

## Contamination par *Bacillus cereus* de l'*attiéké* produit dans le secteur informel au sud de la Côte d'Ivoire et gestion du risque par le réchauffage hydrothermique

### [ Contamination with *Bacillus cereus* of *attiéké* produced in the informal sector in the south of Côte d'Ivoire and risk management by the hydrothermal reheating ]

Bassa Antoine YOBOUET<sup>1,2</sup>, Adjéhi DADIÉ<sup>1</sup>, Sylvain Gnamien TRAORÉ<sup>2,3</sup>, Koffi Marcellin DJÈ<sup>1</sup>, and Bassirou BONFOH<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Unité de Formation et de Recherche des Sciences et Technologies des Aliments, Université Nangui Abrogoua, Laboratoire de Biotechnologie et de Microbiologie Alimentaire (LBMA), 02 BP 801 Abidjan 02, Côte d'Ivoire

<sup>2</sup>Direction Recherche et Développement, Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire, 01 BP 1303 Abidjan 01, Côte d'Ivoire

<sup>3</sup>Université Péléforo Gon Coulibaly, BPV 151 Korhogo, Côte d'Ivoire

Copyright © 2016 ISSR Journals. This is an open access article distributed under the **Creative Commons Attribution License**, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

**ABSTRACT:** This study aimed to reduce the risk of consumption of *attiéké* contaminated with *B. cereus* at doses higher than the acceptable limits. In total, 16 samples of *attiéké* freshly prepared and 306 samples of *attiéké* sold on the market were collected and analyzed according to the standard EN ISO 7932: 2004 with slight modification. The presumptive *B. cereus* isolates were identified by polymerization chain reaction (PCR). In addition, the resistance of *B. cereus* group spores to hydrothermal reheating of *attiéké* was evaluated. The results showed that *B. cereus* group was found in 25.2% of *attiéké* on sale and an average load of vegetative cells and spores were  $2.4 \pm 1.1$  log (CFU/g) and  $2.3 \pm 1.1$  log (CFU/g) respectively. *B. thuringiensis* (56%) and *B. cereus sensu stricto* (44%) were identified species. The hydrothermal reheating of *attiéké* by steam at 90°C for at least 15 min reduced *B. cereus* spores count from 4.2 log (CFU/g) in *attiéké* into  $1.8 \pm 1.0$  log (CFU/g). An average time to reduce the initial concentration of one logarithm was  $8.5 \pm 1.9$  min ( $D_{90^\circ\text{C}} = 8.5 \pm 1.9$  min). The maximum time limit of consumption of *attiéké* reheated by steam at 90°C was 18 hours. Therefore, it is recommended to reheat *attiéké* by steam for at least 15 min at 90°C before any consumption, if good hygiene practices cannot guarantee his safety.

**KEYWORDS:** Contamination, *Attiéké*, *Bacillus cereus*, Hydrothermal reheating, Côte d'Ivoire.

**RESUME:** L'objectif de cette étude était de contribuer à la réduction du risque de consommation d'*attiéké* contaminé par *Bacillus cereus* à des doses supérieures aux limites acceptables. Au total, 16 échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons d'*attiéké* en vente sur le marché ont été collectés et analysés selon la norme EN ISO 7932 : 2004. Les isolats présomptifs de *B. cereus* ont été identifiés par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Enfin, la résistance des spores du groupe *B. cereus* au réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* a été évaluée. Les résultats ont montré que le groupe *B. cereus* a été isolé dans 25,2 % de l'*attiéké* en vente avec une charge moyenne en cellules végétatives de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) et en spores de  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g). *B. thuringiensis* (56 %) et *B. cereus sensu stricto* (44 %) ont été les espèces identifiées. Le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké* à une température supérieure ou égale à 90 °C pendant 15 min a réduit la concentration en spores de *B. cereus* dans l'*attiéké*, de 4,2 à  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g). Le temps de réduction décimale a été de  $8,5 \pm 1,9$  min ( $D_{90^\circ\text{C}} = 8,5 \pm 1,9$  min). Le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé à 90 °C était de 18 h. Il

est recommandé de réchauffer l'*attiéké* à la vapeur d'eau au moins 15 min à 90 °C avant toute consommation, si les bonnes pratiques d'hygiène ne peuvent pas garantir sa sécurité.

**MOTS-CLEFS:** Contamination, *Attiéké*, *Bacillus cereus*, réchauffage hydrothermique, Côte d'Ivoire.

## 1 INTRODUCTION

L'*attiéké*, est une semoule de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) fermenté, partiellement déshydratée, cuite à la vapeur d'eau et d'apparence agglomérée [1], [2]. Cet aliment est obtenu à partir de la pâte de racines fraîches de manioc selon les opérations unitaires d'épluchage, concassage ou découpage, lavage à l'eau, râpage ou broyage, fermentation, essorage, émottage, semoulage, pré-séchage, tamisage, vannage et cuisson à la vapeur d'eau [2]. C'est un aliment typiquement ivoirien, dont la consommation locale annuelle est estimée à plus de 450 000 tonnes [3], [4]. À l'origine, l'*attiéké* a longtemps été produit pour l'autoconsommation familiale, avant que l'évolution de cette production n'atteigne le niveau semi-industriel qui la caractérise actuellement. Les Adjoukrou, Alladjan et Ebrié sont les trois groupes ethniques du sud de la Côte d'Ivoire, considérés comme les plus gros producteurs et consommateurs [3], [5]. Mais de plus en plus, la production et la consommation de l'*attiéké* se sont répandues sur tout le territoire ivoirien et dans la sous-région africaine, avec les migrations des populations [6], [7]. À Abidjan, plus de 34 % des ménages consomment l'*attiéké* au moins une fois par jour avec du poisson ou de la viande [8], [9]. Par ailleurs, avec son coût jugé à la portée de toutes les bourses, l'*attiéké* est devenu l'un des aliments les plus consommés dans plusieurs pays africains où l'urbanisation rapide et les difficultés économiques ont favorisé l'augmentation du nombre de consommateurs [4], [6], [10].

L'*attiéké* est aussi exporté en Europe, en Amérique et en Asie par le biais de la diaspora noire africaine où il serait prisé et acheté à fort prix, [11], [12], [13]. La production et la commercialisation de l'*attiéké* constituent une source importante de revenus pour les acteurs de la filière manioc. Le commerce d'*attiéké* génère environ 20 à 70 milliards de francs CFA par an [4], [14] et procure aux femmes, actrices principales, une indépendance financière leur permettant de se prendre aisément en charge.

La microflore du ferment utilisé dans la préparation de l'*attiéké* est dominée par les espèces de *Bacillus* spp, qui contribuent à la détoxification du manioc, au ramollissement de la pâte de manioc au cours de la fermentation et à l'amélioration du goût et de la texture de l'*attiéké* [7], [15], [16]. Cependant, en tenant compte de certaines propriétés de la bactérie, de la non-conformité de quelques opérations de traitement de la denrée et des caractéristiques de l'environnement de production, l'*attiéké* peut être considéré comme un réservoir de microorganismes pathogènes pour l'homme, y compris les espèces du groupe *Bacillus cereus*. En effet, certains clones de *B. cereus* connus pour être particulièrement virulents, peuvent résister à la cuisson à la vapeur de la semoule, par leurs spores thermorésistantes et se retrouver dans le produit fini. De plus, l'*attiéké* se vend à l'état frais, prêt à consommer, dans un emballage ne garantissant pas une sécurité microbiologique. Le produit est conditionné soit en petites portions emballées dans des sachets plastiques non alimentaires, soit dans des récipients (cuvettes) tapissés de film plastique ou dans des paniers en raphia recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées localement "feuilles d'*attiéké*" [6], [14]. De plus, les mauvaises conditions de stockage et les fréquentes manipulations post-cuissons au cours de la commercialisation peuvent favoriser la contamination de l'*attiéké* à un niveau de charges dépassant les limites de salubrité acceptables.

Un autre facteur, favorisant une rapide dégradation, un difficile contrôle de la qualité et par conséquent le risque d'insécurité pour le consommateur, est le caractère informel des activités de la chaîne de production de l'*attiéké* [6], [17]. Ainsi, la production et la commercialisation de l'*attiéké* se font-elles essentiellement dans le secteur informel et par des petits producteurs. Cette situation est amplifiée par les conditions climatiques variées, avec la chaleur et l'humidité ambiante qui ne favorisent pas parfois la conservation adéquate du produit [18]. La conséquence, est le risque élevé de contamination microbienne, tel que rapportés par [13] et [19], qui ont révélé la présence de coliformes totaux et fécaux, de *Staphylococcus aureus* et de flore fongique de type *Fusarium* spp, dans l'*attiéké* vendu à Abidjan. À ce jour, les données d'exposition à *Bacillus cereus* des consommateurs d'*attiéké* en Côte d'Ivoire ne sont pas disponibles. Dans ce contexte, cette étude a pour objectif de contribuer à la réduction du risque de consommation d'*attiéké* contaminé par *Bacillus cereus* à des doses supérieures aux limites acceptables.

## 2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2.1 SITES D'ÉTUDE

L'étude est de type transversal et a été réalisée sur des sites du circuit de production, de distribution et de commercialisation de l'*attiéké*, dans la ville d'Abidjan. Abidjan est la capitale économique de la Côte d'Ivoire et situé au bord de la lagune Ebrié, au sud de la Côte d'Ivoire (**figure 1**). La justification du choix de cette ville est que c'est l'une des zones d'origine, de forte production et consommation de l'*attiéké*. La production quotidienne artisanale d'*attiéké* fraîchement préparé atteint plus de 100 tonnes pour la filière artisanale [10]. Dans le cadre de cette étude, une enquête de prospection a été effectuée en Janvier 2010 à Abidjan, dans les dix communes de la ville. L'enquête a permis de sélectionner cinq communes en fonction de l'importance des circuits de production et de commercialisation d'*attiéké* qu'elles abritent. Il s'agissait de Yopougon, Abobo, Treichville, Marcory et Attécoubé. Dans ces communes, quatre sites de production artisanale de l'*attiéké* ont été sélectionnés. Ce sont Avocatier dans la commune d'Abobo, Anoumambo dans la commune de Marcory, Abobodoumé dans la commune d'Attécoubé et Azito dans la commune de Yopougon. Sur chaque site de production, quatre productrices d'*attiéké* ont été choisies. Au total, 16 productrices d'*attiéké* ont été incluses dans l'étude sur la base de leur consentement. Trois marchés de distribution et de vente en gros et demi-gros de l'*attiéké*, notamment le marché de Siporex à Yopougon, le marché d'Abobo gare à Abobo et le marché de la gare lagunaire à Treichville ont été sélectionnés (**figure 1**). Enfin, cinq quartiers ont été choisis au hasard pour le prélèvement d'échantillons d'*attiéké* vendu au détail aux abords des rues et devant les "maquis". Il s'agissait d'Avocatier et d'Aboboté à Abobo, d'Abobodoumé à Attécoubé, d'Anoumambo à Marcory et de Niangon sud à gauche à Yopougon (gare d'Azito).

### 2.2 DETERMINATION DES CARACTERISTIQUES DU CIRCUIT DE PRODUCTION À LA COMMERCIALISATION DE L'ATTIEKE

L'identification du circuit de production, de distribution et de vente de l'*attiéké* à Abidjan s'est faite à travers une enquête de prospection sur le terrain. L'enquête a consisté en une observation directe des sites et circuits de production, distribution et de vente de l'*attiéké*, pour identifier les pratiques à risques et évaluer le niveau de salubrité. L'opération a été réalisée à l'aide d'une grille d'observations préalablement élaborée.

### 2.3 COLLECTION DES ÉCHANTILLONS D'ATTIÉKÉ

Au total, 16 échantillons de 500 g d'*attiéké* fraîchement préparé et 306 échantillons de 500 g d'*attiéké* en vente conditionnés dans un sachet plastique non alimentaire (**figure 2**), de masse variant de 174 à 1368 g, ont été collectés sur les différents marchés ou dans les quartiers proches des zones de production et transportés au laboratoire de microbiologie du Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire et analysés dans l'heure. Les échantillons d'*attiéké* prélevés sur les marchés étaient constitués de 153 échantillons d'*attiéké* en vente un à deux jours après production et de 153 échantillons d'*attiéké* de trois à cinq jours de vente.

### 2.4 ISOLEMENT ET IDENTIFICATION PRESOMPTIVE DE *BACILLUS CEREUS*

Un échantillon d'analyse de 10 g d'*attiéké* a été introduit dans 90 mL d'eau peptonée 0,1 % (Oxoid LTD, Angleterre) dans un sachet Stomacher et le mélange a été broyé pendant 1 min au Stomacher (Colworth 400, Angleterre). À partir de la suspension obtenue, des dilutions décimales successives ont été effectuées selon la norme NF V 08-010 [20]. Pour le dénombrement de spores du groupe *B. cereus*, 15 mL de la suspension ont été prélevés dans un tube et chauffés sous agitation, dans un bain-marie (Precistern, Selecta, Lyon, France) pendant 10 min à 80 °C. À partir de la suspension mère, des dilutions décimales et de la suspension ayant fait l'objet du traitement thermique, une culture a été effectuée sur gélose Mossel (Merck, Allemagne) pour le dénombrement présomptif de cellules végétatives et des spores de *B. cereus* et selon la norme NF EN ISO 7932 [21]. L'estimation de la charge moyenne en *Bacillus cereus* des échantillons a été réalisée en se servant des données du dénombrement et par calcul selon la norme ISO 7218 [22].

### 2.5 IDENTIFICATION PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAÎNE

#### 2.5.1 EXTRACTION DE L'ADN GÉNOMIQUE

Au total, 90 isolats présomptifs du groupe *B. cereus* ont été utilisés. L'ADN génomique a été extrait par lyse thermique selon la méthode décrite par [23] avec une légère modification. Selon la taille des colonies sur la gélose PCA (Merck, Allemagne), 3 à 5 colonies bien isolées ont été prélevées et triturées dans 0,2 mL de tampon Tris-EDTA (50 mM Tris-HCl à pH

8, 1 mM EDTA, 0,5 % SDS et 200 µg/mL de protéinase K) dans les microtubes de 1,5 mL (Eppendorf, France). Le mélange a été mixé puis incubé à 55 °C pendant 3 heures dans un bain-marie sous agitation (Thermomixer, Eppendorf). Après l'inactivation thermique de la protéinase K (Applichem, Germany) à 95 °C pendant 10 min, les tubes ont été refroidis à 4 °C sur de la glace pendant 5 min puis centrifugés à 20'000 g à 4 °C pendant 10 min. Le surnageant contenant l'ADN a été recueilli dans un cryotube stérile, conservé à -20 °C et a été utilisé comme matrice d'ADN pour les réactions de polymérisation en chaîne (PCR).

### **2.5.2 PREPARATION DU MELANGE REACTIONNEL ET AMPLIFICATION DES GENES**

Le mélange réactionnel a été préparé comme décrit précédemment par [24], et [25] avec une légère modification. Le mélange réactionnel de 25 µL était composé d'eau Milli-Q stérile, de 2 % de Tween 20 (Sigma, Suisse), de 12,5 µL de PCR Master Mix 2X (Fermentas, Suisse), de 1 µM de chaque amorce (Microsynth, Balgach, Suisse) et de 1 µL de la matrice d'ADN. Les PCRs multiplex ont été réalisées avec un mélange réactionnel de 30 µL constitué de 15 µL de PCR Master Mix 2X, de 5 µL de matrice d'ADN et des autres réactifs susmentionnés. Un témoin négatif contenant 1 µL d'eau Milli-Q stérile à la place de matrice d'ADN et l'ADN des souches de référence utilisées pour le contrôle positif ont été inclus dans chaque réaction PCR.

### **2.5.3 AMPLIFICATION DES GENES 16S ADNr, MOTB ET GYRB**

L'amplification du gène 16S ADNr des isolats étudiés a été effectuée à l'aide du couple d'amorces bak4 et bak11 (**tableau 1**) pour confirmer l'absence de composés inhibiteurs de la PCR. Elle a été réalisée selon la méthode décrite par [26].

La détermination du groupe *Bacillus cereus* s'est effectuée par amplification d'un fragment spécifique du gène flagellaire *motB*, caractéristique du groupe. L'amplification du gène *motB* s'est effectuée à l'aide du couple d'amorces BCfomp1 et BCRomp1 selon la méthode décrite par [25].

L'ADN de chaque échantillon positif à l'amplification de la région spécifique de gène *motB* a été utilisé pour distinguer *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. cereus sensu stricto* et *B. mycooides* par PCR multiplex selon la méthode décrite par [27]. Tous les programmes d'amplification et la séquence nucléotidique des amorces utilisées sont décrits dans le **tableau 1**. Toutes les réactions d'amplification ont été réalisées dans un thermocycleur de type T3000 Thermocycler, Block type standard 3a, (Biometra, Allemagne).

Les produits d'amplification des gènes 16S ADNr et *motB* ont été révélés sur un gel d'agarose de 1,5 % pendant 1 h 30 min à 90 V tandis que ceux du gène *gyrB* ont été révélés sur un gel d'agarose de 2,5% pendant 25 min à 100 V. Un volume de 5 µL d'un marqueur de poids moléculaire (TriDye™, 100 pb DNA Ladder, Biolabs) a été inclus dans tous les gels pour estimer la taille des bandes d'ADN. Les gels ont été colorés dans un tampon TAE 1X contenant 2,5 mg/L d'une solution de bromure d'éthidium puis lavés à l'eau distillée, visualisés par illumination sur une plaque UV d'un dispositif d'éclairage et photographiés (Molecular Imager Gel Doc™ XR+, Bio-Rad).

## **2.6 GESTION DU RISQUE DE CONSOMMATION D'ATTIEKE CONTAMINE PAR BACILLUS CEREUS PAR RECHAUFFAGE HYDROTHERMIQUE**

### **2.6.1 DETERMINATION DE LA TEMPERATURE DE RECHAUFFAGE DE L'ATTIEKE**

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

### **2.6.2 ÉTUDE DE LA SURVIE DES SPORES DU GROUPE BACILLUS CEREUS AU RECHAUFFAGE DE L'ATTIEKE**

La distribution du groupe *B. cereus* dans un échantillon d'attiéké a été considérée comme homogène. Ainsi, pour déterminer la courbe de survie ou la cinétique de destruction microbienne, 5 échantillons d'attiéké de 600 g chacun et contaminés par les spores du groupe *B. cereus* à des charges de 4,2 log (UFC/g) ont été utilisés. Chaque échantillon a été réparti en quatre portions de 150 g d'attiéké chacune. Chaque portion a été réchauffée à la vapeur d'eau à 90 °C

(température maximale de réchauffage sus déterminée), dans un couscoussier sur une cuisinière à gaz pendant 20 min. À des intervalles de 5 min, une portion de 10 g d'*attiéké* réchauffé a été prélevée du couscoussier puis broyée dans 90 mL d'eau peptonée 0,1 %. Après broyage au Stomacher, une série de dilutions décimales jusqu'à  $10^{-3}$  a été réalisée. Un volume d'un mL de la solution mère et de chaque dilution décimale a été ensemencé pour le dénombrement des spores survivantes du groupe *B. cereus* sur gélose Mossel (Merck, Allemagne). Les boîtes ensemencées en double ont été incubées à 30 °C pendant 72 h. Le temps de régénération a été noté et le taux de survivants ou le taux de survie a été calculé comme étant le nombre d'unité formant colonie (UFC) survivant au réchauffage hydrothermique au temps  $t$  rapporté au nombre initial de bactérie au temps  $t_0$ .

La cinétique de destruction microbienne ou la courbe  $\log N$  (UFC/g) a été tracée en fonction du temps de réchauffage en minute. Le temps de réduction décimale (D-valeur) ou le temps nécessaire pour diminuer d'un logarithme décimal (ou diviser par 10) la concentration initiale en bactéries du groupe *B. cereus* à la température létale constante de 90 °C a été calculée à partir de l'inverse de la pente négative de chaque essai, en utilisant la partie linéaire de la courbe des survivants, en  $\log$  (UFC)/g en fonction du temps en minutes, tracée sur une échelle semi-logarithmique. Ainsi, l'équation de [28] a été utilisée pour déterminer la valeur de D (Formule 1).

$$\log N = \log N_0 - \frac{t}{D} \quad \text{Formule 1 [28]}$$

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

Le temps de génération ou temps de dédoublement de la population du groupe *B. cereus*, après le réchauffage, a été déduit de la formule de [29] en tenant compte du principe de scissiparité des bactéries. Ainsi, le temps de génération a été calculé à partir de la formule 2 suivante :

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

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

## 2.7 ANALYSE STATISTIQUE

Les données ont été saisies avec le logiciel de traitement de données IBM SPSS Statistics 20.0 (IBM Corporation, SPSS Inc, Chicago, USA) et transférés sur Excel. Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel XLSTAT 2014.1. Les méthodes statistiques descriptives (Fréquence, moyenne, écart-type) ont été utilisées pour les variables quantitatives. Les moyennes géométriques ont été utilisées pour le calcul des dénombrements. Les dénombrements ont été transformés en logarithme à base 10 ( $\log_{10}$ ), dans le but de normaliser les distributions. *B. cereus* étant reconnu comme un pathogène du groupe de risque 2, la formulation de l'interprétation des dénombrements a été basée sur celle d'un plan à 3 classes avec  $m = 1,7 \log$  (UFC/g),  $M = 2,7 \log$  (UFC/g) et Dose infectieuse = 5  $\log$  (UFC/g) [2], [30], [31].

## 3 RÉSULTATS

### 3.1 CARACTERISTIQUES DES CIRCUITS DE PRODUCTION, DE DISTRIBUTION ET DE VENTE DE L'ATTIEKE

L'*attiéké* est vendu sur les marchés informels à Abidjan et sa commercialisation se fait suivant deux principales voies (figure 3). D'une part et en dehors de rares productrices qui écouaient leur produit sur les marchés de gros et demi-gros, l'*attiéké* produit à Abidjan et Banlieues est essentiellement vendu sur les marchés des quartiers directement aux détaillants (Voie 1). D'autre part, l'*attiéké* produit dans les localités de l'intérieur du pays est convoyé dans les marchés de gros ou demi-gros de Siporex (Yopougon), d'Abobo gare et de Ciné cool (Abobo) et de la gare lagunaire à Treichville (Voie 2).

L'attiéké était conditionné dans des paniers de fortune en raphia, tapissés soit de film plastique recouverts de feuilles de *Thaumatococcus daniellii* appelées "feuilles d'attiéké". L'autre mode de conditionnement était caractérisé par de l'attiéké emballé dans des sacs ou sachets plastiques non alimentaires de 25 à 50 kg (bal d'attiéké). Le transport de l'attiéké se faisait par des cars ou minicars de transport en commun. L'activité de production, de distribution et de vente de l'attiéké à Abidjan était exercée par les femmes. Dans les grands marchés, les femmes étaient le plus souvent regroupées en association. La vente d'attiéké se faisait en gros, en demi-gros ou au détail. Cette voie (voie 2) de distribution et de vente informelle d'attiéké véhicule environ 60 à 70 % de l'attiéké consommé par les Abidjanais.

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

### **3.2 ÉTAT SANITAIRE DES SITES DE PRODUCTION DE L'ATTIEKE**

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

### **3.3 CONDITIONS DE PRODUCTION ET DE VENTE DE L'ATTIEKE**

Les ustensiles utilisés dans les différentes opérations de production d'attiéké étaient en caoutchouc dur (87,5 %) et en aluminium (12,5 %) égratignés par leur usage abusif et le manque de soins adéquats. Les semoules de manioc étaient séchées au soleil à même le sol sur des sachets plastiques ou dans des vans disposés sur des pneus usagés, sauf à Avocatier où le séchage était effectué sur des claies en hauteur. Les vans utilisés pour le séchage et le vannage des semoules de manioc étaient en raphia et badigeonnés d'une pâte obtenue par le mélange de la bouse de bovin et de la pâte de manioc. La cuisson d'attiéké se faisait à l'aide du bois de chauffage dans un couscoussier constitué d'une marmite surmontée d'une casserole en aluminium perforée. La cuisson était constatée de façon visuelle, au goût et/ou au parfum.

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

### **3.4 PREVALENCE DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* DANS L'ATTIEKE**

Au total, 43,8 % (7/16) de l'attiéké fraîchement préparé contre 25,2 % (77/306) de l'attiéké en vente étaient contaminés par le groupe *B. cereus* (**tableau 2**). L'attiéké fraîchement préparé contenait essentiellement un mélange de formes végétatives et de spores (71,4 %) de *B. cereus*. Seulement, 28,6 % d'échantillons d'attiéké fraîchement préparé analysés ne contenaient que des formes végétatives. Aucun échantillon ne contenait uniquement que des spores. Le nombre d'échantillons d'attiéké fraîchement préparé contenant le groupe *B. cereus* était fortement corrélé à l'état sanitaire du site de production ( $p = 0,031 < 0,05$  ;  $V = 0,745$  ;  $ddl = 3$ ) et significativement lié à la durée de cuisson de l'attiéké par site de production au seuil de 5% ( $Rho$  de Spearman = -1 ;  $p = 0,0001$ ). À Avocatier où la durée de cuisson était la plus élevée ( $40,5 \pm 5,1$  min), l'attiéké fraîchement préparé ne contenait pas le groupe *B. cereus*. Par contre, à Azito, Abobodoumé et Anoumambo où la durée de cuisson de l'attiéké était respectivement de 37,5 min, 33,3 min et 30,5 min, les échantillons d'attiéké fraîchement préparé contaminés par *B. cereus* étaient plus nombreux. La proportion de ces échantillons à Azito, Abobodoumé et Anoumambo était respectivement de 25 %, 50 % et 100 %.

L'attiéké en vente 1 à 2 jours après la production contenait soit des formes végétatives (72,7 %), soit des spores (27,3 %), mais un mélange des deux formes n'a été mis en évidence. Par contre, le nombre d'échantillons d'attiéké en vente 3 à 5 jours après production, contenant un mélange de formes végétatives et de spores, augmentait aux dépens des échantillons ne contenant que des spores.

### 3.5 CHARGE MOYENNE ET QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'ATTIEKE

Les charges moyennes en formes végétatives et en spores du groupe *B. cereus* dans l'*attiéké* fraîchement préparé étaient respectivement de  $2,5 \pm 0,4$  log (UFC/g) et de  $2,4 \pm 0,4$  log (UFC/g). Dans l'*attiéké* en vente, la charge moyenne en forme végétative était de  $2,4 \pm 1,1$  log (UFC/g) alors qu'elle était de  $2,3 \pm 1,1$  log (UFC/g) en spores de *B. cereus*. Au cours de la vente de l'*attiéké*, les charges en formes végétatives de *B. cereus* augmentaient de  $2,1 \pm 0,8$  log (UFC/g) à  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g), tandis que celles en spores diminuaient de  $2,2 \pm 0,9$  log (UFC/g) pour atteindre des valeurs de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) au cinquième jour de vente.

Selon les normes [2], [30], [31], la majorité (56,3 %) des échantillons d'*attiéké* fraîchement préparé était de qualité microbiologique satisfaisante tandis que 18,8 % étaient de qualité microbiologique acceptable et ne représente pas un risque pour le consommateur. Cependant, 25,0 % de ces échantillons étaient de qualité microbiologique insatisfaisante, avec un risque de toxi-infection relativement faible pour le consommateur car leurs charges en groupe *B. cereus* étaient supérieures à 2,7 log (UFC/g), mais en deçà de la dose infectieuse [5 log (UFC/g)].

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

### 3.6 ESPECES DU GROUPE *BACILLUS CEREUS* IDENTIFIEES

Parmi les 90 isolats présomptifs du groupe *B. cereus*, 84 (93,3 %) ont été confirmés positifs par amplification par PCR d'un fragment de 575 pb du gène flagellaire *motB*. Tous les isolats ont été identifiés dont 56 % de *B. thuringiensis* et 44 % *B. cereus sensu stricto*.

### 3.7 GESTION DU RISQUE DE CONSOMMATION DE L'ATTIEKE CONTAMINE PAR *BACILLUS CEREUS*

La température maximale atteinte par l'*attiéké* au cours du réchauffage a été de 90 °C. Cette température a été atteinte en moyenne entre 10 et 15 min de réchauffage et a varié en fonction de la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier (figure 4).

La courbe de survie ou de destruction thermique à 90 °C avait une forme concave orientée vers le bas (figure 5). L'expression de la cinétique de survie des spores du groupe *B. cereus* était de forme non log linéaire avec une phase d'adaptation moyenne d'une durée de 5 minutes, suivie d'une phase de destruction massive à partir de la cinquième minute jusqu'à la fin du réchauffage. Le taux de mortalité qui était de 2,1 % les cinq premières minutes de réchauffage hydrothermique, a augmenté rapidement pour atteindre un taux de mortalité maximum de 56,1 % à la vingtième minute. La charge moyenne des survivants était alors de  $1,8 \pm 1,0$  log (UFC/g).

Le temps de réduction décimale (D) des bactéries du groupe *B. cereus* au cours du réchauffage de l'*attiéké* a été de  $8,5 \pm 1,9$  min. Il a été calculé à partir de l'analyse de la régression parcellaire des meilleurs ajustements de la partie linéaire de la courbe de survie. Le coefficient de corrélation ( $R^2$ ) de la courbe de tendance du temps de réduction décimale des spores du groupe *B. cereus* dans l'*attiéké* soumis au réchauffage hydrothermique a été de 0,67 (figure 5).

La courbe de régénération des bactéries du groupe *B. cereus* après 15 min de réchauffage de l'*attiéké* à 90 °C avait une allure sigmoïde (figure 6). La croissance du groupe *B. cereus* après le réchauffage a montré un temps de latence moyen de 18 heures à partir d'une charge initiale de 4,2 log (UFC/g) d'*attiéké*, permettant de déduire que le délai limite maximal de consommation sans risque de l'*attiéké* réchauffé était de 18 h. La phase de latence était suivie d'une phase de croissance exponentielle variant entre 18 et 36 h de culture, caractérisée par un taux de croissance maximale de 2,042 germes/h [0,083 – 4,1 germes/h] et d'un temps de génération de 17 h. La croissance du groupe *B. cereus* s'est ralentie après 36 h de culture, aboutissant à une phase stationnaire qui a commencé lorsque la population microbienne a atteint une concentration maximale de 2,4 log (UFC/g) d'*attiéké* avec un taux de germination de 0,063 germes/h. Cette charge en *B. cereus* correspondait à des doses non toxiques.

## 4 DISCUSSION

La production et la commercialisation de l'*attiéké* à Abidjan et banlieues se font dans un système traditionnel à deux voies qui s'imbriquent au niveau de la commercialisation. Le mauvais conditionnement de l'*attiéké* au cours du transport par

car ou minicar est susceptible de favoriser sa contamination au cours de la vente sur les marchés à Abidjan. Cette étude a révélé que 75 % des sites de production de l'attiéké étaient dans un état d'insalubrité important, sans assainissement adéquat, ni de dispositifs sanitaires et de gestion des déchets solides et liquides. La précarité des sites de production de l'attiéké est due d'une part, au fait que la plupart des productrices sont des femmes à faibles moyens financiers et exercent cette activité pour subvenir aux besoins de leur famille. Par conséquent, elles consacrent moins de ressources financières à l'entretien des sites. D'autre part, parce que les productrices vivent dans des cours communes et la promiscuité ne leur permet pas d'entretenir véritablement l'espace réservé à la production de l'attiéké [9]. Cette précarité des sites de production d'attiéké a été précédemment rapportée par [9] dans une étude sur l'évaluation des connaissances, des attitudes et des pratiques des manipulateurs dans les unités de production de l'attiéké en relation avec l'hygiène et la sécurité sanitaire des aliments en Côte d'Ivoire. Par ailleurs, il a été également rapporté que l'attiéké produit dans les conditions d'hygiène précaire ou dans les conditions insalubres est susceptible d'être contaminé par les bactéries pathogènes [32].

L'étude a permis de constater l'utilisation récurrente d'ustensiles en caoutchouc (87,5%) et en aluminium (12,5%) avec des surfaces égratignées. Cette situation représente un risque de ré-contamination de l'attiéké car les égratignures pourraient constituer un nid de microorganismes en générale et du groupe *Bacillus cereus* en particulier, capable de former des biofilms sur des surfaces inertes [33]. Le mauvais état des ustensiles utilisées par les productrices d'attiéké, associé à la précarité sanitaire des sites de production et du manque de dispositifs de gestion des déchets solides et liquides, augmente le risque de contamination de l'attiéké par les germes pathogènes et par le groupe *B. cereus* sur les sites de production de l'attiéké.

Les résultats de l'analyse microbiologique de l'attiéké fraîchement préparé ont montré la présence dans 43,8 % des échantillons, de formes végétatives (28,6 %) et de spores (71,4 %) du groupe *B. cereus*. Un tel constat traduit que le couple temps/température de cuisson est insuffisant pour détruire toutes les formes végétatives et les spores du groupe *B. cereus* dans l'attiéké fraîchement préparé. Plusieurs études ont aussi rapportées la présence des cellules végétatives et des spores du groupe *B. cereus* dans une large variété de produits alimentaires [34], [35], [36]. La capacité d'adhésion aux surfaces solides et de résistance des spores de *B. cereus* leur permet de persister dans l'environnement agroalimentaire et de contaminer la matière première et le produit [37].

Le niveau de contamination de l'attiéké fraîchement préparé est significativement lié à l'état sanitaire du site de production ( $p > 0,05$ ). Ainsi, l'attiéké provenant des sites d'Anoumambo et d'Abobodoumé qui ne disposaient pas d'espace aménagé pour la production de l'attiéké et qui présentaient un état d'insalubrité importante, sont plus contaminés que l'attiéké provenant des sites d'Azito et d'Avocatier. En revanche, aucun échantillon d'attiéké fraîchement préparé et provenant du site d'Avocatier, n'a été contaminé. De plus, sur le site d'Avocatier, la semoule de manioc était séchée sur des claies en hauteur ; ce qui évite sa contamination par la poussière, réservoir de spores de *B. cereus*. Ces résultats confirment ceux rapportés par [9] et démontrent que les mauvaises pratiques dans les unités de production et l'hygiène précaire sont la cause de la contamination de l'attiéké par le groupe *B. cereus* sur les sites de production.

L'attiéké était vendu sur les marchés généralement conditionné dans des sachets plastiques non alimentaires, dont la qualité n'est pas garantie. C'est une pratique qui peut avoir pour conséquence de favoriser la contamination de l'attiéké au cours de la vente. Il a été rapporté que les emballages, l'air et l'eau sont considérés comme d'éventuelles sources de contamination et de ré-contamination par le groupe *B. cereus* après pasteurisation [38], [39].

La qualité microbiologique de l'attiéké se détériore au cours du temps passé à la vente. En effet, selon les résultats obtenus, après 3 jours de vente, 28,2 % de l'attiéké a été contaminé par le groupe *B. cereus* avec une charge moyenne de  $2,3 \pm 1,2$  log (UFC/g) de formes végétatives et de  $2,0 \pm 1,3$  log (UFC/g) de spores. La contamination de l'attiéké par cette espèce était prévisible, car le groupe *B. cereus* est ubiquitaire du sol, de l'environnement et par conséquent, présent le plus souvent dans la majorité des produits alimentaires. De plus, la multiplication des souches dans l'attiéké peut être favorisée par sa teneur en eau (45 - 60 %), sa teneur en amidon (42,3 - 71,6 %) [6], [13] et la température (25 – 30 °C) de stockage et des lieux de vente. Cette température correspond à la température optimale de développement du groupe *B. cereus* [40]. Par ailleurs, l'augmentation de charge en *B. cereus* au cours de la vente peut également s'expliquer par le fait qu'après au moins une journée d'activité, l'attiéké proposé sur le marché est généralement régénéré par un réchauffage dont les paramètres ne sont pas toujours maîtrisés par les vendeurs. Dans ce cas, le réchauffage constitue un facteur activant la germination des spores résiduelles dans le produit. Il en résulte une multiplication des espèces bactériennes et par conséquent, une augmentation de charges en *B. cereus* de l'attiéké au cours de la commercialisation. Cette situation est amplifiée par les mauvaises conditions de transport de l'attiéké telles que l'utilisation des paniers de fortune en raphia et des sachets plastiques non alimentaires.

Cependant, les résultats obtenus dans cette étude, en termes de niveau (ou degré) de contamination, contrastent avec ceux de [19]. En effet, ces auteurs étudiant la microflore post-cuisson de l'*attiéké* commercial produit au sud de la Côte d'Ivoire, ont relevé un nombre plus élevé de spores de *B. cereus*, atteignant  $4,5 \pm 2 \log$  (UFC/g) d'*attiéké*. Cette discordance de résultats au niveau des charges en *B. cereus* avait été précédemment observée par [41], qui a indiqué que la concentration des souches dans la matrice alimentaire et leur diversité, varient le plus souvent d'un produit à un autre.

Dans le cadre de cette étude et conformément aux normes [2], [30], [31], la majorité (74,8 %) des échantillons d'*attiéké* en vente sur les marchés sont de qualité microbiologique satisfaisante. Dans leur étude sur la prévalence et la concentration de *B. cereus* dans les produits alimentaires prêts à consommer et vendus au détail en Australie, [42] ont montré que 98 % des échantillons testés étaient de qualité microbiologique satisfaisante. Ces résultats suggèrent que le groupe *B. cereus* est rarement responsable de l'insécurité sanitaire des produits alimentaires prêts à l'emploi.

Les résultats obtenus montrent cependant que le quart des échantillons d'*attiéké* analysé, présentait des charges en *B. cereus* dépassant les limites acceptables, avec un risque élevé pour la santé humaine des consommateurs pour seulement 1,3 % de ces échantillons. En effet, selon [30] et [31], le risque sanitaire est modéré pour le consommateur pour des charges en *B. cereus* n'excédant pas le seuil de 5 log (UFC/g) d'aliment et devient élevé au-delà de cette valeur. Cependant, des épidémies associées à des aliments contenant des charges en *B. cereus* de 3 log (UFC/g) ont été signalées [43], [44]. Par conséquent, les faibles concentrations en groupe *B. cereus* de l'*attiéké* ne traduisent pas nécessairement un risque réduit pour le consommateur. Le caractère épidémiogène du groupe *B. cereus* à faible dose peut être lié au mécanisme de virulence s'exprimant entre autre, par l'excrétion d'une toxine thermolabile et préformée dans l'aliment [43], [44]. En effet, après plusieurs jours de vente, l'*attiéké* est généralement réchauffé pour être à nouveau vendu. La toxine peut être sécrétée dans l'aliment avant sa consommation. Ainsi, en raison de la grande stabilité de la toxine émétique, les bactéries du groupe *B. cereus* pourraient être tuées par le réchauffage de l'*attiéké* avant consommation, alors que la toxine émétique est toujours intacte. Il est donc probable que les échantillons d'*attiéké* examinés posent un problème de santé publique même si des cas avérés n'ont pas été constatés dans cette étude. Cependant, comme l'*attiéké* joue un rôle important dans la nutrition de nombreuses populations en Côte d'Ivoire, en Afrique et en Europe et procure des économies pour les acteurs de la filière manioc, des mesures doivent être prises pour améliorer sa qualité afin de préserver les consommateurs et ces bénéficiaires.

Le modèle de gestion du risque de contamination par *B. cereus* utilisé dans cette étude, a été la réduction de la charge bactérienne par le réchauffage hydrothermique de l'*attiéké*. Le dispositif utilisé pour le réchauffage de l'*attiéké* de plus de 3 jours après la production est simple, peu coûteux pour les ménagères et les vendeurs et disponible dans plusieurs foyers. L'étude a permis d'évaluer scientifiquement l'efficacité de cette technique de traitement traditionnelle de l'*attiéké*, en termes de garantie de la sécurité sanitaire, relativement au groupe *B. cereus*. En effet, le suivi de la destruction des contaminants en fonction de la température et du temps de réchauffage de l'*attiéké*, comportait deux phases. La première, caractérisée par une variation de température passant de celle de l'*attiéké* (température de l'environnement, 25 °C) à 90 °C, n'induit qu'une faible réduction (0,1 log UFC/g) de la flore. Cette situation peut être expliquée en considérant la conjonction de plusieurs facteurs. Une évolution de température appliquée entre 25 et 90 °C dans un temps réduit, ne peut être destructrice de façon sensible, ni de la flore végétative, ni des spores du groupe *B. cereus*. Le temps d'évolution vers la température d'équilibre peut être lié à l'intensité de la source de chaleur, à la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier (capacité), à la structure de la matière en termes de conductivité de la chaleur à destination des souches cibles [45], [46]. Il en résulte que cette première phase présente peu d'intérêt dans la réduction du risque de contamination relativement à *B. cereus*. La deuxième phase, isotherme, s'est poursuivie jusqu'à la fin de la durée de réchauffage et a induit une réduction de la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. La vapeur d'eau, apportée par la chaleur au cours du réchauffage, augmente la teneur en eau résiduelle de l'*attiéké* jusqu'à une teneur d'équilibre correspondant au regorgement d'eau des interstices. Par conséquent, tout apport de chaleur n'influence plus la variation de la température qui se stabilise à 90 °C après un temps moyen de réchauffage hydrothermique de 15 min. Selon [45], la température de la vapeur d'eau dans le matériau, la durée du réchauffage et la teneur en eau du produit sont les paramètres qui contrôlent le réchauffage hydrothermique. L'épaisseur de la couche d'*attiéké* donc la quantité d'*attiéké* dans le couscoussier influence quant à elle l'homogénéité du réchauffage hydrothermique. Il se crée un gradient de température d'autant plus significatif que l'épaisseur de la couche du produit est importante, mais qui disparaît pour des temps de réchauffage hydrothermique plus longs [46].

Le profil de destruction des germes à 90 °C n'a pas été linéaire au cours des premières minutes du réchauffage. La cinétique de destruction thermique obtenue, avec une forme concave orientée vers le bas et un épaulement, résulte d'une part d'une activation de la population microbienne avant leur destruction. D'autre part, la présence d'épaulement s'explique notamment par l'agrégation et l'hétérogénéité de résistance ou à la diversité de réponse des spores à un réchauffage thermique ou hydrothermique [47], [48] illustrée par la valeur du coefficient de corrélation ( $R^2 = 0,67$ ). Pour ce type de cinétique, la destruction commence lentement puis s'accélère au cours du réchauffage hydrothermique. Ceci s'explique par

le fait que pour permettre leur germination, certaines spores nécessitent une activation qui peut être engendrée par un choc physique, tel que le choc thermique. La température de réchauffage hydrothermique a un effet sur la germination du genre *Bacillus*. Ainsi, le pourcentage de spores germées diminue lorsque la température augmente. Les spores s'affaiblissent et se fragilisent lorsque des températures et des durées importantes leur sont appliquées. Travaillant sur l'activation des spores de *Bacillus megaterium*, [49] ont observé une meilleure capacité d'activation à certaines températures. Cette capacité d'activation des spores est optimale entre 62 et 78 °C avec un taux de germination maximal obtenu entre 64 et 68 °C. Cependant, ces auteurs ont enregistré une diminution du taux de germination et une augmentation du temps de latence à la germination lorsque la température était supérieure à 68 °C. Nos résultats concordent avec ces différentes observations lorsque l'*attiéké* a été réchauffé à 90 °C avec un temps de latence de 18 h et pourraient s'expliquer par un phénomène de rupture de liaisons au sein de la paroi de la spore, rupture obtenue grâce à l'énergie fournie par le réchauffage hydrothermique. Les cibles de ce phénomène de rupture seraient des enzymes lytiques impliquées dans le processus de dégradation du peptidoglycane qui conduit à la réhydratation et par conséquent à la germination de la spore [50], [51]. La germination ou non de la spore est aussi influencé par la composition de la matrice alimentaire. En effet, l'amidon, constituant majoritaire de l'*attiéké*, gélatinisé sous l'effet de la chaleur, retarde ou diminue la germination de la spore [52].

Par ailleurs, les spores de *B. cereus* n'ont pas montré un fort potentiel de croissance dans l'*attiéké* après le réchauffage hydrothermique à 90 °C pendant plus de 15 min. La population de *B. cereus* n'a pas excédé la concentration seuil de  $10^5$  UFC/g fixée dans les normes, ni celle de  $10^3$  UFC/g rencontrée dans certaines épidémies, avec un temps de latence moyen de 18 h. Le réchauffage hydrothermique réduit la charge de l'*attiéké* en *B. cereus* mais aussi élimine la flore de contamination responsable de gastro-entérites. Le délai limite maximal de consommation de l'*attiéké* réchauffé a été de 18 h.

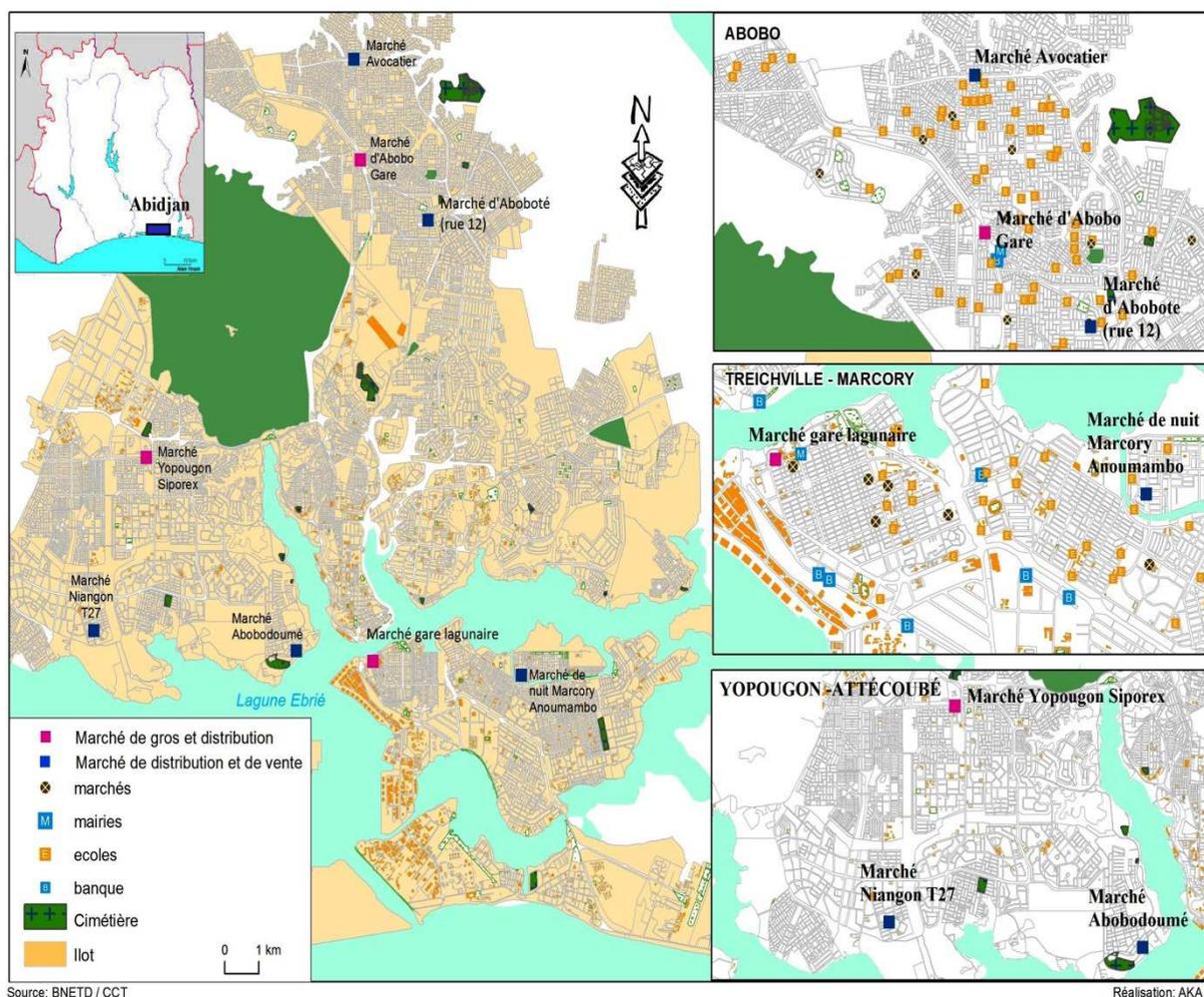


Figure 1 : Carte d'Abidjan avec matérialisation les marchés de gros et demi-gros et les marchés informels de distribution et de vente d'*attiéké*



*Figure 2 : Échantillons d'attiéké conditionné en sachet plastique pour la vente au détail*

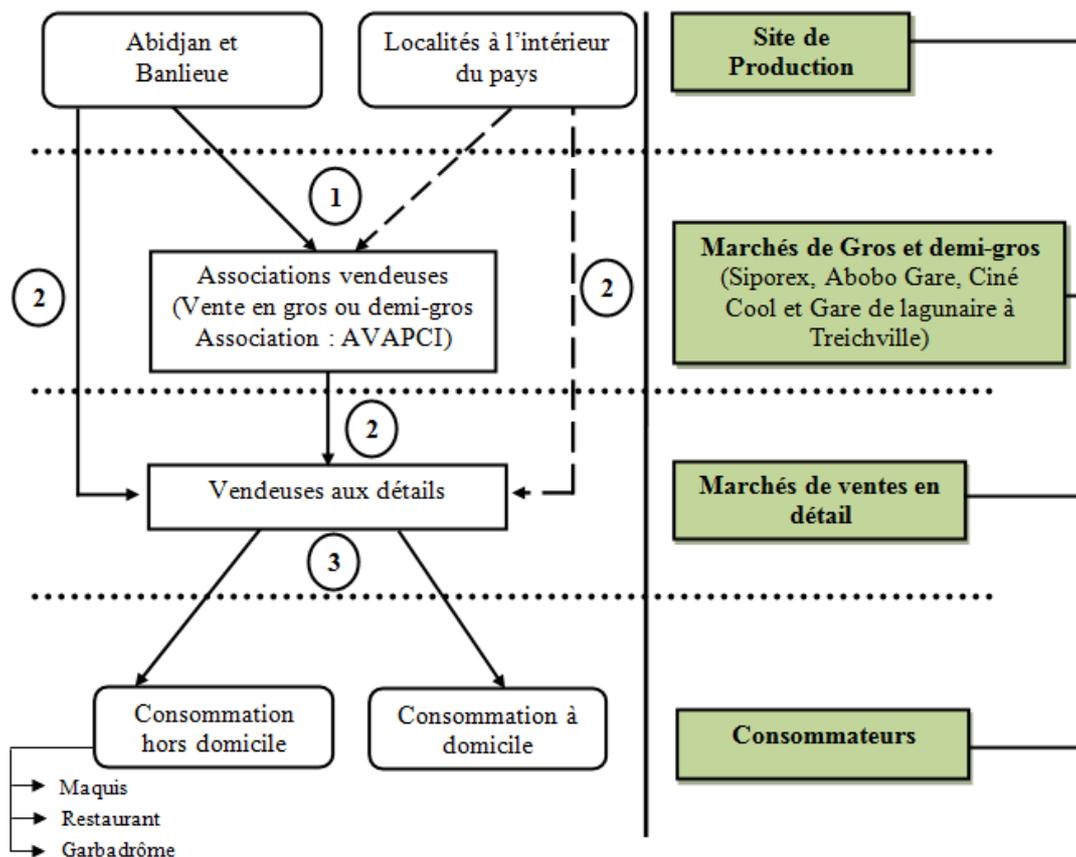


Figure 3 : Chaîne de production à la consommation d'attiéké à Abidjan

(1) Transport sur les marchés de gros et demi gros, (2) Transport sur les marchés de ventes en détail, (3) Lieux de consommation.

—> Voie 1  
 - -> Voie 2

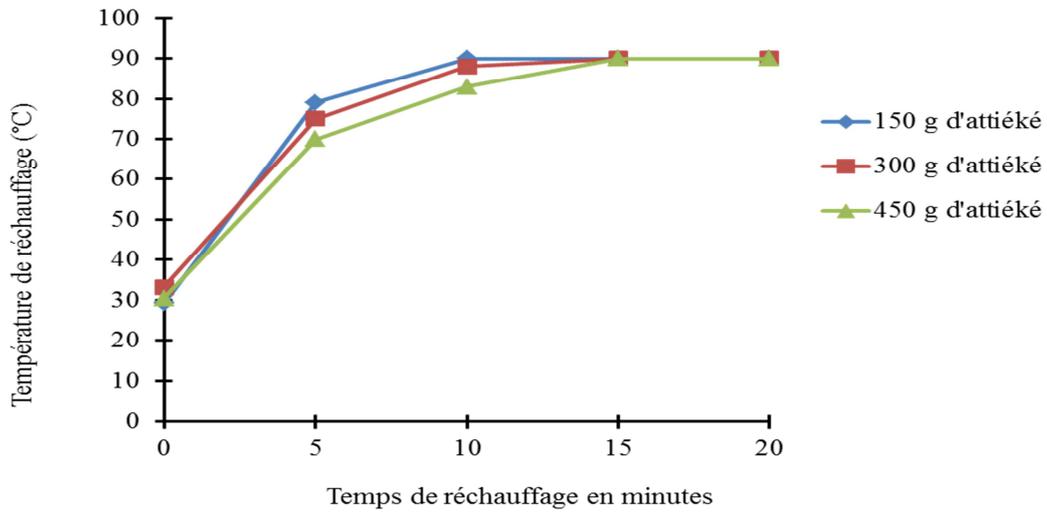


Figure 4 : Variation de la température en fonction du temps au cours du réchauffage de l'attiéké

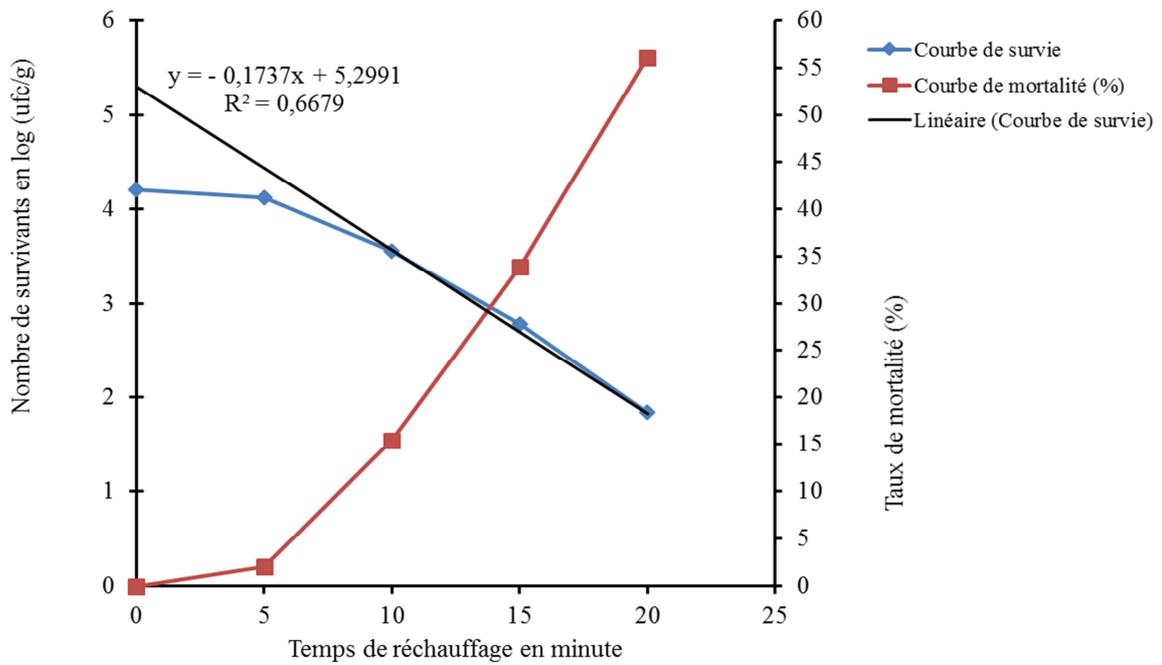


Figure 5 : Courbe de survie des bactéries du groupe *Bacillus cereus* au cours du réchauffage à 90° C de 150 g d'attiéké

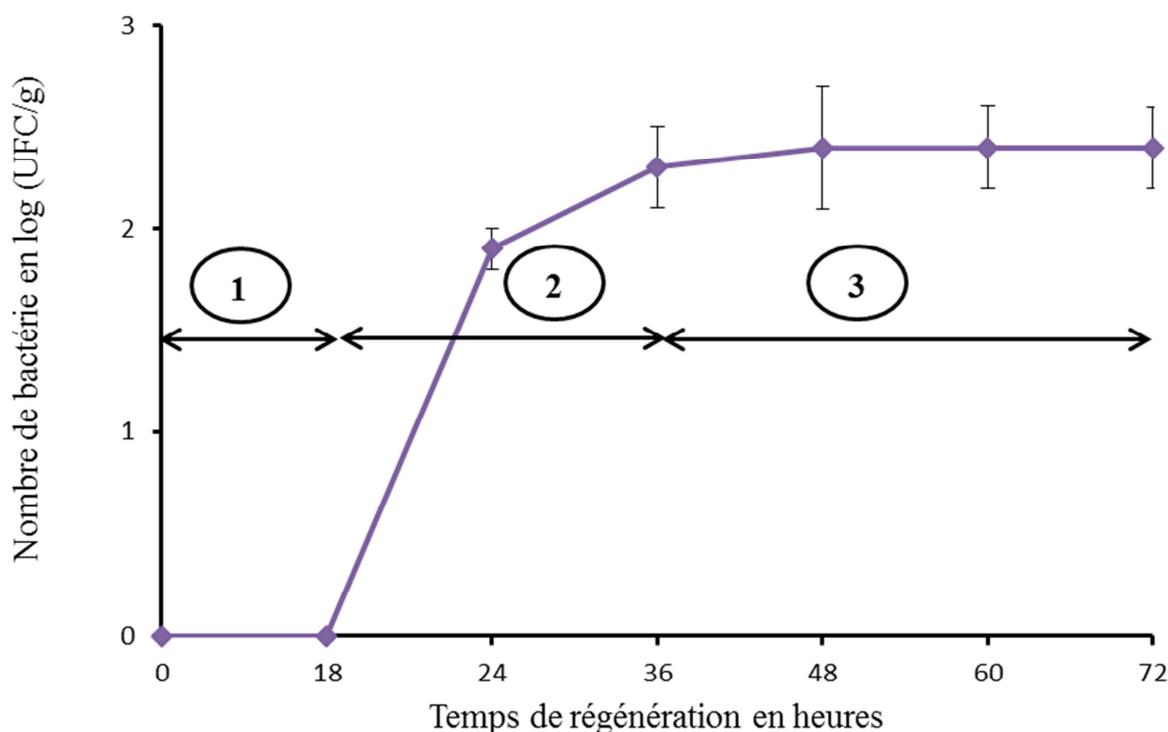


Figure 6 : Courbe de régénération du groupe *Bacillus cereus* dans l'attiéké après 15 minutes de réchauffage à 90 °C

(1) phase de latence, (2) phase de croissance exponentielle, (3) phase stationnaire

Tableau 1 : Séquence nucléotidique des amorces utilisées pour l'identification des espèces de *Bacillus cereus* et leur programme d'amplification

| Gènes cibles                                  | Amorces  | Séquence nucléotidique des amorces (5'-3') | Programme d'amplification                                    | Taille des amplicons (pb) | Température hybridation (°C) | Références |
|---|----------|--|--|---------------------------|------------------------------|------------|
| 16S rADN des eubactéries                      | bak4     | AGGAGGTGATCCARCCGCA                        | 95°C, 3 min  | ~1500                     | 60                           | [25]       |
|   | bak11w   | AGTTTGATCMTGGCTCAG                         | 40 x [95°C, 15 s ; 60°C, 30 s ; 72°C, 120 s]<br>72°C, 7 min  |                           |                              |            |
| <i>motB</i>                                   | BCFomp 1 | ATCGCCTCGTTGGATGACGA                       | 94°C, 5 min  | 575                       | 54,5                         | [24]       |
|   | BCRomp 1 | CTGCATATCCTACCGCAGCTA                      | 30 x [94°C, 30 s ; 54,5°C, 60 s ; 72°C, 60 s]<br>72°C, 7 min |                           |                              |            |
| <i>gyrB</i> de <i>B. anthracis</i>            | BASH-2F  | GGTAGATTAGCAGATTGCTCTT<br>CAAAAGA          |  | 253                       | 63                           | [26]       |
|   | BASH-2R  | ACGAGCTTTCTCAATATCAAAA<br>TCTCCGC          |  |                           |                              |            |
| <i>gyrB</i> de <i>B. cereus sensu stricto</i> | BCJH-F   | TCATGAAGAGCCTGTGTACG                       | 94°C, 5 min<br>30 x [94°C, 30 s ; 63°C, 30 s ; 72°C, 30 s]   | 475                       | 63                           | [26]       |
|   | BCJH-1R  | CGACGTGTCAATTCACGCGC                       |  |                           |                              |            |
| <i>gyrB</i> de <i>B. mycoides</i>             | BMSH-F   | TTTTAAGACTGCTCTAACACGT<br>GTAAT            | 72°C, 5 min  | 604                       | 63                           | [26]       |
|   | BMSH-R   | TTCAATAGCAAAATCCCACCA<br>AT                |  |                           |                              |            |
| <i>gyrB</i> of <i>B. thuringiensis</i>        | BTJH-1F  | GCTTACCAGGGAAATTGGCAG                      |  | 299                       | 63                           | [26]       |
|   | BTJH-R   | ATCAACGTCGGCGTCGG                          |  |                           |                              |            |

Tableau 2 : Prévalence en bactéries du groupe *Bacillus cereus* de l'attiéké en vente

| Produits                    | Nombre d'échantillons (%) d'attiéké contaminés |                   |                                      |                  |
|-----------------------------|--|-------------------|--------------------------------------|------------------|
|                             | Formes végétales uniquement                    | Spores uniquement | Mélange formes végétatives et Spores | Total            |
| Attiéké fraîchement préparé | 2 (28,6)                                       | 0 (0)             | 5 (71,4)                             | 7 (43,8)         |
| Attiéké en vente            | <b>62 (80,5)</b>                               | <b>11 (14,3)</b>  | <b>4 (5,2)</b>                       | <b>77 (25,2)</b> |
| 1 - 2 jours                 | 24 (72,7)                                      | 9 (27,3)          | 0 (0,0)                              | 33 (20,0)        |
| 3 - 5 jours                 | 38 (86,4)                                      | 2 (4,5)           | 4 (9,1)                              | 44 (28,2)        |

Tableau 3 : Qualité microbiologique de l'attiéké en vente

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

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

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

## 5 CONCLUSION

Au niveau de la chaîne alimentaire de l'attiéké consommé à Abidjan, l'étude a montré une non-conformité de quelques caractéristiques, ainsi que des pratiques à risque d'insécurité sanitaire. L'attiéké consommé à Abidjan est contaminé par *B. thuringiensis* et *B. cereus sensu stricto*. La qualité microbiologique du produit se dégrade de plus en plus, au cours de la vente. L'attiéké de plus de 2 à 3 jours après la production, peut être régénéré par réchauffage, basé sur un réchauffage hydrothermique de 90 °C pendant au moins 15 minutes, qui réduit la charge initiale en *B. cereus* de 56,1 % [de 4,2 à 1,8 log (UFC/g)]. Le délai limite de consommation du produit ainsi traité est de 18 h. L'étude est une première en Côte d'Ivoire, du point de vu de l'évaluation de l'efficacité et de l'optimisation du réchauffage hydrothermique de l'attiéké, une pratique traditionnelle courante, simple et peu couteuse pour les acteurs de la filière, mais utilisée de façon empirique et non maîtrisée. Les données résultant de cette étude contribuent à la préservation de la santé du consommateur, par la réduction du risque de consommation de l'attiéké contaminé par *Bacillus cereus* à des doses toxiques.

## REMERCIEMENTS

Cette étude a été financée par le Programme d'Appui Stratégique à la Recherche Scientifique en Côte d'Ivoire (PASRES) (Projet CSRS/PASRES N°27). Nous remercions les productrices et vendeuses d'attiéké à Abidjan regroupées au sein de l'Association des Vendeuses d'attiéké et de Poissons de Côte d'Ivoire (AVAPCI).

## REFERENCES

- [1] F. Aboua, E. Konan, A. Kossa, F. Agro, and A. Kamenan, "Évolution des teneurs d'acide cyanhydrique et l'acide oxalique au cours de la transformation du manioc en attiéké". *Agronomie Africaine*, vol 81, pp. 117-122, 1989.
- [2] NI 484, "attiéké - Spécification, Côte d'Ivoire Normalisation, Norme ivoirienne," 1<sup>ère</sup> Édition, 5 p, 2013.
- [3] N.T. Djéni, K.F. N'guessan, A.T. Dadié, and K. M. Djè, "Impact of different levels of a traditional starter on the fermentation of cassava dough for Attiéké production," *Food*, vol 2, pp. 145-151, 2008.
- [4] CNRA, "Manioc et Attiéké : du nouveau." Bulletin d'information et de liaison du CNRA, *CNRA Info* N° 8, 8 p, 2003.
- [5] J.B. Assanvo, N.G. Agbo, N.E.N. Behi, and Z. Farah, "Enquêtes de consommation et de production d'attiéké réalisées à Abidjan, Dabou et à Jacqueville". Rapport. Université de Cocody, Côte d'Ivoire, Laboratoire de Biochimie et Science des Aliments (LBSA)/ Centre Suisse de Recherches Scientifiques en Côte d'Ivoire (CSRS)/Ecole Polytechnique Fédérale de Zürich (ETHZ), Abidjan-Côte d'Ivoire. 25p, 2000.
- [6] M. Sotomey, E.-A.D. Ategbro, E. C. Mitchipke, M.-L. Gutierrez, and M. C. Nago, "Innovation et diffusion des produits alimentaires en Afrique: l'attiéké au Bénin. Alimentation. Savoir-faire et Innovation en Agroalimentaire en Afrique de l'Ouest", CIRAD, 97 p, 2001.
- [7] J. B. Assanvo, G. N. Agbo, Y. E. N. Behi, P. Coulin, and Z. Farah, "Microflora of traditional starter made from cassava for "Attiéké" production in Dabou (Côte d'Ivoire)", *Food Control*, vol 17, pp. 37-41, 2006.
- [8] N.G. Amani and A. Kamenan, "Potentialités nutritionnelles et technologie traditionnelle de transformation des denrées amylacées en Côte d'Ivoire," 2<sup>ème</sup> Atelier international. Voies alimentaires d'amélioration des situations nutritionnelles, 23-28 Novembre 2003, Ouagadougou, Burkina Faso, pp. 383-392, 2003.
- [9] N.T. Djéni, K.A. Kouamé, Y. Traoré, K.R. Nevry, and K.M. Djè, "Assessment of knowledge, attitudes and practices of food handlers in Attiéké production units in relation to food hygiene and safety in Côte d'Ivoire in 2012", *Food and Nutrition Sciences*, vol 5, pp. 896-904, 2014.
- [10] F. Aboua, A. Kossa, K. Konan, K. Mosso, S. Angbo, and A. Kamenan, "Analyse de quelques constituants du Manioc au cours de la préparation de l'attiéké," In: Foua B.K. and Philomène B.J.R., Eds., La post-récolte en Afrique : Séminaire International Abidjan, Montmagny QC Marquis Publishers, Côte d'Ivoire, pp. 217-221, 1990.
- [11] B.Y. Kouassi, A. Traoré, and G. Sirpé, "Transformation et consommation des denrées alimentaires en Afrique de l'ouest centrale: Burkina Faso, Côte d'Ivoire et Ghana," KARTHALA Editions, 180 p, 2008.
- [12] A.C. Kacou, "Optimisation des conditions d'application d'une méthode de conservation longue durée de la pâte de manioc (*Manihot esculenta* Crantz) en vue d'améliorer la qualité alimentaire de l'attiéké et du placali," Thèse de doctorat, Université de Cocody-Abidjan (Côte d'Ivoire), 2000.
- [13] N.T. Djéni, K. F. N'Guessan, D. M. Toka, K. A. Kouamé, and K. M. Dje, "Quality of attiéké (a fermented cassava product) from the three main processing zones in Côte d'Ivoire," *Food Research International*, vol 44, p. 410-416, 2011.
- [14] G. Atta, "Promotion de l'attiéké, 20 milliards de FCFA des revenus annuels pour les producteurs et les commerçants," Fraternité matin jeudi 31 juillet, 2008.
- [15] W. K. Amo-a-wua, and M. Jakobsen, "The role of *Bacillus* species in the fermentation of cassava," *Journal of Applied Bacteriology*, vol 79, pp. 250-256, 1996.
- [16] P. Coulin, Z. Farah, J. B. Assanvo, J. Spillmann, and Z. Puhan, "Characterisation of the microflora of the fermented cassava product attiéké during traditional small scale preparation," *International Journal of Food Microbiology*, vol 2, pp. 131-136, 2006.
- [17] M.O. Sanni, "Critical control points in commercial production of high quality gari. Proceedings of the fourth triennial symposium of the international society for tropical root crops," Africa Branch, Kinshasa, Zaire, 5-8 December 1989, pp. 217-222, 1992.
- [18] B. Faye and G. Loiseau, "Sources de contamination dans les filières laitières et exemples de démarches qualité" In : Hanak E., Boutrif E., Fabre P., Pineiro M., 2002. Gestion de la sécurité des aliments dans les pays en développement. Actes de l'atelier international, CIRAD-FAO, 11-13 déc. 2000, Montpellier, France, Cirad, Cédérom, 2002.
- [19] A.K. Kouamé, T. N. Djéni, F. K. N'Guessan, and K. M. Djè, "Postprocessing microflora of commercial attiéké (a fermented cassava product) produced in the south of Côte d'Ivoire," *Letters in Applied Microbiology*, vol 56, pp. 44-50, 2013.
- [20] AFNOR "Norme NF V 08-010. In: Microbiologie des aliments - Règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen". Analyse microbiologique recueil de normes françaises. 6<sup>ème</sup> Ed. Paris, pp. 67-75, 1996.
- [21] ISO 7932, "Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus*-Colony count technique at 30°C," 2004.
- [22] ISO 7218, "Microbiology of food and animal feeding stuffs-General requirements and guidance for microbiological examinations," Third edition, 66 p, 2007.

- [23] D. Goldenberger, I. Perschil, M. Ritzler, M. Altwegg M, "A simple "universal" DNA extraction procedure using SDS and proteinase K is compatible with direct PCR amplification," *PCR Methods and Applications*, vol 4, pp. 368-370, 1995.
- [24] G. Zhou, H. Liu, J. He, Y. Yuan, and Z. Yuan, "the occurrence of *Bacillus cereus*, *B. thuringiensis* and *B. mycooides* in Chinese pasteurized full fat milk," *International Journal of Food Microbiology*, vol 121. Pp. 195-200, 2008.
- [25] K. Oliwa-Stasiak, C.I. Molnar, K. Arshak, M. Bartoszcze, and C.C. Adley, "Development of a PCR assay for identification of the *Bacillus cereus* group species," *Journal of Applied Microbiology*, vol 108, pp. 266-273, 2010.
- [26] S.M. Schwenninger, U. Von Ah, B. Niederer, M. Teuber, and L. Meile, "Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains," *Journal of Food Protection*, vol 68, pp. 111-119, 2005.
- [27] S.H. Park, H.J. Kim, J.H. Kim, T.W. Kim, and H.Y. Kim, "Simultaneous detection and identification of *Bacillus cereus* group bacteria using multiplex PCR," *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol 17, pp. 1177-1182, 2007.
- [28] L.I. Katzin, L.A. Sandholzer, M.E. Stron, "Application of the decimal reduction time principle to a study of the resistance of coliform bacteria to pasteurization," *Journal of Bacteriology*, vol 45, pp. 256-272, 1943.
- [29] M. Sanaa, "Microbiologie prévisionnelle : principaux modèles de croissance utilisés en appréciation quantitative des risques," *Épidémiologie et santé animale*, vol 41, pp. 169-177, 2002.
- [30] Anonyme 1, "Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires - Lignes directrices pour l'interprétation," Ministère de la santé, Direction de la santé, Service de la sécurité alimentaire. Luxembourg, Belgique, fiche FC/LZ/PH, F-054 Rev02, pp 49, 2011.
- [31] Anonyme 2, "Règlement (CE) n° 1441/2007 de la commission du 5 décembre 2007 modifiant le règlement (CE) n° 2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires," 2007.
- [32] P.S. Kunwar, M. Dinesh, S. Sarita, R. Dalwani, "Impact Assessment of Treated/Untreated Wastewater Toxicants Discharged by Sewage Treatment Plants on Health, Agricultural and Environmental Quality in the Wastewater Disposal Area", *Chemosphere*, Vol 55, pp 227-255, 2004.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2003.10.050>; Consulté le 03/04/2015.
- [33] C. Ankolekar, R.G. Labbé, "Physical characteristics of spores of food-associated isolates of the *Bacillus cereus* group," *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 76, pp 982-984, 2010.
- [34] M. Valero, L.A. Hernández-Herrero, P.S. Fernández, M.C. Salmerón, "Characterization of *Bacillus cereus* from fresh vegetables and refrigerated minimally processed foods by biochemical and physiological tests," *Food Microbiology*, Vol 19, pp 491-499, 2002.
- [35] H. Rosenquist, L. Smidt, R.S. Anderson, B.G. Jensen, A. Wilcks, "Occurrence and significance of *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* in ready-to-eat food," *FEMS Microbiology Letters*, Vol 250, pp 129-136, 2005.
- [36] M.F. Fangio, S.I. Roura, R. Fritz, "Isolation and identification of *Bacillus* spp. and related genera from different starchy foods," *Journal of Food Science*, Vol 75, pp M218-M221, 2010.
- [37] A. Andersson, U. Ronner, P.E. Granum, "what problems does the food industry have with the spore-forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*?" *International Journal of Food Microbiology*, Vol 28, pp 145-155. 1995.
- [38] A. Eneroth, A. Christiansson, J. Brendehaug G. Molin, "Critical contamination sites in the production line of pasteurised milk, with reference to the psychrotrophic spoilage flora," *International Dairy Journal*, Vol 8, pp 829-834, 1998.
- [39] T.S.M. Pirttijarvi, M.A. Andersson, M. S. Salkinoja-Salonen, "Properties of *Bacillus cereus* and other bacilli contaminating biomaterial-based industrial processes," *International Journal of Food Microbiology*, Vol 60, pp 231-239, 2000.
- [40] M.H. Guinebretiere, F.L. Thompson, A. Sorokin, P. Normand, P. Dawyndt, M. Ehling-Schulz, B. Svensson, V. Sanchis, C. Nguyen-The, M. Heyndrickx, P. De Vos, "Ecological diversification in the *Bacillus cereus* Group". *Environmental Microbiology*, Vol 10, pp 851-65, 2008.
- [41] M. Ziane, N. Desriac, P. Le Chevalier, O. Couvert, B. Moussa-Boudjemaa, I. Leguérinel, "Identification, heat resistance and growth potential of mesophilic spore-forming bacteria isolated from Algerian retail packaged couscous," *Food Control*, Vol 45, pp 16-21, 2014.
- [42] S. Eglezos, B. Huang, G.A. Dykes, N. Fegan, "The Prevalence and Concentration of *Bacillus cereus* in Retail Food Products in Brisbane, Australia," *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol 7, pp 867-870, 2010.
- [43] EFSA, "Opinion of the scientific panel on biological hazards on *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp.in foodstuffs," *The EFSA Journal*, Vol 175, pp 1-48, 2005.
- [44] L.P.S. Arnesen, A. Fagerlund, P.E. Granum, "from soil to gut: *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins," *FEMS Microbiology Reviews*, Vol 32, pp 579-606, 2008.
- [45] S.A. Bahrani, "Modification des propriétés physico-chimiques de l'amidon par procédés hydrothermiques : Contribution à l'étude des transferts couplées chaleur-masse," PhD thèse, Université de La Rochelle, France. <NNT : 2012LAROS366>. pp 217, 2012.
- [46] I. Zarguili, Z. Maache-Rezzoug, C. Loisel, J.-L. Doublet, "Influence of DIC hydrothermal process conditions on the gelatinization properties of standard maize starch," *Journal of Food Engineering*, Vol 77, pp 454 – 461, 2006.

- [47] O. Cerf, "A Review Tailing of Survival Curves of Bacterial Spores," *Journal of Applied Microbiology*, Vol 42, pp 1-19, 1977.
- [48] O. Couvert, "Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des traitements thermiques". Thèse de doctorat en microbiologie, Université de Bretagne Occidentale, France, Soutenue le 2 Avril 2002, 192 pp.
- [49] H.S. Levinson, M. Hyatt, "Effects of temperature on activation, germination and outgrowth of *Bacillus megaterium* spores," *Journal of Bacteriology*, Vol 101, pp 58-64, 1970.
- [50] S. Makino, N. Ito, T. Inoue, S. Miyata, R. Moriyama, "A spore-lytic enzyme released from *Bacillus cereus* spores during germination," *Microbiology*, Vol 140, pp 1403-1410, 1994.
- [51] R. Leuschner, P. Lillford, "Effects of temperature and heat activation on germination of individual spores of *Bacillus subtilis*," *Letters in Applied Microbiology*, Vol 29, pp 228- 232, 1999.
- [52] I., Gonzalez, M. Lopez, M. Mazas, J. Gonzalez, A. Bernardo, "Thermal resistance of *Bacillus cereus* spores as affected by additives in the recovery medium," *Journal of Food Safety*, Vol 17: pp 1-12, 2007.