes. Toutefois les procédures proposées par la charte AFPGG diffèrent de celles du règlement. Concernant l'analyse préalable de chaque lot de graines, la charte AFPGG prévoit notamment, pour l'analyse préalable de chaque lot de graines, un échantillon d'au moins 100 000 graines pour les petites graines (carotte, moutarde, alfalfa, etc.), les graines moyennes (fenugrec, radis, lentille) et les grosses graines (tournesol, soja/haricot mungo) et d'au moins 20 000 graines pour les très grosses graines (pois chiche).

Il est ainsi demandé à l'Anses de vérifier que :

- le protocole d'échantillonnage décrit dans la charte de l'AFPGG pour l'analyse préalable de chaque lot de graines est statistiquement équivalent à celui préconisé par le règlement (CE) n°209/2013 ;
- compte tenu du contrôle libératoire de chaque lot de graines avant sa première mise en production, l'analyse systématique libératoire des eaux de drainage et du contrôle des produits finis par échantillonnage, le respect de la charte qualité et sécurité de l'AFPGG permet-il aux producteurs de graines germées d'éviter l'analyse préalable du lot de graines prévu au point A.1 du règlement (CE) n°209/2013.

Il convient de noter que la charte « contrôle qualité des graines germées » rédigée par l'AFPGG décrit uniquement une brève méthodologie de plan d'échantillonnage et ne peut s'apparenter à un guide de bonnes pratiques d'hygiène et d'application des principes HACCP. Dans l'objectif d'assurer la sécurité de la mise sur le marché des graines germées en France, il est nécessaire de disposer d'un guide de bonnes pratiques d'hygiène et application HACCP (point B du règlement (CE) n°209/2013). La seconde question ne pourra donc pas être instruite dans le cadre de cette saisine.

Par conséquent, la question instruite est la suivante :

Le protocole d'échantillonnage décrit dans la charte de l'AFPGG pour l'analyse préalable de chaque lot de graines est-il statistiquement équivalent à celui préconisé par le règlement (CE) n°209/2013 ?

## **2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE**

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

L'expertise relève du domaine de compétences du comité d'experts spécialisé « Évaluation des risques biologiques liés aux aliments » (CES BIORISK). L'expertise a été conduite par plusieurs rapporteurs sur la base d'un rapport réalisé par une unité interne aux directions d'expertise. Les travaux ont été présentés au CES BIORISK tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques et ont été adoptés par le CES réuni le 2 juillet 2015.

L'expertise des rapporteurs s'est appuyée sur :

- le règlement (CE) n°209/2013 de la commission du 11 mars 2013 modifiant le règlement (CE) n°2073/2005 en ce qui concerne les critères microbiologiques applicables aux germes et les règles d'échantillonnage applicables aux carcasses de volailles et à la viande fraîche de volaille ;
- la « charte qualité et sécurité – engagement des producteurs » de l'AFPGG de 2011 ;
- des documents scientifiques d'intérêt référencés à la fin de l'avis ;
- l'audition de l'Association française des producteurs de graines germées (AFPGG) réalisée le 1<sup>er</sup> décembre 2014.

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

Les déclarations d'intérêts des experts sont rendues publiques *via* le site internet de l'Anses ([www.anses.fr](http://www.anses.fr)).

### **3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES**

L'avis présente, dans une première partie, les procédés de production de graines germées ainsi que les préconisations du règlement (CE) n°209/2013 et de la charte AFPGG en termes d'échantillonnage et d'analyses ; puis dans une seconde partie de l'avis, l'efficacité des préconisations à détecter la contamination est comparée pour l'analyse préalable du lot puis au cours du procédé de production dans son ensemble (analyse préalable du lot et analyses en cours de production).

Dans la suite de cet avis, afin d'éviter toute confusion, le terme « graines » désigne la graine avant toute étape de germination, le terme « germes » désigne le produit obtenu par germination et le terme « eau d'irrigation usée » désigne l'eau d'irrigation après son utilisation pour la production de germes.

#### **3.1. Procédés de production des germes et règles d'échantillonnage et d'analyses**

##### **3.1.1. Procédés de production**

En France, les quatre principaux opérateurs nationaux produisent principalement des germes de haricots mungo<sup>3</sup> (15 300 tonnes par an, dont deux tiers sont commercialisés appertisés ou en conserves et un tiers est destiné à la 4<sup>ème</sup> gamme, expression qui désigne les végétaux prêts à être consommés crus) ; les autres germes produits (alfalfa, radis, lentilles, poireau, etc.) représentent seulement une production de 900 tonnes par an, dont 100% est commercialisé en 4<sup>ème</sup> gamme (audition de l'AFP GG, 1<sup>er</sup> décembre 2014).

Les étapes de production de germes sont les suivantes : réception des graines, stockage, nettoyage et désinfection, germination, lavage, essorage, conditionnement et expédition. La germination est réalisée par trempage des graines dans de l'eau dans des conditions optimales contrôlées (température, humidité, aération, temps de germination, etc.) et adaptées à chaque type de graines. Ainsi, par exemple, le procédé de germination des graines d'alfalfa (petites graines) et de haricot mungo (grosses graines) sont différents (Hora et *al.*, 2005 ; NACMCF, 1999) :

- Les graines d'alfalfa germent principalement à la lumière, dans des germoirs rotatifs, ou disposées en monocouche dans des germoirs statiques (plateaux en étages). Les germoirs rotatifs peuvent contenir entre 3 et 45 kg de graines (45 kg de graines d'alfalfa permettant la production de plus de 200 kg de germes). La température optimale de germination est souvent proche de 23 - 24°C. L'aspersion des graines est réalisée par de l'eau propre pendant 10 secondes toutes les 10 minutes. Le temps moyen de germination est de 3 à 5 jours.
- Les graines de haricot mungo germent principalement en multicouches (15 cm d'épaisseur) dans des bacs de culture, à l'obscurité. Les bacs peuvent contenir entre 25 et 75 kg de graines (la masse des graines augmente d'un facteur 10 en fin de germination : 45 kg de graines entraînant la production de 450 kg de germes ; NACMCF, 1999). La température de germination varie entre 21 et 26 °C. L'aspersion des graines est réalisée par de l'eau propre pendant une minute toutes les 3 à 6 heures. Le temps moyen de germination est de 5 à 6 jours.

<sup>3</sup> Communément dénommés « germes de soja ».

Ces conditions optimales de germination correspondent également à l'environnement optimal de croissance de certaines bactéries ; ainsi, si des bactéries pathogènes sont présentes sur ou dans une graine, les conditions de germination peuvent permettre leurs proliférations. De nombreuses études ont montré une augmentation de la concentration bactérienne de 2 à 3 log dans les deux premiers jours de germination de graines de riz, d'alfalfa et de haricot mungo (Piernas and Guiraud, 1997 ; Andrews et *al.*, 1982 ; Splittstoesser et *al.*, 1983).

La présence de bactéries sur ou dans les germes a principalement comme origine la contamination des graines, due à de mauvaises pratiques agricoles, mais peut également correspondre à une contamination au cours du processus de germination, due à de mauvaises pratiques d'hygiène (NACMCF, 1999).

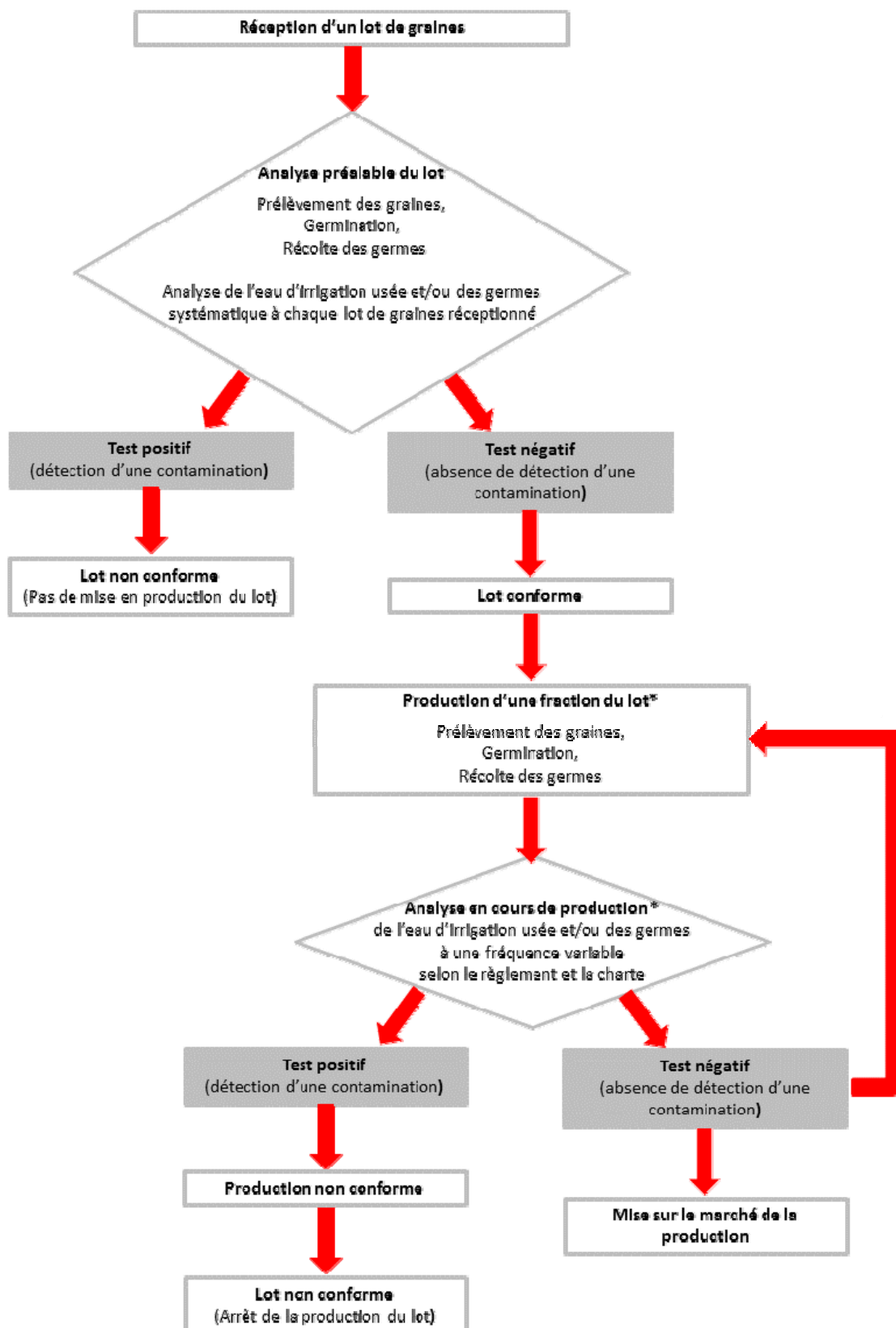
Lors d'une épidémie de 133 cas de salmonelloses à *Salmonella* Newport entre 1995 et 1996 aux États-Unis, le niveau de contamination des graines a été estimé entre 4 et 24 ufc/kg de graines (Van Beneden et *al.*, 1999). Les graines incriminées dans l'épidémie de 1998, aux États-Unis (18 cas de salmonelloses ; *Salmonella* Havana) présentaient des concentrations proches de 4 ufc/kg (NACMCF, 1999).

### **3.1.2. Règles d'échantillonnage et analyses**

Après les épidémies de syndromes hémolytiques urémiques, survenues en 2011, le règlement (CE) n°209/2013 a introduit un critère microbiologique relatif aux STEC pour les germes et prévoit notamment des règles d'échantillonnage pour (i) l'analyse préalable de chaque lot de graines et (ii) les analyses au cours de la production de germes<sup>4</sup>. L'analyse préalable de chaque lot de graines correspond à une analyse libératoire : lorsque les résultats de ces analyses sont négatifs, le lot peut être mis en production en vue d'une mise sur le marché (Figure 1).

---

<sup>4</sup> Chaque lot est divisé en fractions de lot, mises en production les unes après les autres, pour un jour donné et dans des conditions similaires, dans le but de commercialiser les germes produits.



**Figure 1** : Schéma des analyses réalisées avant la mise sur le marché de germes selon le règlement et la charte.

\* : Ces étapes sont répétées jusqu'à la mise en production de la totalité des fractions constituant le lot.

### 3.1.2.1. Règles d'échantillonnage et analyses selon le règlement

#### L'analyse préalable de chaque lot de graines

Selon le règlement, l'analyse préalable d'un lot de graines nécessite la constitution d'un échantillon représentatif du lot comprenant au moins 0,5% de la masse du lot de graines, en sous-échantillons de 50 g. Les graines de cet échantillon sont mises à germer dans les mêmes conditions que la production du reste du lot de graines. Le prélèvement pour l'analyse est réalisé à l'étape où la probabilité de trouver des bactéries est la plus grande et quoi qu'il en soit pas avant 48 h après le début du processus de germination. Les exploitants ont le choix entre deux analyses pour valider le lot de graines :

- L'analyse des germes, sur la base des critères microbiologiques *E. coli* STEC et O104:H4 (n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode EN ISO TS 13136 suivant la dernière adaptation par le LRUE, incluant STEC O104:H4), et *Salmonella* spp. (n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode EN ISO 6579)<sup>5</sup>.
- **Ou** l'analyse de l'eau d'irrigation usée, sur la base des critères microbiologiques *E. coli* STEC et O104:H4 (n=5, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode EN ISO TS 13136) et *Salmonella* spp. (n=5, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode EN ISO 6579)<sup>5</sup>.

Le règlement (considérant 11 et annexe A.2) permet l'analyse de l'eau d'irrigation usée en remplacement de l'analyse des germes, à la condition que l'exploitant dispose d'un plan d'échantillonnage, comprenant des procédures d'échantillonnage et des points de prélèvement des eaux d'irrigation usées.

Lorsque l'analyse préalable du lot de graines ne révèle pas la contamination des germes ou de l'eau d'irrigation par *E. coli* STEC ou *Salmonella* spp., le reste du lot de graines peut être mis en production en vue d'une mise sur le marché des germes produits (sachant que le reste du lot est divisé en fractions de lot, mises en production les unes après les autres) (Figure 1).

#### Les analyses en cours de production de germes

Lors de la production des germes à destination de la consommation, à partir d'une fraction du lot, le règlement prévoit une analyse de germes ou de l'eau d'irrigation usée (selon les conditions détaillées ci-dessus dans l'analyse préalable du lot de graines). Ces analyses sont réalisées au moins une fois par mois.

### 3.1.2.2. Règles d'échantillonnage et analyses selon la charte de l'AFPGG

Sur un schéma d'analyses assez proches, la charte de l'AFPGG propose d'autres règles concernant l'échantillonnage, l'analyse préalable de chaque lot de graines et les analyses à réaliser en cours de production.

#### L'analyse préalable de chaque lot de graines

L'analyse préalable de chaque lot de graines nécessite la constitution d'un échantillon composite (cf. avis ANSES du 11 janvier 2011, saisine 2010-SA-0031) de 100 000 graines, sauf pour les très grosses graines pour lesquelles le prélèvement se limite à 20 000 graines. La masse de cet échantillon est ainsi dépendante de la masse des graines (Charte AFPGG, 2013) :

- les petites graines (alfalfa, carotte, moutarde, etc.) : 100 000 graines constituent environ 0,5 kg,
- les graines moyennes (fenugrec, radis, lentille, etc.) : 100 000 graines constituent environ 3 kg,
- les grosses graines (haricot mungo, tournesol, etc.) : 100 000 graines constituent environ 7 kg,
- et les très grosses graines (pois chiche, etc.) : 20 000 graines constituent environ 7 kg.

<sup>5</sup> Le règlement prévoit que des méthodes alternatives validées suivant l'EN ISO 16140 peuvent également être utilisées.

Il est précisé dans la charte que les conditions de temps/température/humidité habituelles de germination sont appliquées.

Les analyses effectuées sont les suivantes :

- L'analyse des germes, sur la base des critères microbiologiques suivants : *E. coli* STEC et O104:H4 (n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode reconnue à date par le laboratoire national de référence pour la détection des STEC majeurs et O104:H4), *Salmonella* spp. (n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode EN ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode EN ISO 11290-1) et *Bacillus cereus* (n=5, c=2, m=1000 ufc/g, M=10 000 ufc/g - selon la méthode EN ISO 7932 ; en cas de dépassement de m, le lot de graines est soumis à un traitement de sanitation (les modalités de « sanitation » ne sont pas précisées) ; un second test de germination permettra alors d'accepter ou de refuser le lot de graines ; critère temporaire sous réserve d'évaluation après 12 mois).
- **Et** l'analyse de l'eau d'irrigation usée, sur la base des critères microbiologiques suivants : *E. coli* STEC et O104:H4 (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode reconnue à date par le laboratoire national de référence pour la détection des STEC majeurs et O104:H4), *Salmonella* spp. (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode EN/ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (n=1, c=0, absence dans 25 mL, selon la méthode EN/ISO 11290-1) et *Bacillus cereus* (n=1, c=1, m=100 ufc/mL, M=1000 ufc/mL - selon la méthode EN/ISO 7932 ; en cas de dépassement de m, le lot de graines est soumis à un traitement de sanitation ; un second test de germination permettra alors d'accepter ou de refuser le lot de graines ; critère temporaire sous réserve d'évaluation après 12 mois).

Des méthodes alternatives validées suivant l'EN ISO 16140 peuvent également être utilisées au lieu des méthodes EN/ISO citées.

Tout comme pour le règlement, lorsque l'analyse préalable du lot de graines ne révèle pas la contamination des germes ni de l'eau d'irrigation usée, le lot de graines est considéré comme conforme à la production de germes. Ce lot peut donc être mis en production (sous forme de différentes fractions de lot) en vue d'une mise sur le marché des germes produits (Figure 1).

#### Les analyses réalisées en cours de production de germes

Lors de la production des germes à destination de la consommation, la charte AFPGG prévoit des analyses de germes et de l'eau d'irrigation usée à différentes fréquences.

- L'analyse des germes, pour laquelle deux plans d'échantillonnage sont proposés : n=1 ou n=5<sup>6</sup>, sans explication sur le choix de l'un ou l'autre. Les critères microbiologiques sont les suivants : *E. coli* STEC et O104:H4 (n=1 ou n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode reconnue à date par le laboratoire national de référence pour la détection des STEC majeurs et O104:H4), *Salmonella* (n=1 ou n=5, c=0, absence dans 25 g, selon la méthode EN/ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (n=1, c=0, absence dans 25 g ou n=5, c=1, absence dans 25 g, selon la méthode EN/ISO 11290-1), dénombrement de *Listeria monocytogenes* (n=1, c=0, m=M=10 ufc/g, selon la méthode EN/ISO 11290-2 ; en cas de présence de *L. monocytogenes* des analyses des produits finis concernés doivent être effectuées sur chaque lot, avec n=5, c=1, présence et dénombrement <10ufc/g sous réserve que l'ensemble des résultats soient <100 ufc/g), dénombrement de *Bacillus cereus* (n=1, c=0, m=M=1000 ufc/g ou n=5, c=2, m=1000 ufc/g, M=10 000 ufc/g, selon la méthode EN/ISO 7932 - critères temporaires sous réserve d'évaluation après 12 mois) et *E. coli* (n=1, c=0, m=M=100 ufc/g ou n=5, c=2, m=100 ufc/g, M=1000 ufc/g, selon la méthode EN ISO 16649-1 ou 2).

Des méthodes alternatives validées suivant l'EN ISO 16140 peuvent également être utilisées au lieu des méthodes EN ISO citées. La fréquence de ces analyses est au minimum hebdomadaire.

<sup>6</sup> Selon les représentants de l'AFPGG, quand n=5, une seule analyse est réalisée après mélange des 5 prélèvements.

- L'analyse de l'eau d'irrigation usée, pour laquelle deux techniques de prélèvement sont présentées : le prélèvement, de façon stérile, de 500 mL à la sortie de chaque entité de germination ou la réalisation d'un échantillon composite de dix entités de germination (10x100 mL), entre 48 h et 72 h après la mise en germination.

Pour chaque prélèvement (500 mL ou 1 L composite), l'analyse dépend des ventes :

- o Pour des ventes supérieures à 5000 unités de vente consommateur (UVC) par semaine, l'analyse est systématique ou quotidienne et vise les critères suivants : *E. coli* STEC et O104:H4 (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode reconnue à date par le laboratoire national de référence pour la détection des STEC majeurs et O104:H4) et *Salmonella* spp. (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode EN ISO 6579).
- o Pour les ventes inférieures à 5000 UVC par semaine et lorsque l'analyse des dangers et l'historique des résultats le permet (sur la base d'au moins 30 semaines consécutives de résultats satisfaisants), un contrôle quotidien non systématique peut être effectué, sous réserve que l'ensemble des enceintes de germination et des références soient analysées hebdomadairement. L'analyse hebdomadaire vise les critères suivants : *E. coli* STEC et O104:H4 (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode reconnue à date par le laboratoire national de référence pour la détection des STEC majeurs et O104:H4), *Salmonella* spp. (n=1, c=0, absence dans 200 mL, selon la méthode EN/ISO 6579), *Listeria monocytogenes* (n=1, c=0, absence dans 25 mL, selon la méthode EN/ISO 11290-1), *Bacillus cereus* (n=1, c=1, m=100 ufc/mL, M=1000 ufc/mL – selon méthode EN/ISO 7932 - critère temporaire sous réserve d'évaluation après 12 mois) et *E. coli* (n=1, c=1, m=10 ufc/g, M=100 ufc/g – selon méthode EN/ISO 16649-1 ou 2).

### 3.1.2.3. Remarques relatives à l'interprétation du règlement (CE) n°209/2013 et de la charte de l'AFPGG

Le tableau 1 résume l'échantillonnage et les analyses préconisées par le règlement (CE) n°209/2013 et la charte de l'AFPGG. On peut noter que la charte, comme le règlement, manque de précisions quant aux techniques d'analyse (notamment sur le recours éventuel à la filtration pour les eaux d'irrigation usées, compte-tenu des volumes à analyser) et aux techniques de regroupement de prises d'essais. Il est à noter que les normes en microbiologie des aliments ne prévoient explicitement le recours à la concentration des bactéries par filtration que pour les dénombrements.



**Tableau 1.** Principales différences d'échantillonnage et d'analyse entre le règlement (CE) n°209/2013 et la charte de l'AFPGG

	Étape du procédé	Règlement CE n°209/2013	Charte de l'AFPGG
Analyse préalable du lot de graines	Masse de l'échantillon de graines prélevé	0,5% de la masse du lot en sous-échantillons de 50 g (soit 2,5 kg à 150 kg pour des lots de 500 kg à 30 000 kg)	100 000 graines, 20 000 pour les très grosses graines (soit 0,5 kg à 7 kg pour des petites à grosses/très grosses graines)
	Objet de l'analyse	Germes <b>ou</b> Eau d'irrigation usée	Germes <b>et</b> Eau d'irrigation usée
	Masse des germes analysés	125 g (n=5x25 g)	125 g (n=5x25 g)
	Volume d'eau d'irrigation analysé	1 L (n=5x200 mL)	200 mL (n=1x200 mL)
	Fréquence des analyses	Systematique à chaque lot	Systematique à chaque lot
Analyses en cours de production de différentes fractions du lot	Objet de l'analyse	Germes <b>ou</b> Eau d'irrigation usée	Germes <b>et</b> Eau d'irrigation usée
	Masse des germes analysés	125 g (n=5x25 g)	125 g (n=5x25 g)* <b>ou</b> 25 g (n=1x25 g)
	Volume d'eau d'irrigation analysé	1 L (n=5x200 mL)	200 mL (n=1x200 mL)
	Fréquence des analyses	<i>A minima</i> mensuelle	<i>A minima</i> hebdomadaire

\* : Selon les représentants de l'AFPGG, quand n=5, une seule analyse est réalisée après mélange des cinq prélèvements.

#### Remarques relatives à l'interprétation du règlement

Concernant la réalisation de l'échantillon pour l'analyse préalable du lot de graines, le règlement manque de précision quant au nombre de sacs prélevés et à la technique d'échantillonnage.

On peut s'interroger sur l'intérêt de faire germer jusqu'à 150 kg de graines ( pour un lot de 30 000 kg) pour en analyser seulement 125 g. Cela relativise l'avantage statistique du protocole d'échantillonnage du règlement.

De plus, concernant l'analyse de l'eau d'irrigation usée, le règlement précise que l'échantillon d'eau doit être prélevé à l'étape de la germination où la probabilité de trouver *E. coli* STEC et *Salmonella* spp. est la plus grande (pas avant 48 h après le début de la mise en germination des graines). Le moment où cette probabilité est la plus grande est mal défini et laisse donc penser que les analyses sont réalisées à 48 h.

### Remarques relatives à l'interprétation de la charte de l'AFPGG

Pour l'analyse des germes, l'AFPGG accepte l'utilisation de la méthode dite de « wet pooling » (« *en attendant sa validation par la profession européenne dans un délai raisonnable* »). L'AFPGG n'en détaille pas les principes et méthodes mais lors de leur audition, ses représentants ont fait état d'un protocole s'apparentant à celui de la méthode de prises d'essai groupées (pré-)enrichies actuellement en projet dans la révision de la norme EN ISO 6887-1. Sa description et la précision d'un délai raisonnable pour sa validation devraient cependant être inscrites dans la charte.

Concernant le critère *Bacillus cereus* ( $n=1$ ,  $c=1$ ,  $m=100$  ufc/mL,  $M=1000$  ufc/mL - selon la méthode EN ISO 7932), il est indiqué qu'en cas de dépassement de  $m$ , le lot de graines est soumis à un traitement de « sanitation », à la suite duquel un second test de germination permet alors dans ce cas d'accepter ou de refuser le lot de graines. Il conviendrait de définir clairement le terme « sanitation » (désinfection, décontamination, lavage, traitement physique, chimique, etc.). De plus, tant que l'efficacité d'une telle pratique sur les graines n'est pas démontrée, le second test revient à reproduire une analyse préalable du lot de graines pour définir la conformité du lot, ce qui n'est pas permis.

Selon la charte, les analyses des germes et de l'eau d'irrigation usée sont toutes réalisées à l'issue du test de germination, mené à son terme, sans laisser l'opportunité d'une analyse « 48 h après le début du processus de germination » comme proposé dans le règlement. Cette disposition implique une période de multiplication bactérienne plus longue que les 48 h minimum du règlement, dans les cas où le processus de germination est supérieur à 48 h, et donc *a priori* plus propice dans ce dernier cas à la détection des bactéries recherchées.

Concernant les analyses en cours de production de germes à destination de la consommation, il est indiqué dans la charte que « la fréquence de prélèvement est dictée par l'analyse des dangers et les historiques de résultats » et que « ce contrôle doit être libératoire pour tous les types de production, c'est-à-dire que 95% minimum des lots sont libérés une fois l'analyse terminée ». Cette dernière phrase manque pour le moins de clarté et semble inutile au vu des autres éléments concernant l'analyse des eaux d'irrigation usées, à moins de précisions complémentaires apportées par l'AFPGG. En outre, deux cas d'échantillonnage  $n=1$  ou  $n=5$  sont présentés pour l'analyse des germes, sans précision sur le choix de l'emploi de l'un ou de l'autre.

## **3.2. Comparaison de l'efficacité de détection des lots contaminés selon les modalités du règlement et de la charte de l'AFPGG**

### **3.2.1. Définition des scénarios considérés pour comparer la charte au règlement**

Le règlement (CE) n°209/2013 donne la possibilité de choisir entre deux types d'analyse : soit une analyse des germes, soit une analyse de l'eau (Tableau 1). Quatre scénarios ont été définis dans le but de comparer le protocole proposé par la charte aux deux options proposées par le règlement (Tableau 2).

- Les deux premiers scénarios (1 et 2) permettent de comparer le règlement et la charte en ne considérant que l'analyse préalable du lot de graines. Ces deux scénarios ne considèrent donc pas l'analyse en cours de production.
  - o Le scénario 1 fait l'hypothèse que le règlement est appliqué en réalisant une analyse sur les germes,
  - o tandis que le scénario 2 fait l'hypothèse que le règlement est appliqué en réalisant une analyse sur l'eau d'irrigation usée.

Dans ces deux scénarios, nous considérons que la charte est appliquée en réalisant à la fois une analyse sur les germes et sur l'eau d'irrigation usée.

- Les deux scénarios suivants (3 et 4) permettent de comparer le règlement et la charte en considérant les deux types d'analyses, c'est-à-dire l'analyse préalable du lot de graines et les analyses en cours de production des différentes fractions du lot.

- Le scénario 3 fait l'hypothèse que le règlement est appliqué en réalisant une analyse sur les germes, à la fois pour l'analyse préalable du lot de graines et pour les analyses en cours de production.
- Le scénario 4 fait l'hypothèse que le règlement est appliqué en analysant l'eau d'irrigation usée, à la fois pour l'analyse préalable du lot de graines et pour les analyses en cours de production.

Dans ces deux scénarios, nous considérons que la charte est appliquée en réalisant à la fois une analyse sur les germes et sur l'eau d'irrigation usée.

Les scénarios 1 et 2 se focalisent sur l'analyse préalable du lot de graines et permettent ainsi de répondre à la question posée par la saisine (le protocole d'échantillonnage de l'AFP GG décrit dans la charte pour l'analyse préalable de chaque lot de graines avant mise en germination est-il statistiquement équivalent à celui préconisé par le règlement (CE) n°209/2013 ?). Les scénarios 3 et 4 fournissent des informations complémentaires sur les capacités de détection des analyses en tenant compte à la fois de l'analyse préalable du lot de graines et des analyses en cours de production des différentes fractions du lot.

### 3.2.1. Scénarios 1 et 3 : application du règlement par l'analyse sur les germes

Selon Hora et *al.* (2005), la distribution de la contamination des graines est hétérogène et le pourcentage d'échantillons positifs lors de la détection d'*E. coli* est significativement supérieur dans l'eau d'irrigation usée que dans les germes de haricots mungo. Le pourcentage d'échantillons positifs oscille majoritairement entre 50 et 85% lorsque l'analyse est réalisée sur l'eau d'irrigation et entre 0 et 30% lorsque l'analyse est réalisée sur les germes (Figure 2A de Hora et *al.*, 2005). Les auteurs recommandent de mélanger les graines dans le germeoir pour homogénéiser la répartition des graines contaminées et augmenter la probabilité de détecter une contamination.

Selon Mc Egan et *al.* (2008), il est préférable de rechercher une éventuelle contamination de graines en analysant l'eau d'irrigation usée plutôt qu'en analysant les germes car la circulation de l'eau d'irrigation rend la contamination de l'eau d'irrigation usée plus uniforme que celle des graines. L'analyse de l'eau d'irrigation est également plus facile à réaliser d'un point de vue pratique.

Ces références bibliographiques indiquent donc que la probabilité de détecter la présence de la bactérie en analysant de l'eau d'irrigation usée est supérieure à celle obtenue avec l'analyse de germes. Par ailleurs, comme mentionné ci-dessus, le règlement stipule que l'analyse sur les germes doit être réalisée sur un échantillon de 125 g de germes (5 échantillons de 25 g, Tableau 1), c'est à dire sur un échantillon initial de graines d'environ 12,5 g, en supposant que la masse des graines augmente d'un facteur 10 au cours de la germination (NACMCF, 1999). Même si le test microbiologique était efficace, la probabilité de détecter la contamination du lot dans un échantillon d'aussi petite taille serait faible, notamment en cas de faible prévalence et de contamination hétérogène.

Les références bibliographiques disponibles indiquent que la probabilité de détecter la présence de la bactérie en analysant de l'eau d'irrigation usée est supérieure à celle obtenue avec l'analyse de germes. Ainsi, la méthode d'analyse proposée par la charte AFP GG est probablement plus efficace que celle du règlement dans le cas où le règlement est appliqué en analysant les germes seuls (situations correspondant aux scénarios 1 et 3 définis ci-dessus).

Toutefois, en raison du faible nombre d'études disponibles, de nombreuses incertitudes persistent, notamment sur la caractérisation de la contamination des germes (prévalence, concentration, homogénéité, etc.), la capacité de détection des contaminations (méthode d'analyse, matrice analysée, probabilité de détection, etc.) ou encore le procédé de germination (type de germes, germeoirs rotatif/statique, temps de germination, volume d'eau utilisé, etc.). Par conséquent, ces conclusions mériteraient d'être étayées par d'autres travaux de recherche.

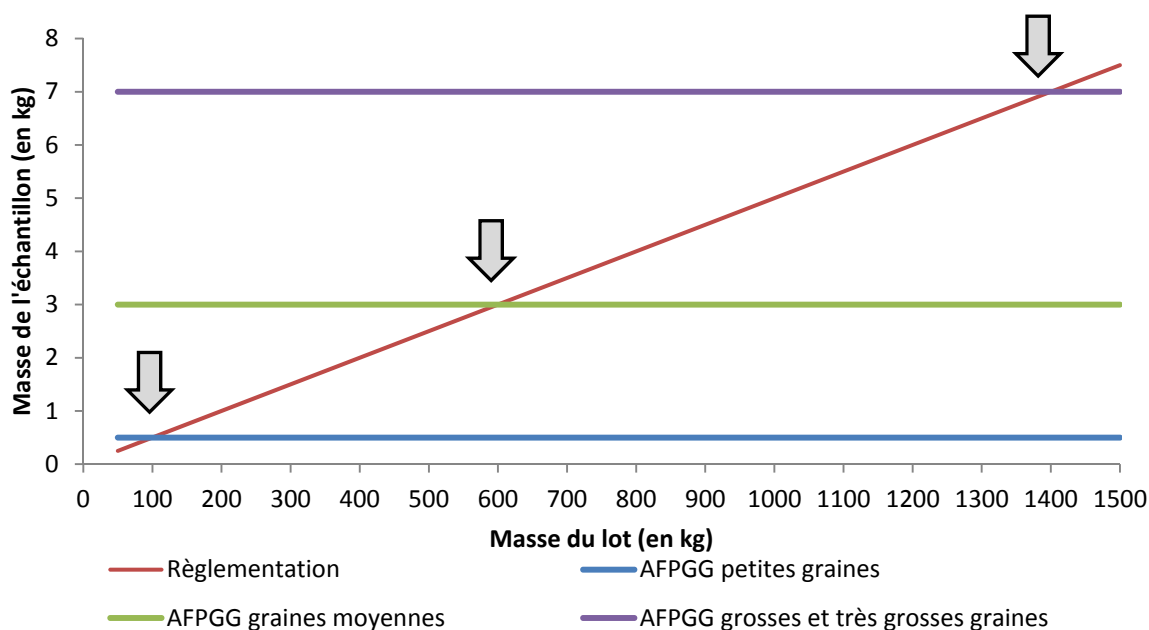
Tableau 2. Définition des scénarios étudiés

Scénarios	Étape du procédé	Application du règlement (CE) n°209/2013				Application de la charte de l'AFPGG			
		Masse de l'échantillon	Analyse	Masse	Fréquence	Masse de l'échantillon	Analyse	Masse	Fréquence
Scénario 1	Analyse préalable	0,5% de la masse du lot	Germes	125 g	Systématique à chaque lot	0,5 ; 3 ou 7 kg	Germes	125 g	Systématique à chaque lot
							Eau	200 mL	
Scénario 2	Analyse préalable	0,5% de la masse du lot	Eau	1 L	Systématique à chaque lot	0,5 ; 3 ou 7 kg	Germes	125 g	Systématique à chaque lot
							Eau	200 mL	
Scénario 3	Analyse préalable	0,5% de la masse du lot	Germes	125 g	Systématique à chaque lot	0,5 ; 3 ou 7 kg	Germes	125 g	Systématique à chaque lot
							Eau	20 0mL	
	Analyses en cours de production	/	Germes	125 g	<i>a minima</i> mensuelles	/	Germes	25 g ou 125 g	<i>a minima</i> hebdomadaires
Eau	200 mL								
Scénario 4	Analyse préalable	0,5% de la masse du lot	Eau	1 L	Systématique à chaque lot	0,5 ; 3 ou 7 kg	Germes	125 g	Systématique à chaque lot
							Eau	200 mL	
	Analyses en cours de production	/	Eau	1 L	<i>a minima</i> mensuelles	/	Germes	25 g ou 125 g	<i>a minima</i> hebdomadaires
Eau	200 mL								

### 3.2.2. Scénario 2 : application du règlement avec analyse préalable de chaque lot de graines sur l'eau d'irrigation usée

Dans ce paragraphe, le scénario étudié considère que le règlement est appliqué en analysant l'eau d'irrigation usée (Scénario 2, Tableau 2). La charte combine une analyse des germes et une analyse de l'eau d'irrigation usée. Cependant, comme indiqué ci-dessus, il est peu probable de détecter une contamination à partir d'une analyse des germes. Par conséquent, dans le cadre du scénario 2, nous ne considérons que l'analyse de l'eau d'irrigation usée proposée par le règlement et par la charte. Nous supposons que l'analyse des germes n'augmente que de manière marginale la probabilité de détection.

Pour l'analyse préalable du lot de graines, les principales différences entre le règlement et la charte concernent la masse de graines prélevées dans le lot et le volume d'eau d'irrigation usée analysé (Tableau 2). Selon le règlement (CE) n°209/2013, la masse de l'échantillon de graines prélevé est égal à 0,5% de la masse du lot de graines. La masse de l'échantillon dépend donc de la masse du lot et augmente de manière linéaire avec celui-ci (Figure 2). Au contraire, dans la charte, la masse de l'échantillon de graines prélevé dépend de la taille des graines (petites, moyennes, grosses, très grosses graines) mais pas de la taille du lot. Du fait de ces différences, la masse de l'échantillon est plus petite avec le règlement qu'avec la charte lorsque la masse du lot est inférieure à 100 kg, 600 kg et 1400 kg pour les petites, moyennes et grosses/très grosses graines respectivement (Figure 2). Par contre, au-delà de ces seuils, la masse de l'échantillon prélevé selon les préconisations du règlement devient supérieure à celle prélevée selon la charte.



**Figure 2.** Masses des échantillons de graines prélevées pour l'analyse préalable d'un lot de graines pour la réglementation (CE) n°209/2013 et pour la charte AFP GG en fonction de la masse du lot et de la taille des graines.

En outre, les volumes d'eau mentionnés dans le règlement et la charte sont très différents (respectivement cinq échantillons de 200 mL, soit un volume total de 1 L dans le règlement, et un seul échantillon de 200 mL dans la charte) (Tableau 2).

La masse de l'échantillon et le volume d'eau d'irrigation usée analysé ont tous les deux une influence sur la probabilité de détecter la présence de la bactérie. Plus la masse de l'échantillon de graines prélevé pour l'analyse préalable du lot de graines est grande, plus la probabilité de détecter la présence de la bactérie dans un échantillon contaminé est élevée. De manière

similaire, plus le volume d'eau d'irrigation usée analysé est grand plus la probabilité de détection d'une éventuelle contamination est élevée.

Un modèle de simulation a été utilisé pour estimer les probabilités de détection, lors de l'analyse préalable de lot de grosses graines, obtenues avec le règlement et la charte pour différentes masses de lot et différents niveaux de contamination. Le modèle est décrit en détail en annexe 1 et les valeurs des paramètres de ce modèle sont présentées dans le tableau 3.

**Tableau 3.** Valeurs des paramètres utilisées pour les simulations

Paramètres		Symbole	Unité	Valeurs du paramètre
Procédé	Masse du lot	$m_{lot}$	kg	entre 500 kg et 30 000 kg*
	Masse d'une fraction du lot lors d'une production	$m_{prod}^{**}$	kg	60 kg* (entre 25 et 75 kg dans la littérature)
Contamination	Nombre de bactéries par lot	$N_{lot}$	Bactéries/lot	entre 1 et 30 000 bactéries/lot***
	Paramètre d'hétérogénéité	$b$	/	entre 0,01 et 10
	Sensibilité de la méthode	$S_m$	%	entre 1% et 10%
Règlement	Masse de l'échantillon	$m_{ech}$	kg	0,5 % de la masse du lot
	Volume d'eau analysé	$V_{eau}$	L	1 L
	Fréquence d'analyse au cours des productions	$F_a^{**}$	/	Une fraction du lot sur douze ; soit mensuellement*
Charte	Masse de l'échantillon	$m_{ech}$	kg	7 kg
	Volume d'eau analysé	$V_{eau}$	L	0,2 L
	Fréquence d'analyse au cours des productions	$F_a^{**}$	/	Une fraction du lot sur trois ; soit hebdomadairement*

\* : Valeurs proposées par les représentants de l'AFPGG comme représentatives de leurs productions (audition AFPGG, décembre 2014).

\*\* : Paramètres uniquement utilisés pour le scénario 4.

\*\*\* : Une concentration maximale de 1 ufc/kg de graines est considérée pour les simulations, soit au maximum 500, 10 000 et 30 000 bactéries pour des lots de 500 kg, 10 000 kg et 30 000 kg respectivement.

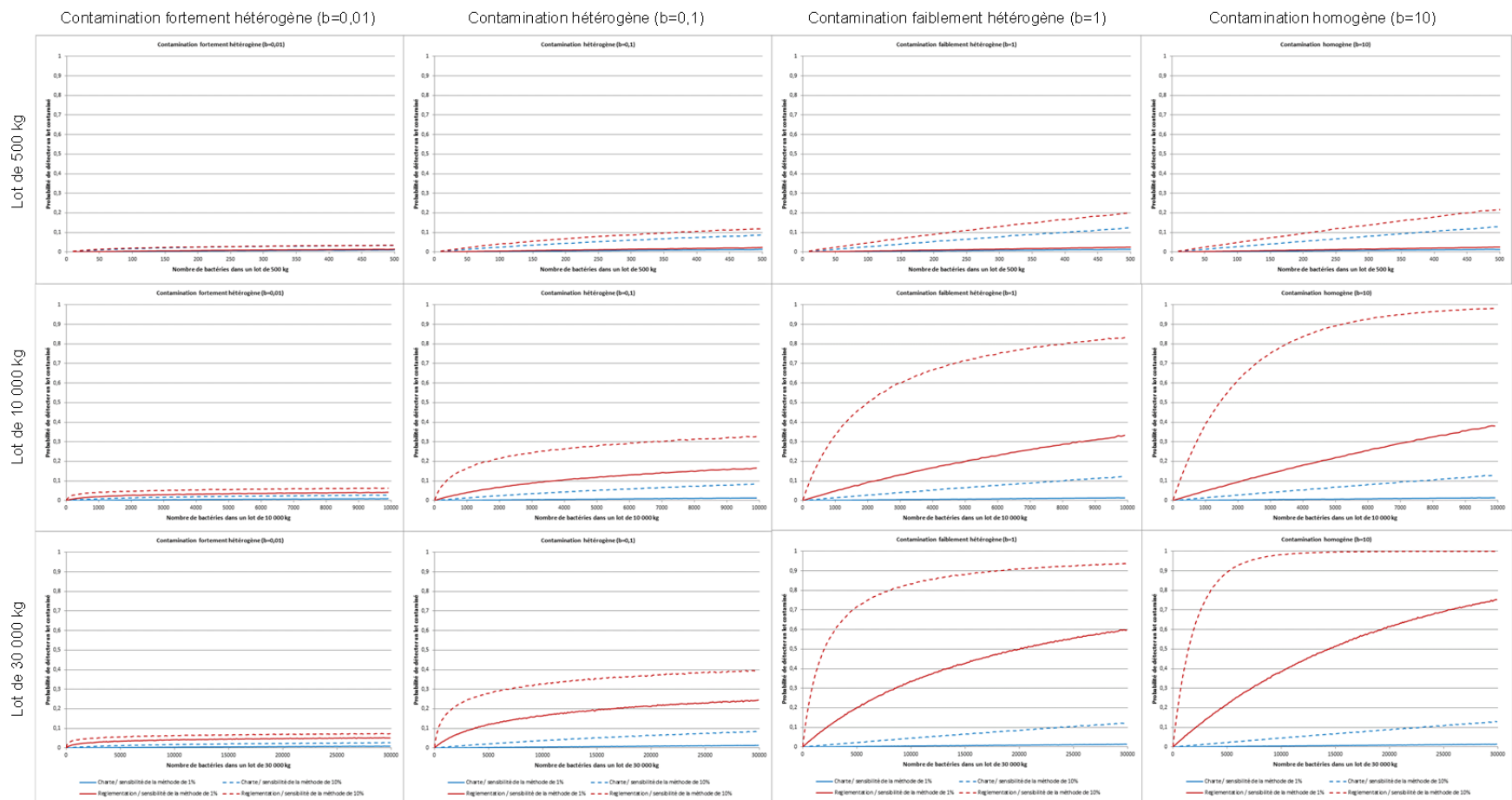
Les résultats des simulations montrent que la probabilité de détection est supérieure avec le règlement dans tous les cas de figure considérés (Figure 3). Lorsque le lot a une masse égale à 500 kg, la taille de l'échantillon préconisée par la charte est supérieure à celle préconisée par le règlement, mais l'analyse d'un litre d'eau préconisée dans le règlement fait que la probabilité de détection du règlement est légèrement supérieure à celle obtenue avec la charte (Figure 3). Les différences de probabilité de détection entre la charte et le règlement sont cependant assez faibles en cas de faible niveau de contamination et en cas de contamination très hétérogène (Figure 3).

La probabilité de détecter la présence de la bactérie lors de l'analyse préalable augmente en fonction de la masse de l'échantillon de graines prélevé et du volume d'eau d'irrigation usée analysé. Au-delà d'une certaine masse de lot de graines (100 kg, 600 kg et 1400 kg pour les petites, moyennes et grosses/très grosses graines respectivement), la méthode d'échantillonnage du règlement conduit à des tailles d'échantillon supérieures et donc à des probabilités de détection plus grandes. En deçà de ces seuils, la taille de l'échantillon obtenue avec le règlement est inférieure à celle obtenue avec la charte, mais l'analyse d'un grand volume d'eau (1 litre d'eau

dans le règlement par rapport à 200 mL dans la charte) fait que la probabilité de détection du règlement est supérieure à celle obtenue avec la charte dans les mêmes conditions.

La probabilité de détecter une éventuelle contamination par l'analyse de l'eau est supérieure avec les préconisations du règlement qu'avec celles de la charte (Figure 3).

De nombreuses incertitudes persistent cependant par rapport à ces conclusions. Dans le cas d'une faible prévalence et d'une faible concentration de la contamination des lots de graines par *E. coli* STEC et O104:H4 et *Salmonella* spp., l'efficacité de l'analyse selon le règlement et la charte est relativement proche. De plus, les simulations présentées ne considèrent que des lots de grosses graines de haricots mungo. Ces conclusions nécessiteraient donc d'être étayées par d'autres travaux de recherche.



**Figure 3.** Probabilités de détection d'un lot contaminé en fonction du nombre de bactéries dans un lot de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination fortement hétérogène ( $b=0,01$  ; première colonne), hétérogène ( $b=0,1$  ; deuxième colonne), faiblement hétérogène ( $b=1$ , troisième colonne) et homogène ( $b=10$ , quatrième colonne). Les probabilités de détection sont calculées pour le scénario 2 selon le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%). *Pour plus de lisibilité, les graphiques de cette figure sont agrandis dans l'annexe 2.*





### **3.2.3. Scénario 4 : application du règlement avec analyse préalable du lot et analyse en cours de production sur l'eau d'irrigation usée**

Dans ce scénario (scénario 4, tableau 2), prenant en compte l'analyse préalable du lot de graines et les analyses en cours de production, les principales différences entre le règlement et la charte sont les suivantes :

- la masse de graines prélevées dans le lot pour l'analyse préalable du lot de graines (0,5 % de la masse du lot contre 7 kg, pour des grosses graines),
- le volume d'eau d'irrigation usée analysée (1 L contre 200 mL),
- et la fréquence des analyses en cours de production (*a minima* mensuels contre *a minima* hebdomadaire).

Comme pour le scénario 2, la masse de graines prélevées pour l'analyse préalable augmente en fonction de la taille du lot avec le règlement, alors que cette masse ne dépend que du type de graines avec la charte. Le volume d'eau analysé selon le règlement est supérieur à celui analysé selon la charte, mais les analyses en cours de production sont plus fréquentes avec la charte (*a minima* une fois par semaine) qu'avec le règlement (*a minima* une fois par mois) (Tableau 2).

Un modèle de simulation a été utilisé pour comparer les niveaux d'efficacité du règlement et de la charte, selon ce scénario. Le modèle est présenté en Annexe 1. Les simulations ont été réalisées en considérant différentes tailles de lot, plusieurs niveaux de contamination et deux niveaux de sensibilité de la méthode de détection (Tableau 3). Le modèle calcule, pour chaque combinaison de paramètres, le nombre moyen de fractions de lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production. Ainsi le protocole d'analyses jugé le plus performant correspond à celui induisant le plus faible nombre de fractions de lot produites avant détection de la contamination.

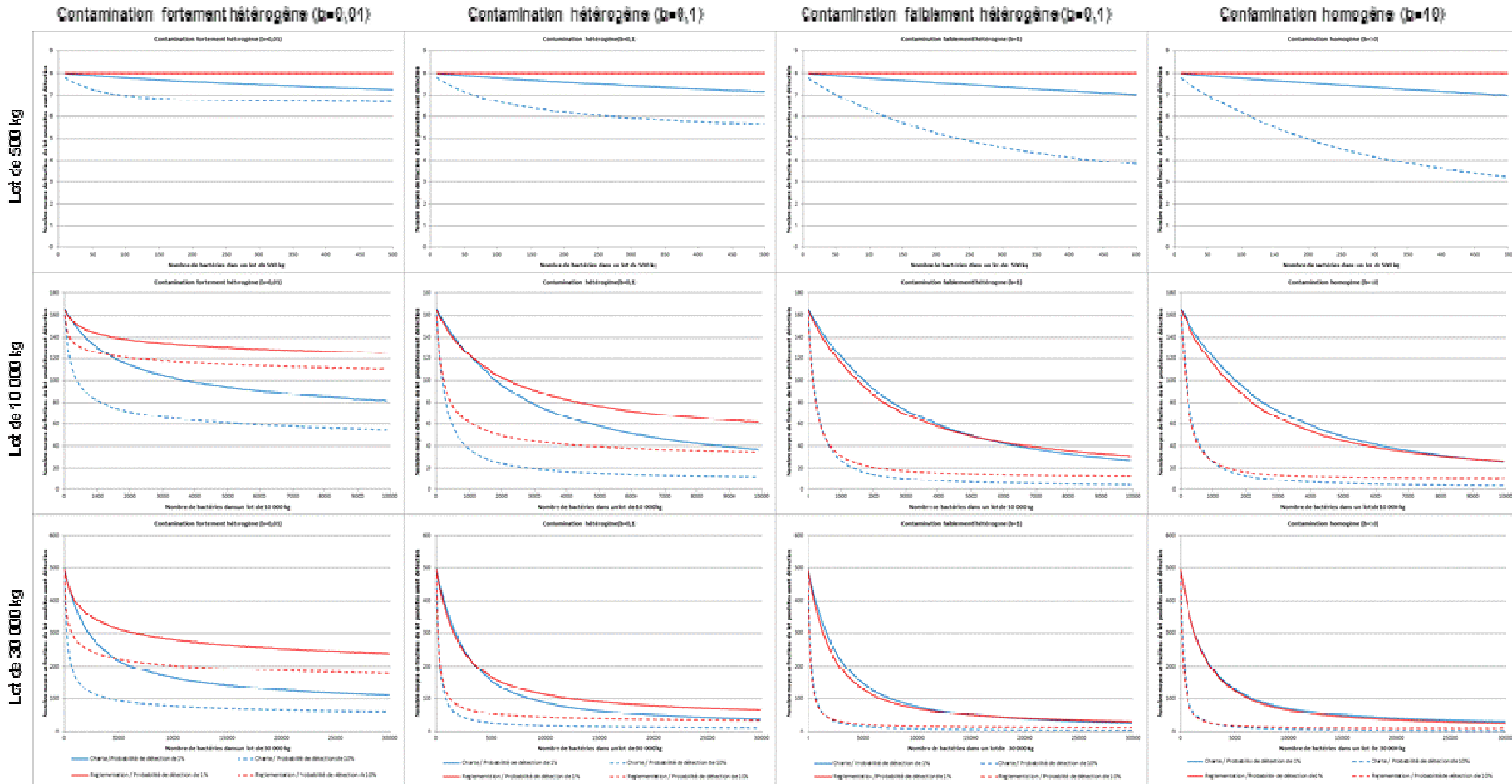
Les résultats (Figure 4) montrent que :

- Lorsque la contamination est très faible (environ 10 bactéries dans le lot), les deux protocoles détectent rarement cette contamination. La quasi-totalité du lot contaminé est produit et mis sur le marché (soit l'équivalent de 8 fractions de lot produites pour les lots de 500 kg, 165 ou 166 fractions de lot produites pour les lots de 10 000 kg et 497 ou 499 fractions de lot produites pour les lots de 30 000 kg ; respectivement pour le règlement ou la charte),
- plus la contamination est hétérogène (plus *b* est petit), plus le nombre de fractions de lot produites avant détection de la bactérie est important,
- lorsque la masse du lot est faible (lot de 500 kg), un plus faible nombre de fractions de lot est produit avant détection de la contamination selon le protocole de la charte. Celui-ci permet donc de détecter plus rapidement la contamination que le protocole du règlement, du fait d'une fréquence supérieure d'analyses sur les eaux d'irrigation usées,
- lorsque le lot atteint une masse plus importante (10 000 kg et 30 000 kg), les nombres moyens de fractions de lot produites avant que la contamination ne soit détectée sont proches selon les deux protocoles, notamment lorsque la contamination est homogène ou faiblement hétérogène. Toutefois, la charte permet de détecter plus rapidement un lot contaminé lorsque la contamination est hétérogène ou fortement hétérogène, du fait du nombre supérieur de fractions de lot produites analysées (la probabilité de détecter la contamination est supérieure lorsque l'analyse est plus fréquente).

Grâce à une fréquence élevée des analyses en cours de production sur l'eau d'irrigation usée, dans certains cas, et surtout quand l'hétérogénéité de la contamination est importante, l'application du protocole de la charte peut conduire à un plus faible nombre de fractions de lot produites contaminées avant détection de la bactérie et donc être plus efficace que le protocole du règlement.

Les résultats montrent également que, plus la contamination est hétérogène, plus le nombre de fractions de lot produites est important avant détection de la bactérie et ce pour les deux protocoles.

L'incertitude associée à ces conclusions est élevée car plusieurs paramètres clés sont mal connus (tailles réelles des lots, fréquence réelle des analyses en cours de production dans le cadre du règlement, prévalence de la contamination, niveau d'hétérogénéité de la contamination, sensibilité de la méthode de détection, spécificité du procédé de fabrication, etc.). De plus, les simulations présentées ne considèrent que des lots de grosses graines de type haricots mungo.



**Figure 4.** Nombres moyens de fractions de lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production pour des lots de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination fortement hétérogène ( $b=0,01$ ; première colonne), hétérogène ( $b=0,1$ ; deuxième colonne), faiblement hétérogène ( $b=1$ , troisième colonne) et homogène ( $b=10$ , quatrième colonne); selon le scénario 4 pour le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%). *Pour plus de lisibilité, les graphiques de cette figure sont agrandis dans l'annexe 3.*

### 3.3. Conclusions du CES BIORISK

Selon le règlement (CE) n°209/2013, l'analyse préalable d'un lot de graines nécessite la constitution d'un échantillon représentatif du lot comprenant au moins 0,5% de la masse du lot de graines, en sous-échantillons de 50 g. Les exploitants ont le choix entre deux analyses pour valider le lot de graines : l'analyse des germes (n=5x25 g, soit 125 g) ou l'analyse de l'eau d'irrigation usée (n=5x200 mL, soit 1 L) (Tableau 1). Selon la charte de l'AFPGG, l'analyse préalable de chaque lot de graines nécessite la constitution d'un échantillon composite de 100 000 graines, sauf pour les très grosses graines pour lesquelles le prélèvement se limite à 20 000 graines ; soit l'équivalent de 0,5 kg, 3 kg et 7 kg respectivement pour les petites, moyennes, grosses/très grosses graines (Figure 2). Cet échantillon est donc indépendant de la masse du lot. Selon la charte de l'AFPGG, l'analyse des germes (n=5x25 g, soit 125 g) et l'analyse de l'eau d'irrigation usée (n=1x200 mL, soit 200 mL) sont toutes les deux effectuées pour valider la conformité du lot. Le règlement et la charte ne décrivent précisément ni les techniques d'analyse, ni les techniques de regroupement de prises d'essais devant être utilisées, ce qui laisse une marge d'interprétation pouvant nuire à l'efficacité des deux protocoles.

Quatre scénarios sont définis dans le but d'évaluer les deux applications possibles du règlement (CE) n°209/2013 (analyse des germes ou de l'eau d'irrigation usée) et les deux types d'analyses proposées dans ce règlement et dans la charte (analyse préalable du lot de graines et analyse en cours de production des différentes fractions du lot) (Tableau 2). Les scénarios 1 et 2 se focalisent sur l'analyse préalable du lot de graines et permettent ainsi de répondre à la question posée par la saisine. Les scénarios 3 et 4 fournissent des informations complémentaires sur les capacités de détection des analyses en tenant compte à la fois de l'analyse préalable du lot de graines et des analyses en cours de production des différentes fractions du lot. Les scénarios 1 et 3 considèrent que le règlement (CE) n°209/2013 est appliqué en analysant des germes, tandis que les scénarios 2 et 4 considèrent que ce règlement est appliqué en analysant de l'eau d'irrigation usée. Dans ces quatre scénarios, la charte de l'AFPGG préconise de réaliser à la fois une analyse sur les germes et sur l'eau d'irrigation usée.

L'évaluation des quatre scénarios montre que la différence entre le niveau d'efficacité de la charte de l'AFPGG et celui du règlement (CE) n°209/2013 dépendent des modalités d'application de ce règlement :

- Pour l'analyse préalable des lots de graines :

- Si le règlement est appliqué en réalisant une analyse sur les germes, la méthode proposée par la charte est probablement plus efficace que celle proposée par le règlement, car les références bibliographiques disponibles indiquent que la probabilité de détecter la présence de la bactérie en analysant les germes est inférieure à celle obtenue avec l'analyse de l'eau d'irrigation usée. Comme la charte préconise d'analyser à la fois les germes et l'eau d'irrigation usée, son application conduit à une probabilité de détection supérieure.
- Si le règlement est appliqué en réalisant une analyse sur l'eau d'irrigation usée, la méthode proposée par le règlement est probablement plus efficace que celle proposée par la charte (Figure 3). La taille des échantillons de graines mis en germination est souvent supérieure avec le protocole du règlement qu'avec celui de la charte. De plus, l'analyse de l'eau d'irrigation préconisée par le règlement repose sur un volume d'eau analysé nettement supérieur à celui considéré dans la charte.

Les simulations montrent cependant que les différences entre les probabilités de détection obtenues avec le règlement et avec la charte sont faibles pour les lots de 500 kg et pour lesquels la contamination est fortement hétérogène.

- Pour l'application du règlement et de la charte de l'AFPGG dans leur globalité (analyse préalable du lot et analyses en cours de production) :
  - Si le règlement est appliqué en réalisant des analyses de germes, le règlement est probablement moins efficace que la charte car les références bibliographiques disponibles indiquent que la probabilité de détecter la présence de la bactérie en analysant les germes est inférieure à celle obtenue avec l'analyse de l'eau d'irrigation usée.
  - Si le règlement est appliqué en réalisant des analyses d'eaux d'irrigation usées, l'application de la charte peut, dans certains cas, conduire à un plus faible nombre de fractions de lot produites avant détection de la contamination que celui obtenu avec le règlement (Figure 4). La plus grande efficacité de la charte s'explique, dans ce cas, par une fréquence plus élevée d'analyse en cours de production sur l'eau d'irrigation usée. Cependant, lorsque la contamination est homogène ou faiblement hétérogène, les efficacités de la charte et du règlement sont très proches. Les résultats montrent également que plus la contamination du lot est hétérogène, plus le nombre de fractions de lot produites avant détection de la contamination est important.

En conclusion,

- l'efficacité du protocole de la charte de l'AFPGG lors de l'analyse préalable est soit supérieure soit inférieure à l'efficacité du règlement (CE) n°209/2013 selon ses deux possibilités d'application (analyse de l'eau d'irrigation usée ou des germes),
- la performance du protocole de la charte de l'AFPGG pourrait facilement être améliorée en augmentant le volume d'eau analysée (1 L au lieu de 200 mL),
- l'efficacité globale du protocole de la charte de l'AFPGG (incluant l'analyse préalable et les analyses en cours de production) mesurée par le nombre de fractions de lot produites avant la détection de la contamination est supérieure ou équivalente à celle du protocole du règlement (CE) n°209/2013 selon le cas de figure considéré (tailles des lots, hétérogénéité de la contamination, etc.).

En raison du faible nombre d'études disponibles, de nombreuses incertitudes persistent, notamment sur la caractérisation de la contamination des germes (prévalence, concentration, homogénéité, etc.), la capacité de détection des contaminations (méthode d'analyse, matrice analysée, probabilité de détection, etc.) ou encore le procédé de germination (type de germes, germoirs rotatif/statique, temps de germination, volume d'eau utilisé, etc.). Par conséquent, ces conclusions mériteraient d'être étayées par d'autres travaux de recherche.

#### **4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE**

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail adopte les conclusions et recommandations du CES BIORISK.

Marc Mortureux

## MOTS-CLES

Plan d'échantillonnage, E. coli STEC, Graines germées

## BIBLIOGRAPHIE

Andrews, WH., Mislivec, PB., Wilson, CR., Bruce, VR., Polema, PL., Gibson, R., Trucksess, MK. and Young, K. (1982). Microbial hazards associated with bean sprouting. *J AOAC*, 65, 241-248.

Charte AFGPG (20/06/2013). Règlement d'usage de la marque : « Charte qualité et sécurité-Engagement des producteurs ». Charte contrôle qualité graines germées – Charte version 12.

Hora, R., Kumar, M., Garcia, L., Schumacher, B., Odumeru, J. and Warriner, K. (2005). Spatial distribution of *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7 and other bacterial populations in commercial and laboratory-scale sprouting mung bean beds. *Journal of food protection*, 68, 2510-2518.

McEgan, R., Lee, S., Schumacher, B. and Warriner, K. (2008). Composite versus single sampling of spent irrigation water to assess the microbiological status of sprouting mung bean beds. *Journal of the science of food and agriculture*, 88, 1549-1553.

NACMCF, 1999. Microbiological safety evaluations and recommendations on sprouted seeds. *International journal of food microbiology*, 52, 123-153.

Nauta, MJ. (2005). Microbiological risk assessment models for partitioning and mixing during food handling. *International Journal of Food Microbiology*, 100, 311-322.

Piernas, V. and Guiraud, JP. (1997). Disinfection of rice seeds prior to sprouting. *Journal of food science*, 62, 611-615.

Règlement (CE) n°209/2013 de la Commission du 11 mars 2013 modifiant le règlement (CE) n°2073/2005 en ce qui concerne les critères microbiologiques applicables aux germes et les règles d'échantillonnage applicables aux carcasses de volailles et à la viande fraîche de volaille.

Splittstoesser, DF., Queale, DT. and Andalaro, BW. (1983). The microbiology of vegetable sprouts during commercial production. *Journal of food safety*, 5, 79-86.

Van Beneden, CA., Keene, WE, Strang, RA., Werker, DH., King, AS., Mahon, B., Hedberg, K., Bell, A., Kelly, MT., Balan, VK., MacKenzie, WR. and Fleming, D. (1999). Multinational outbreak of *Salmonella enterica* serotype *Newport* infections due to contaminated alfalfa sprouts. *Journal of American medicine association*, 281, 158-162.

ANNEXE(S)

Annexe 1 : Présentation du modèle utilisé pour les simulations

Afin de comparer la capacité de détection des lots contaminés des protocoles proposés dans le règlement et dans la charte, en considérant uniquement l'analyse préalable du lot de graines (scénario 2), le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon de graines contaminé et détecté lors de l'analyse de l'eau d'irrigation usée ( $N'_{ech+}$ ) est simulé.

Puis, lorsque le lot est considéré conforme et qu'il peut être mis en production sous forme de fractions du lot, le nombre de bactéries d'une  $i^{ième}$  fraction de lot produite, contaminée et détectée lors de l'analyse de l'eau d'irrigation usée en cours de production ( $N'_{prod,i+}$ ) est simulé. Ce type de simulation permet de comparer la capacité de détection des lots contaminés selon les protocoles proposés dans le règlement et dans la charte dans leur globalité, en considérant l'analyse préalable du lot de graines et les analyses en cours de production (scénario 4).

- **Pour l'analyse préalable du lot de graines :**

- Afin de prendre en compte l'hétérogénéité de la contamination d'un lot de graines, le nombre de bactéries dans l'échantillon de graines ( $N'_{ech}$ ) est simulé en fonction du nombre de bactéries total dans le lot ( $N_{lot}$ ) et de la répartition de la contamination (paramètre d'hétérogénéité  $b^7$ ), selon la distribution suivante (Nauta, 2005) :

$$N'_{ech} \sim \text{Binomiale} [N_{lot}, P_{ech}]$$

$$\text{Et } P_{ech} \sim \text{Beta} \left( b, b \left( \frac{m_{lot}}{m_{ech}} - 1 \right) \right)$$

Avec  $P_{ech}$ , la probabilité qu'une bactérie présente dans le lot fasse partie de l'échantillon de l'analyse préalable du lot de graines,

$m_{lot}$ , la masse du lot (kg),

$m_{ech}$ , la masse de l'échantillon de graines de l'analyse préalable du lot (kg).

- Le nombre de bactéries présentes dans l'échantillon contaminé et détecté lors de l'analyse de l'eau d'irrigation usée ( $N'_{ech+}$ ) est simulé en fonction de la contamination de l'échantillon ( $N'_{ech}$ ), de la sensibilité de la méthode d'analyse ( $S_m$ ) et du ratio des volumes d'eau d'irrigation usée analysés ( $R_{eau}$ ), selon la distribution suivante :

$$N'_{ech+} \sim \text{Binomiale} [N'_{ech}, S_m \times R_{eau}]$$

$$\text{Et } R_{eau} = \frac{V_{eau}}{V_{ref}}$$

Avec  $V_{eau}$ , le volume d'eau d'irrigation usée analysé selon le protocole simulé (pour cet avis, les protocoles simulés sont ceux de la charte ou du règlement),

<sup>7</sup> Quand  $b$  est grand ( $\geq 10$ ), la contamination est répartie de manière homogène. Plus  $b$  est petit, plus la répartition de la contamination est hétérogène.

$V_{ref}$ , le volume d'eau d'irrigation usée analysé selon le protocole de référence (pour cet avis, la référence est le règlement).

Lorsque  $N'_{ech+}$  est supérieur à zéro, la contamination est détectée lors de l'analyse préalable du lot de graines. Le lot est alors non conforme à la production de germes.

Lorsque  $N'_{ech+}$  est nul, la contamination n'est pas détectée, le lot est considéré conforme et peut être mis en production.

- **Pour les analyses en cours de production :**

- Pour un nombre total  $x$  de fractions du lot potentiellement produites à partir du reste du lot, le nombre de bactéries dans une  $i^{ème}$  fraction du lot produite ( $N'_{prod,i}$ ) est calculé en fonction du nombre de bactérie dans le lot ( $N'_{lot}$ ), de la contamination de l'échantillon prélevé lors de l'analyse préalable du lot de graines ( $N'_{ech}$ ), des  $j^{ème}$  productions précédentes ( $N'_{prod,j}$ ) et de la répartition de la contamination (paramètre d'hétérogénéité  $b$ ), selon la distribution suivante (Nauta, 2005) :

$$N'_{prod,i} \sim \text{Binomiale} \left[ N'_{lot} - \left( N'_{ech} + \sum_{j < i} N'_{prod,j} \right), P_{prod,i} \right]$$

$$P_{prod,i} \sim \text{Beta}(b, b(x - i))$$

$$\text{Et } x = \frac{m_{lot} - m_{ech}}{m_{prod}}$$

Avec  $P_{prod,i}$ , la probabilité qu'une bactérie présente dans le lot fasse partie de l'échantillon en cours de production

$m_{prod}$ , la masse d'une fraction de lot (kg).

- Le nombre de bactéries d'une  $i^{ème}$  fraction du lot produite, contaminée et détectée lors de l'analyse de l'eau d'irrigation usée en cours de production ( $N'_{prod,+}$ ) est simulé en fonction de la contamination de la fraction du lot ( $N'_{prod,i}$ ), de la sensibilité de la méthode d'analyse ( $S_m$ ), du ratio des volumes d'eau d'irrigation usée analysé ( $R_{eau}$ ) et de la fréquence d'analyse ( $F_a$ ), selon la distribution suivante :

$$\text{Si } (i \times F_a) \in N, \text{ alors } N'_{prod,i+} \sim \text{Binomiale} [N'_{prod,i}, S_m \times R_{eau}]$$

$$\text{Et } R_{eau} = \frac{V_{eau}}{V_{ref}}$$

Avec  $N$ , l'ensemble des nombres entiers positifs,

$V_{eau}$ , le volume d'eau d'irrigation usée analysé selon le protocole simulé (pour cet avis, les protocoles simulés sont ceux de la charte ou du règlement),

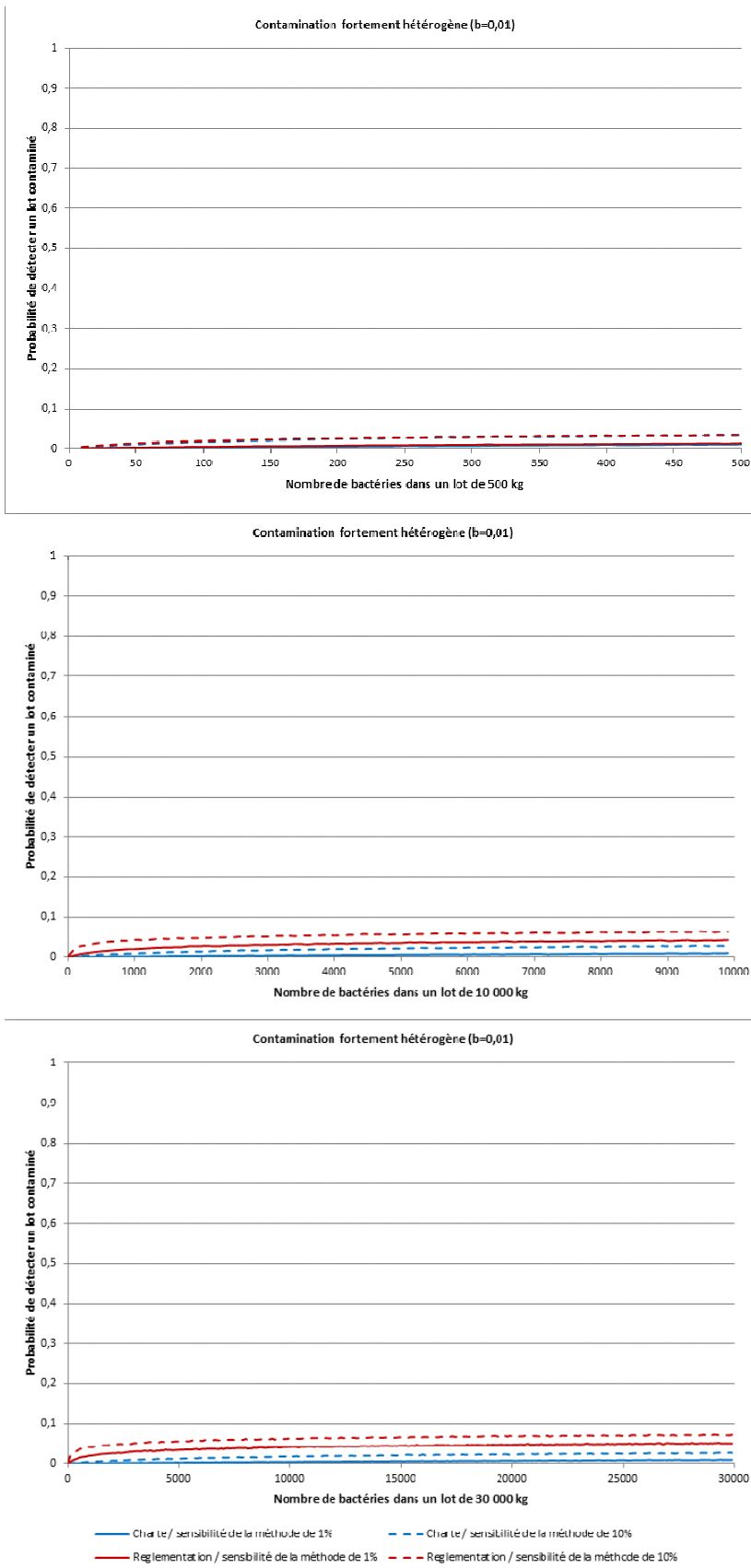
$V_{ref}$ , le volume d'eau d'irrigation usée analysé selon le protocole de référence (pour cet avis, la référence est le règlement).

Lorsque  $N'_{prod,i+}$  est supérieur à zéro, la contamination est détectée lors de l'analyse en cours de production et le lot est alors non conforme à la production de germes.

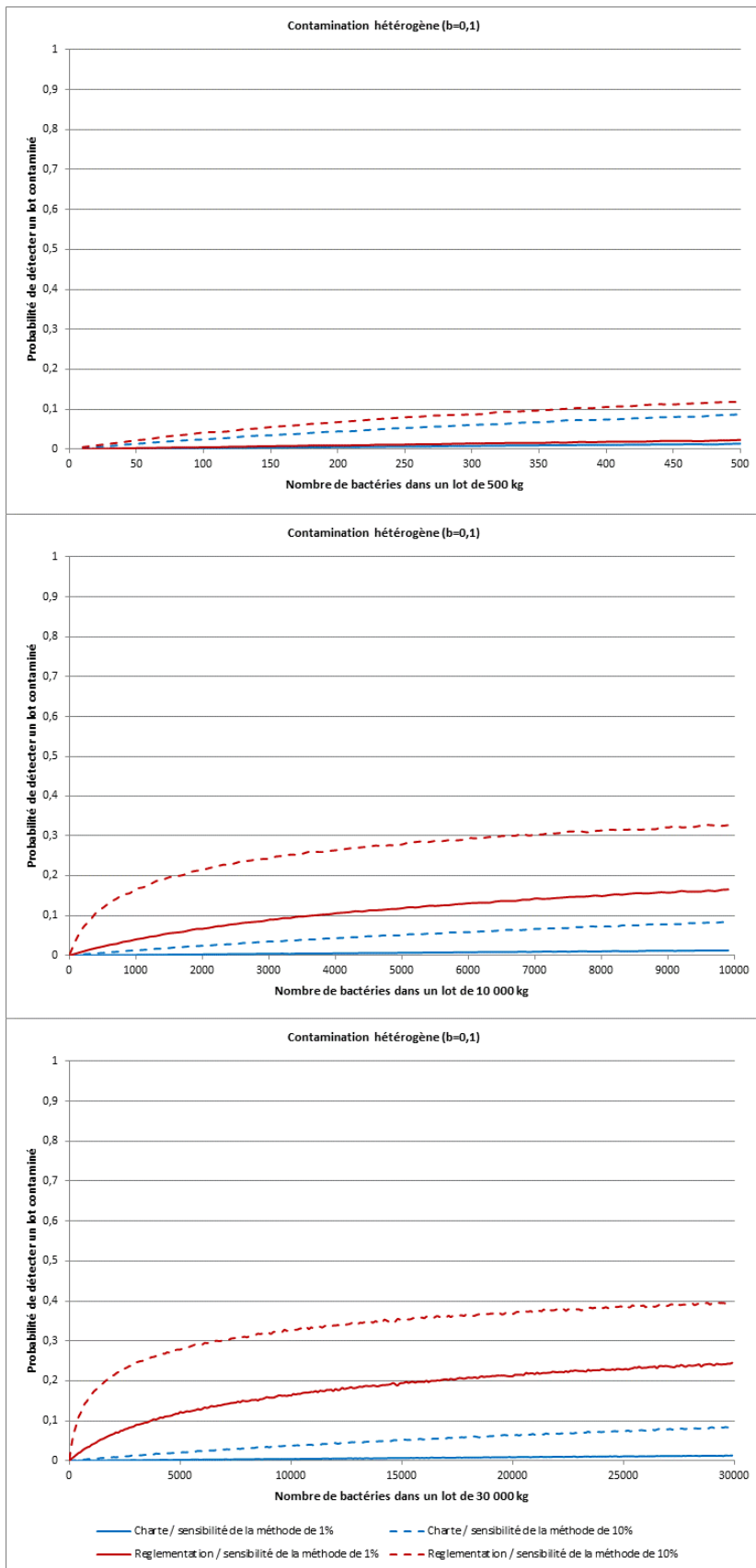
Lorsque  $N'_{prod,i+}$  est nul, la contamination n'est pas détectée et la production du lot continue.



Annexe 2 : Agrandissement de la Figure 3



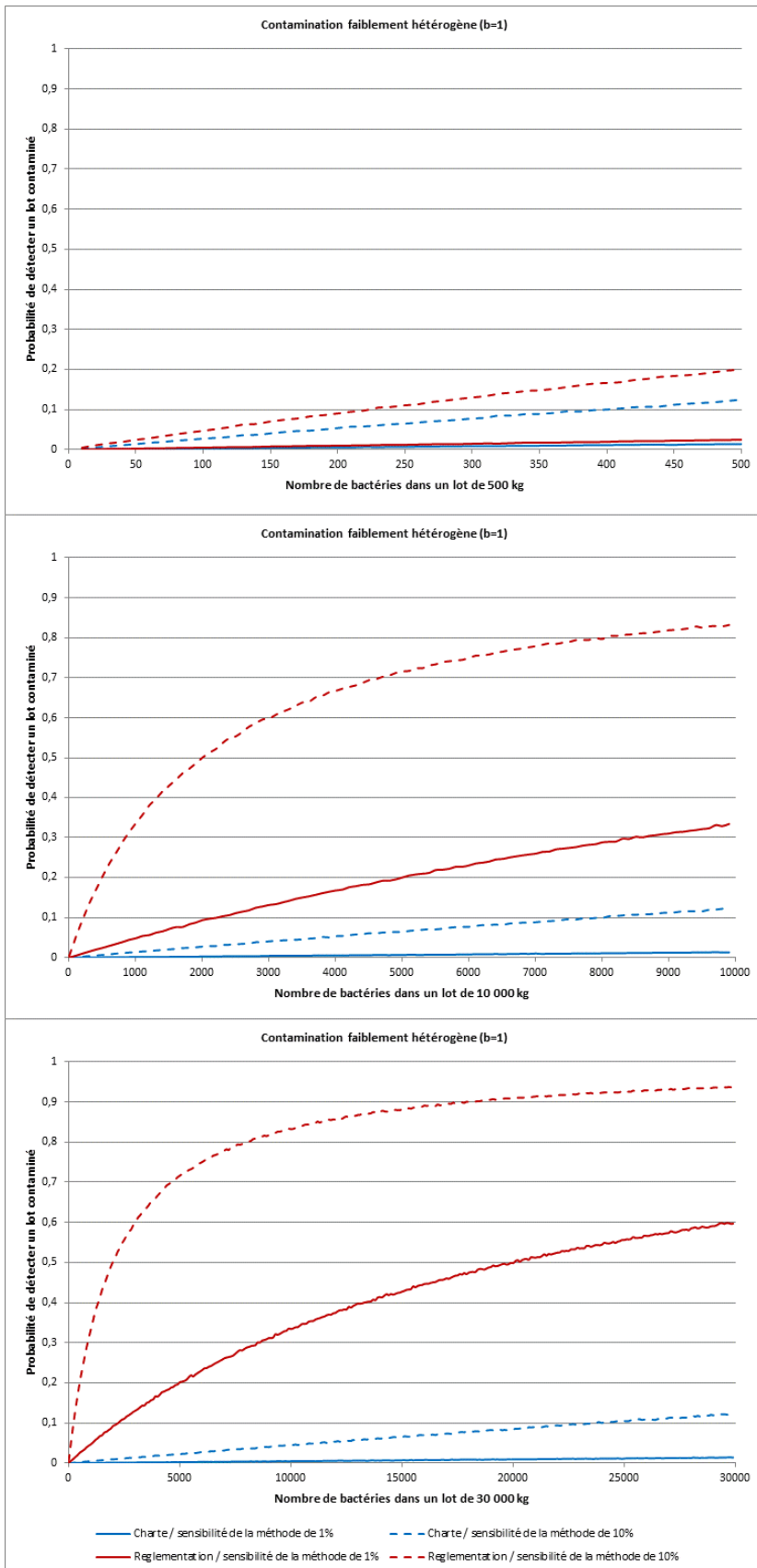
**Figure 3A.** Probabilités de détection d'un lot contaminé en fonction du nombre de bactéries dans un lot de 500kg, 10 000 kg et 30 000 kg et pour une contamination fortement hétérogène ( $b=0,01$ ). Les probabilités de détection sont calculées pour le scénario 2 selon le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).



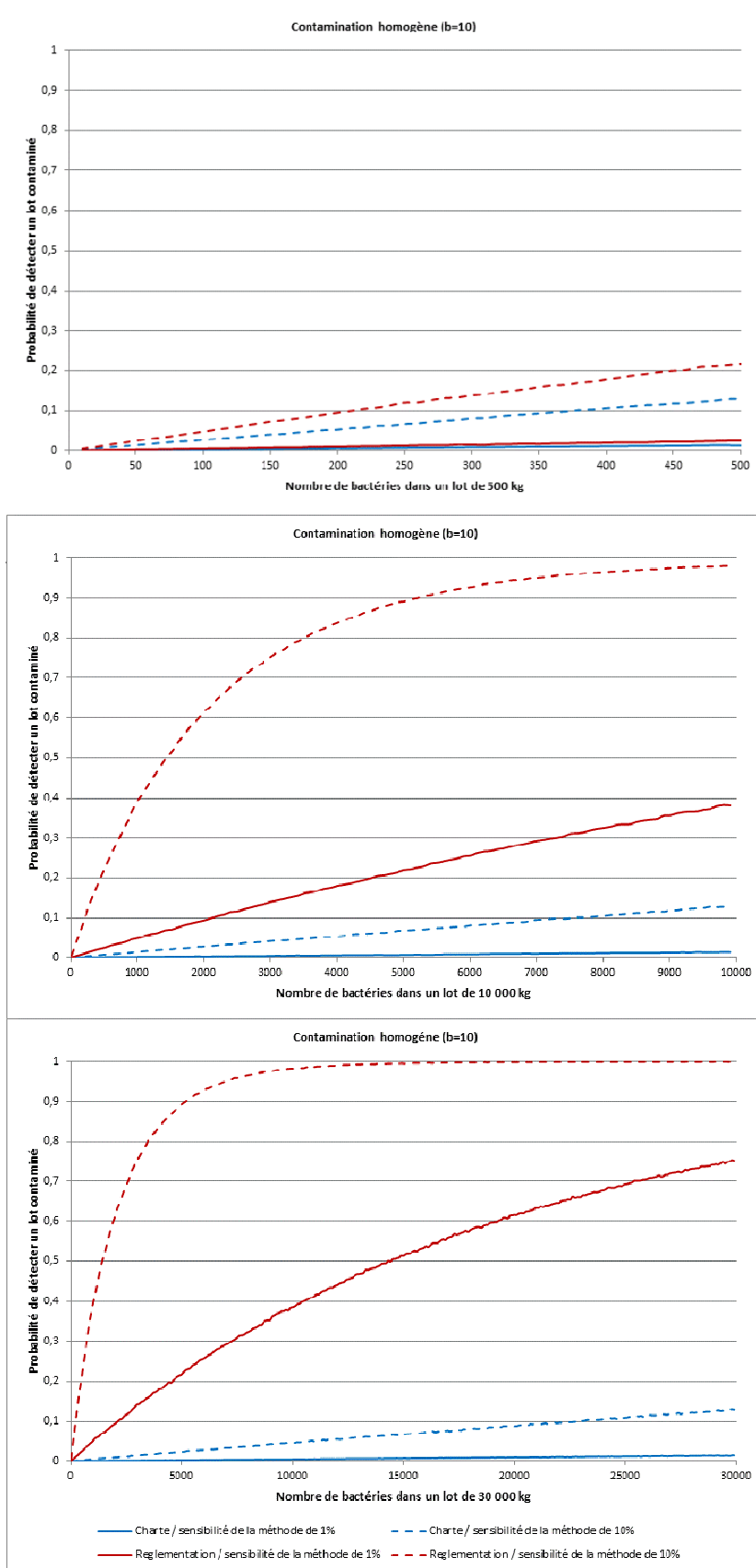
**Figure 3B.** Probabilités de détection d'un lot contaminé en fonction du nombre de bactéries dans un lot de 500kg, 10 000 kg et 30 000 kg et pour une contamination hétérogène ( $b=0,1$ ).

Les probabilités de détection sont calculées pour le scénario 2 selon le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu).

Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).



**Figure 3C.** Probabilités de détection d'un lot contaminé en fonction du nombre de bactéries dans un lot de 500kg, 10 000 kg et 30 000 kg et pour une contamination faiblement hétérogène ( $b=1$ ). Les probabilités de détection sont calculées pour le scénario 2 selon le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).

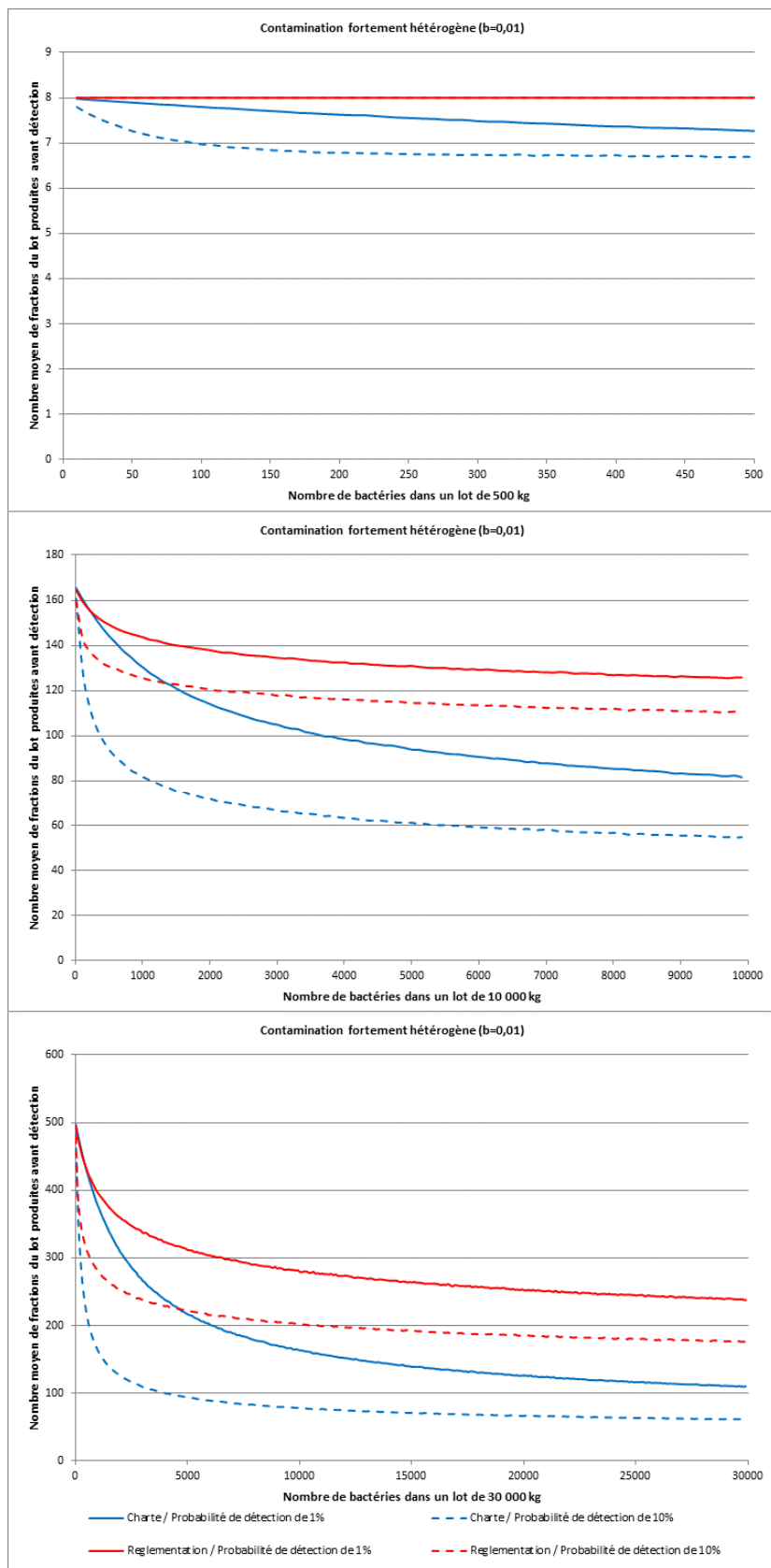


**Figure 3D.** Probabilités de détection d'un lot contaminé en fonction du nombre de bactéries dans un lot de 500kg, 10 000 kg et 30 000 kg et pour une contamination homogène ( $b=10$ ).

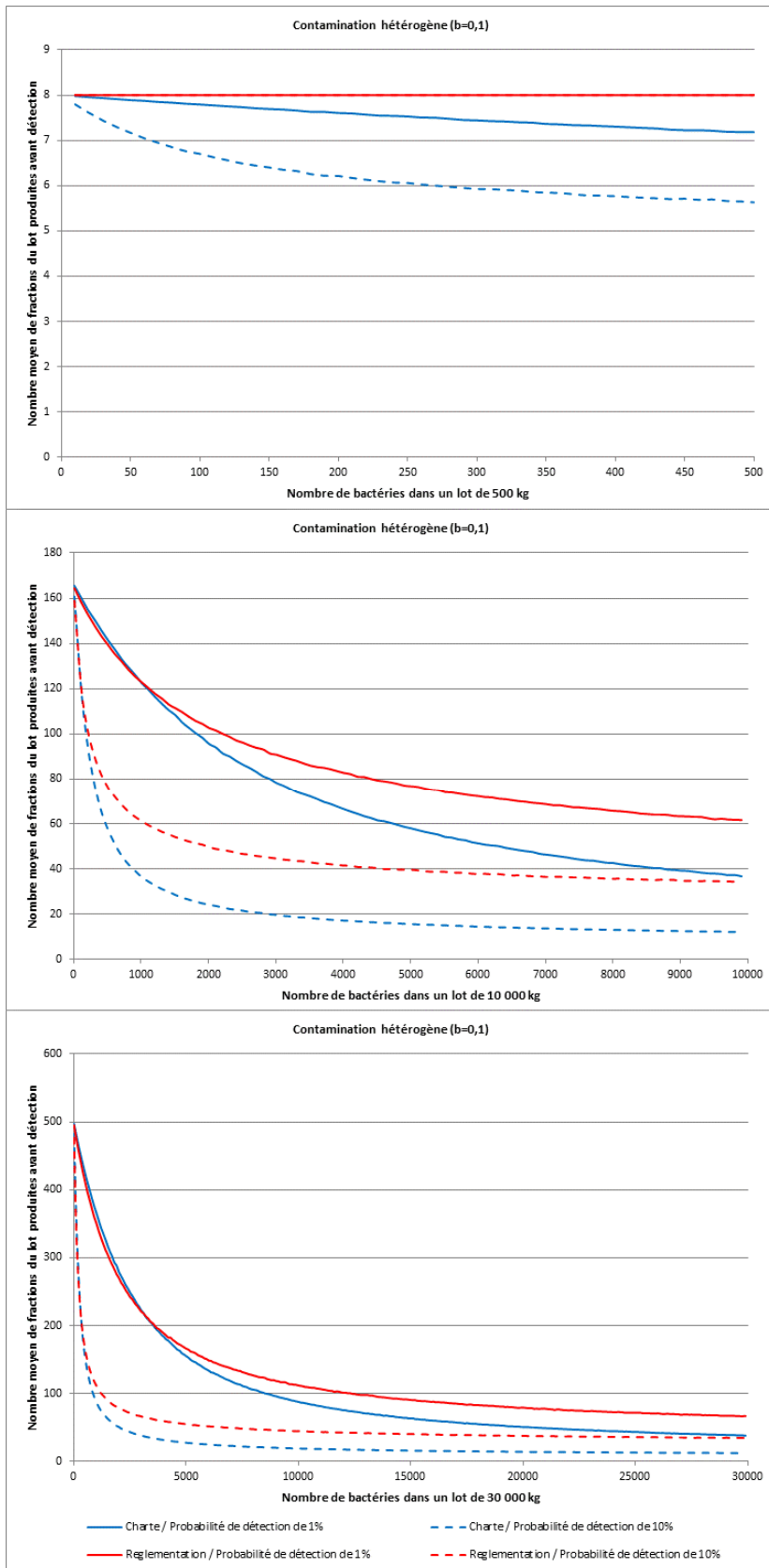
Les probabilités de détection sont calculées pour le scénario 2 selon le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu).

Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).

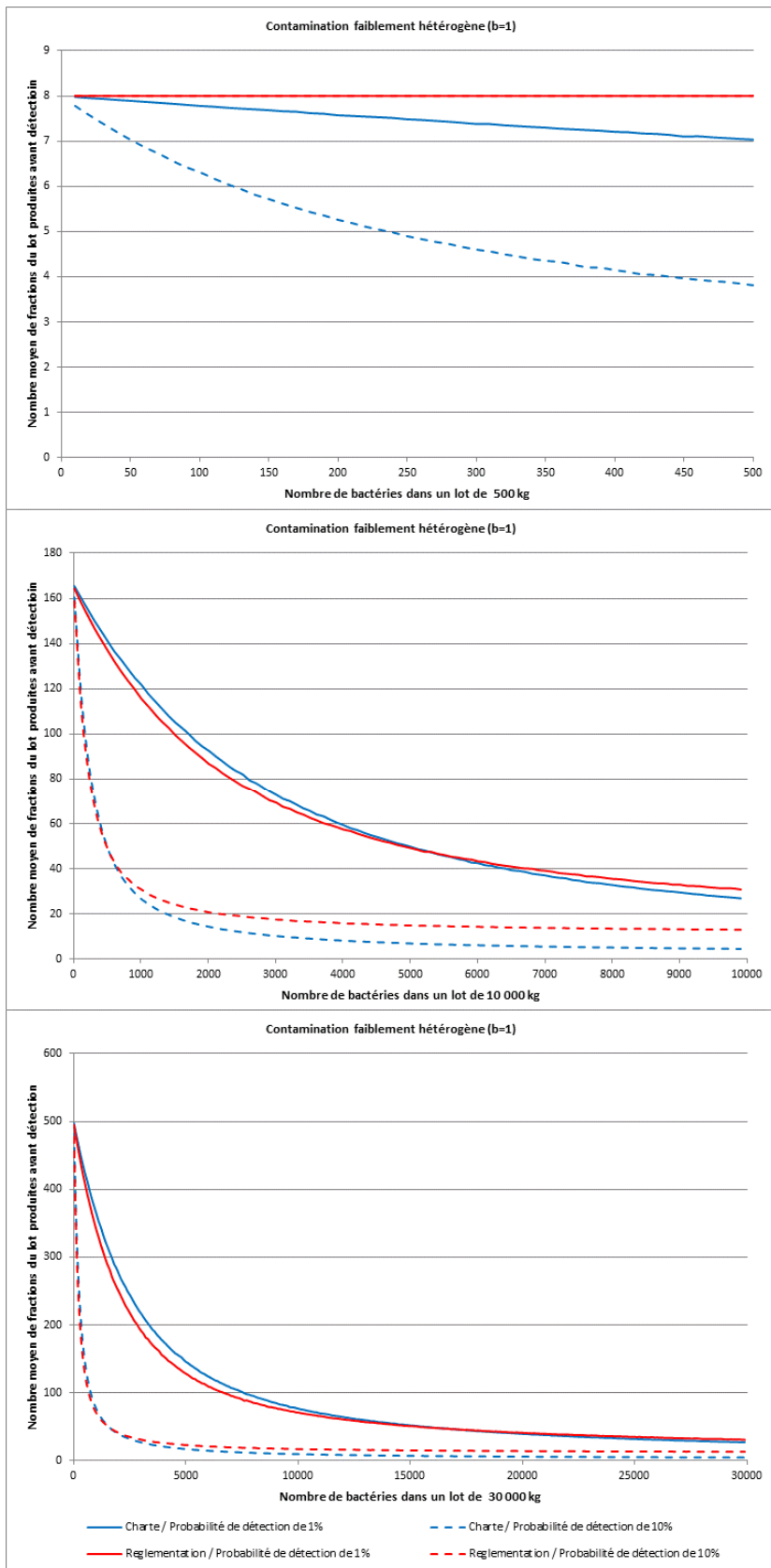
**Annexe 3 : Agrandissement de la Figure 4**



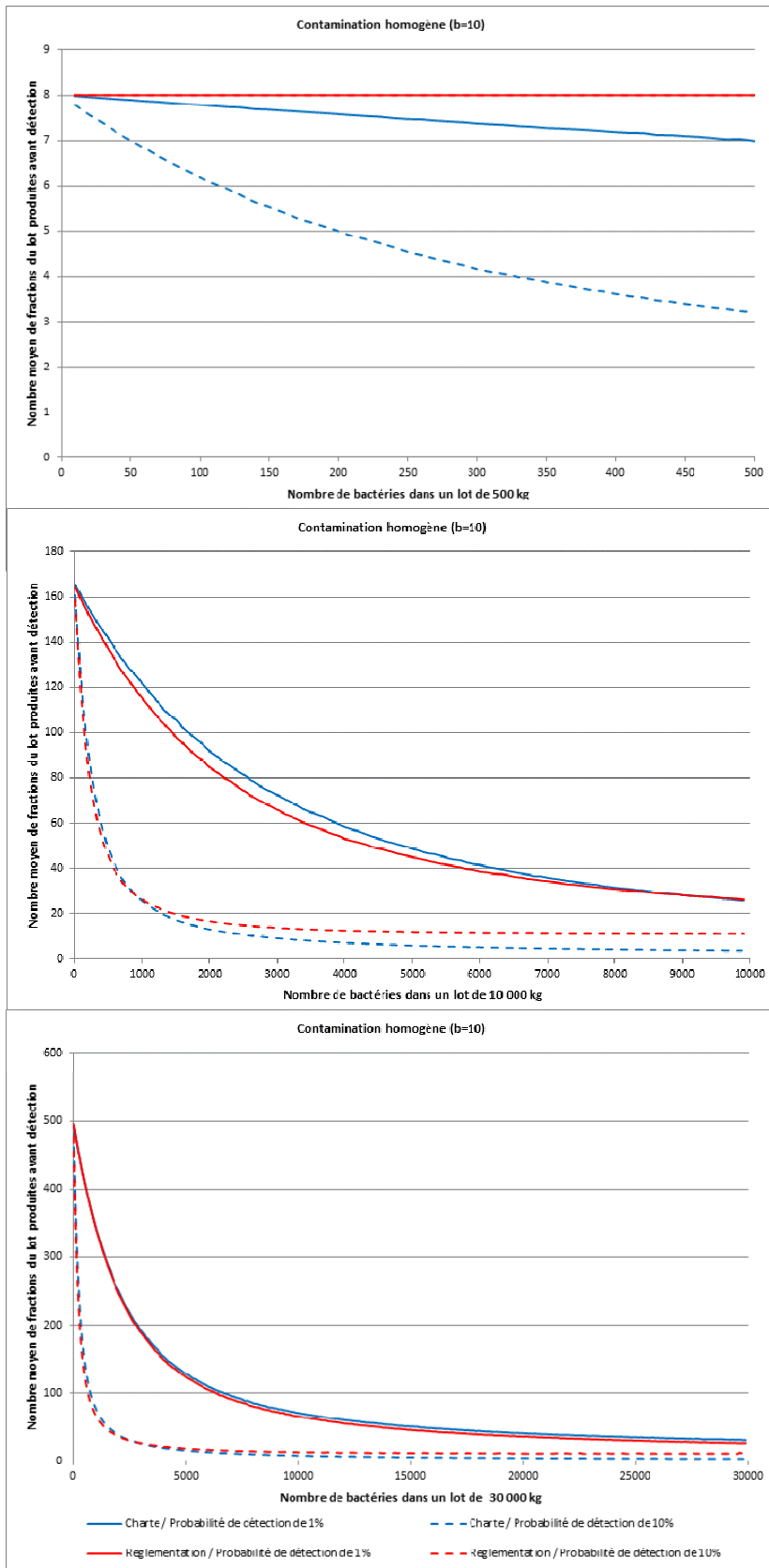
**Figure 4A.** Nombres moyens de fractions du lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production pour des lots de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination fortement hétérogène ( $b=0,01$ ); selon le scénario 4 pour le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).



**Figure 4B.** Nombres moyens de fractions du lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production pour des lots de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination hétérogène ( $b=0,1$ ); selon le scénario 4 pour le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).



**Figure 4C.** Nombres moyens de fractions du lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production pour des lots de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination faiblement hétérogène ( $b=1$ ); selon le scénario 4 pour le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).



**Figure 4D.** Nombres moyens de fractions du lot produites avant que la contamination ne soit détectée par les analyses en cours de production pour des lots de 500 kg (première ligne), 10 000 kg (deuxième ligne) et 30 000 kg (troisième ligne) et en fonction de la répartition de la contamination homogène ( $b=10$ ); selon le scénario 4 pour le protocole du règlement (rouge) et de la charte (bleu). Les deux niveaux de sensibilité de la méthode sont représentés en trait plein (1%) et en trait pointillé (10%).