

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 28 décembre 2023

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

**relatif à un document d'appui aux lignes directrices de l'arrêté du 7 mars 2011
relatives à l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires
technologiques utilisés comme agents de décontamination des denrées
d'origine végétale**

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

L'Anses a été saisie le 26 juillet 2022 par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour la réalisation de l'expertise suivante : « mise à jour des lignes directrices permettant d'évaluer l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires technologiques utilisés comme agents de décontamination des denrées d'origine végétale ».

Depuis le 3 février 2023, le Ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire est l'autorité compétente en matière de réglementation des auxiliaires technologiques conformément au décret n° 2023-60 relatif à la modification de l'autorité compétente en matière de réglementation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées alimentaires et en matière de réglementation relative aux compléments alimentaires.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Un auxiliaire technologique est défini par le règlement (CE) n° 1333/2008 comme « *toute substance* :

- i) non consommée comme ingrédient alimentaire en soi ;*
- ii) volontairement utilisée dans la transformation de matières premières, de denrées alimentaires ou de leurs ingrédients pour répondre à un certain objectif technologique pendant le traitement ou la transformation ; et*

iii) pouvant avoir pour résultat la présence non intentionnelle mais techniquement inévitable de résidus de cette substance ou de ses dérivés dans le produit fini, à condition que ces résidus ne présentent pas de risque sanitaire et n'aient pas d'effets technologiques sur le produit fini ».

Le décret n° 2011-509 du 10 mai 2011 fixe les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. L'arrêté du 7 mars 2011 définit les prescriptions relatives à la constitution d'un dossier de demande d'autorisation d'emploi des auxiliaires technologiques dans une annexe intitulée « LIGNES DIRECTRICES POUR LA CONSTITUTION DES DOSSIERS [...] ». La note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 (Anses 2018c) est également un document de référence et d'appui pour la constitution de ces dossiers. Elle apporte des précisions sur les données à fournir pour les aspects relatifs à l'innocuité et à la sécurité d'emploi, au regard des prescriptions susmentionnées.

L'annexe de l'arrêté du 7 mars 2011 précise également qu' « une justification de l'usage, de l'intérêt et de l'efficacité de la substance ou du mélange de substances, ainsi que l'explication du mode d'action et du rôle technologique dans le procédé de transformation, devraient être fournies, mentionnant les actions technologiques principales recherchées et secondaires éventuelles, si connues ». A cet égard, l'Afssa (Agence française de sécurité sanitaire des aliments) avait formulé en 2005 des « recommandations pour la présentation des données permettant d'évaluer l'efficacité des antimicrobiens appliqués sur, ou incorporés dans, les aliments » (Afssa 2005). L'expérience montre que les dossiers contiennent souvent des informations parcellaires et insuffisantes pour que l'Agence puisse évaluer l'efficacité antimicrobienne revendiquée par le pétitionnaire.

Dans ce contexte, l'Anses a été saisie pour expliciter, par un document scientifique et technique, les termes des lignes directrices de l'arrêté relatives à l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires technologiques. Ce document a vocation à se substituer aux recommandations publiées par l'Afssa en 2005.

Cette expertise ne concerne que la catégorie d'auxiliaires technologiques « agents de décontamination des produits végétaux » mentionnée dans l'annexe 1 du décret n° 2011-509, c'est-à-dire les « substances utilisées pour réduire ou maîtriser la contamination des denrées alimentaires d'origine végétale inhérente à leur provenance. Leur utilisation ne doit en aucune manière se substituer aux bonnes pratiques d'hygiène et leur utilisation doit être suivie d'une élimination par rinçage »¹.

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) ».

2.1. Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'Anses a confié l'expertise au groupe de travail (GT) « LEAF » créé le 27 décembre 2022 et rattaché au Comité d'experts spécialisé (CES) « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (BIORISK). Les travaux ont été présentés, à titre d'information, au GT « Évaluation des matériaux et auxiliaires technologiques dans le domaine de l'alimentation et de l'eau » (MATAE) le 25 mai 2023. Les travaux d'expertise du GT ont été présentés au CES BIORISK tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques entre le 21 septembre 2022 et le 13 novembre 2023, et ont été adoptés par le CES BIORISK réuni le 13 novembre 2023.

Pour déterminer le cadre d'application des lignes directrices, ainsi que les limites rencontrées lors de l'étude des précédents dossiers expertisés par l'Anses, le GT LEAF a réalisé une synthèse des dossiers

¹Définition du ministère de l'agriculture et de la souveraineté alimentaire, consulté en ligne le 10 octobre 2023 à l'adresse <https://agriculture.gouv.fr/quest-quun-auxiliaire-technologique#section-1>

les plus récents relatifs à l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires technologiques utilisés pour la décontamination des végétaux sur la base des avis de l'Anses rendus sur les saisines 2010-SA-0013, 2011-SA-0142, 2011-SA-0221, 2012-SA-0014, 2012-SA-0158, 2012-SA-0232, 2013-SA-0091, 2013-SA-0107, 2013-SA-0193, 2014-SA-0021, 2014-SA-0108, 2014-SA-0221, 2015-SA-0081, 2015-SA-0165, 2015-SA-0245, 2016-SA-0055, 2017-SA-0006, 2017-SA-0007, 2017-SA-0146, 2018-SA-0128, 2019-SA-0119, 2019-SA-0132, 2019-SA-0137, 2019-SA-0154, 2020-SA-0061, 2020-SA-0147, 2021-SA-0041, 2021-SA-0075 et 2021-SA-0155, en y incluant des documents intermédiaires produits dans le cadre de leurs expertises par les collectifs ou les agents de l'Anses². La coordination de l'Anses a réalisé une synthèse des dangers biologiques transmis par voie alimentaire lorsque la source est un aliment d'origine végétale en s'appuyant sur la base des données épidémiologiques issues des saisines de l'Anses 2015-SA-0162 (Anses 2018b) et 2016-SA-0153 (Anses 2020a), des épidémies notifiées en Europe par l'EFSA entre 2009-2017, des alertes RASFF³ sur la période janvier 2017 à septembre 2020, des bulletins de veille sanitaire internationale de la plateforme de surveillance de la chaîne alimentaire de 2019 à mars 2023 et de l'avis de l'EFSA (EFSA BIOHAZ Panel, 2023).

L'expertise s'est également appuyée sur :

- les référentiels réglementaires, lignes directrices préalables, normes et littérature scientifique (cf. références bibliographiques) ;
- les informations relatives à la constitution des dossiers et des essais réalisés dans le cadre des demandes d'autorisation d'utilisation des auxiliaires technologiques comme agents de décontamination, et transmises par les centres techniques ACTALIA et CTCPA⁴, lors des auditions du 16 juin 2023 ;
- les informations relatives aux méthodes d'identification des parasites recueillies auprès d'un expert nommé rapporteur et lors de l'audition d'un expert parasitologue, le 08 juin 2023.

2.2. Prévention des risques de conflits d'intérêts

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Dans ce contexte, deux experts du CES BIORISK n'ont pas pris part aux délibérations relatives à cette expertise. Un expert du GT LEAF n'a pas participé à l'analyse critique de la norme NF EN ISO 20976-2 (2022), ayant participé à son élaboration. Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet : <https://dpi.sante.gouv.fr/>.

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS DU CES BIORISK ET DU GT LEAF

3.1. Préambule

Les micro-organismes pathogènes pour les végétaux, hormis les champignons producteurs de mycotoxines, ne le sont pas pour l'Homme et l'animal. Cependant les végétaux, par les pratiques culturelles et de récolte, peuvent être vecteurs de micro-organismes altérant les aliments ou pathogènes pour ceux qui les consomment. C'est ainsi que la terre dans laquelle les végétaux sont cultivés, les fumures employées pour amender le sol, l'air, l'eau destinée à l'irrigation et l'arrosage, les contacts avec

² Les dossiers déposés et à l'origine des avis de l'Anses sont confidentiels, et ne peuvent être utilisés à posteriori pour d'autres fins sans l'accord express des pétitionnaires. Les références associées aux avis sont respectivement : Afssa (2010); Anses (2011, 2012b, 2012a, 2012c, 2013b, 2013c, 2013a, 2014c, 2014a, 2014b, 2015a, 2015b, 2016b, 2016a, 2017c, 2017a, 2017b, 2017d, 2018a, 2019, 2020d, 2020c, 2020b, 2021d, 2021c, 2021b, 2021a, 2022).

³ RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed, https://food.ec.europa.eu/safety/rasff_en

⁴ Au cours de l'audition, le CTCPA a autorisé que les dossiers déposés par le centre technique lors des années précédentes puissent être disponibles dans le cadre de la présente expertise.

les animaux sauvages et les opérateurs de récolte ou de cueillette peuvent introduire des micro-organismes tout au long de la chaîne de production.

Même si la maîtrise des bonnes pratiques professionnelles permet de limiter la présence de ces micro-organismes, les matières premières végétales peuvent être contaminées par une population microbienne diversifiée pouvant atteindre un niveau élevé pour certains végétaux (par exemple 10^6 à 10^8 UFC.g⁻¹ dans une salade verte) (Kowalska et Szczech 2022; Sun et al. 2022). Certaines nouvelles pratiques agricoles ou industrielles peuvent introduire des dangers ou accroître la contamination (par exemple l'irrigation des végétaux avec des eaux usées traitées (OMS 2006; Partyka et Bond 2022) ou la réutilisation des eaux en industrie agroalimentaire (Anses 2023a, 2023b).

Cette contamination des matières premières végétales brutes par divers agents microbiens explique la large utilisation dans les filières agro-industrielles d'auxiliaires technologiques (AT) entrant dans la catégorie d'agents de décontamination des végétaux. Les objectifs visés sont une amélioration de la qualité sanitaire, de la conservation des produits transformés et/ou des rendements de production.

3.2. Contexte réglementaire et champ d'application des lignes directrices

L'utilisation d'auxiliaires technologiques dans le domaine agro-alimentaire est soumise aux obligations générales fixées par la réglementation alimentaire (règlement (CE) n° 178/2002 ; règlement (CE) n° 852/2004). La nature des auxiliaires pouvant être utilisés n'est cependant pas harmonisée au plan européen, à l'exception de quelques catégories d'AT comme les solvants d'extraction (directive 2009/32/CE) ou les agents de décontamination des denrées animales (règlement (CE) n° 853/2004). Il n'existe pas d'obligation réglementaire de mentionner l'utilisation d'un AT sur l'étiquetage des produits traités, sauf dans le cas où l'AT est une substance ou dérive d'une substance figurant sur la liste des allergènes visés par le règlement (UE) n° 1169/2011. En France, le décret n° 2011-509 du 10 mai 2011 fixe les conditions d'autorisation et d'utilisation de certains auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine. Il s'applique en particulier aux « *agents de décontamination des produits d'origine végétale* ». Il impose l'utilisation des AT dans le respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication, le recours à « *la dose strictement nécessaire pour obtenir l'effet désiré* », fixe des exigences de « pureté chimique et biologique » et enfin met en place pour certains AT (dont les agents de décontamination des produits d'origine végétale) une autorisation préalable.

La liste des AT autorisés est mentionnée dans l'arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires. Il précise pour chaque AT autorisé la catégorie réglementaire à laquelle il appartient, la nature des denrées pour lesquelles l'emploi est autorisé, les conditions d'emploi et la dose résiduelle maximale.

Les demandes d'autorisation de mise sur le marché et d'utilisation, transmises à la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) jusqu'en 2022 et à la direction générale de l'alimentation (DGAL) depuis janvier 2023, sont soumises à l'Anses pour évaluation. L'arrêté du 7 mars 2011 fixe les lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine.

Dans le cas particulier de l'agriculture biologique, le règlement (UE) n° 2018/848 définit les exigences en matière d'auxiliaires technologiques, et précise notamment que la production de denrées alimentaires biologiques transformées implique de « *restreindre l'utilisation des [...] auxiliaires technologiques, afin qu'il y soit recouru le moins possible* ». Il pose le principe d'une liste positive des AT autorisés dans cette filière. Cette dernière est inscrite dans le règlement d'exécution (UE) n° 2021/1165 autorisant l'utilisation d'une liste de produits et substances dans la production biologique.

Le champ d'application du présent document se limite à la démonstration de l'efficacité antimicrobienne des substances utilisées comme « agents de décontamination des denrées végétales ». Le présent avis complète la note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 (saisine n° 2017-SA-0149) qui est un document de référence pour la constitution des dossiers pour tous les auxiliaires technologiques, notamment pour la démonstration de

l'innocuité de la substance utilisée (Anses 2018c). L'évaluation de l'efficacité antimicrobienne peut se faire conjointement à celle du dossier évaluant l'innocuité de la substance ou *a posteriori* de cette évaluation.

Depuis 2010, plusieurs industriels et filières ont déposé des demandes d'autorisation d'AT. Elles concernent une quinzaine de substances et mélanges utilisés comme « agents de décontamination des denrées végétales ». La synthèse des dossiers permet d'identifier deux usages :

- i) ceux où l'AT est utilisé dans l'eau, dans le cadre d'une opération unitaire de lavage ou de refroidissement (e.g. les filières 1^{re} et 4^e gammes, végétaux surgelés ou végétaux transformés) ;
- ii) ceux où l'AT est ajouté au cours du procédé, souvent dans plusieurs opérations unitaires (e.g. les filières amidonnerie, féculerie, sucrerie, distillerie et production d'alcool, meunerie, production de levures).

Ces deux usages sont concernés par ces lignes directrices, ainsi que tout autre cas d'utilisation d'AT pour la transformation dans un objectif de décontamination.

Les synthèses des données épidémiologiques et des informations recueillies dans les dossiers de pétitionnaires ont montré que divers agents pathogènes peuvent être à l'origine de maladies humaines après ingestion de denrées végétales et d'origine végétale (DVOV). Ces agents, qu'ils soient d'origine bactérienne (*Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Escherichia coli* entérohémorragiques, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* non typhiques, *Shigella* spp., *Yersinia* entéropathogènes, etc.), virale (norovirus et autres virus de gastroentérites, virus de l'hépatite A, virus de l'hépatite E etc.), ou qu'il s'agisse de moisissures ou de levures productrices de toxines (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Byssoschlamys*, *Fusarium*, *Alternaria*, etc.) ou encore de parasites (*Echinococcus* spp., *Cryptosporidium* spp., *Cyclospora cayetanensis*, *Fasciola hepatica*, *Giardia duodenalis*, *Toxoplasma gondii*, etc.), peuvent être les cibles visées par l'utilisation d'AT. Dans ce cas, l'utilisation d'AT est une mesure de maîtrise des dangers telle que définie selon la norme NF V01 002 (2021), c'est-à-dire une « *action ou activité qui est essentielle pour prévenir l'apparition d'un danger significatif lié à la sécurité des denrées alimentaires ou pour le ramener à un niveau acceptable* ».

L'analyse des dossiers a aussi montré que des micro-organismes d'altération étaient également ciblés par l'utilisation des AT. Ainsi, les lignes directrices proposées ci-après couvrent l'ensemble des grandes catégories d'organismes microbiologiques (bactéries, levures, moisissures, virus et parasites).

En ce qui concerne les rôles technologiques des AT revendiqués par le pétitionnaire, le GT LEAF souligne que la classe des « agents de décontamination des denrées d'origine végétale » regroupe des substances ou mélanges produisant deux types d'effets : i) la maîtrise de la qualité microbiologique des eaux de lavage et /ou des jus de procédé, ii) la réduction/diminution de la contamination des végétaux (FAO & OMS 2022). Le GT a étudié ces deux finalités.

Tout changement de pratique ou de procédé lors de la transformation des denrées alimentaires, incluant l'utilisation d'un AT, nécessite une nouvelle analyse des dangers. Il est nécessaire de vérifier que l'emploi de l'AT demeure une mesure de maîtrise adaptée. **Les effets de l'utilisation de l'AT sur l'évolution des populations microbiennes pendant la durée de vie du produit doivent être pris en compte, et amènent l'utilisateur à évaluer de nouveau la date limite de consommation (DLC) des produits concernés.**

3.3. Constitution des dossiers

Le présent chapitre décrit les données à transmettre dans le cadre de la constitution d'un dossier visant à démontrer l'efficacité antimicrobienne d'une solution/substance ajoutée au cours du processus de transformation des denrées végétales et faisant l'objet d'une demande d'autorisation d'emploi en tant qu'auxiliaire technologique, afin que son évaluation soit réalisée dans les meilleures conditions. Le présent avis donne des recommandations pouvant guider le pétitionnaire pour la réalisation des essais et l'élaboration du dossier de demande.

La démonstration de l'efficacité antimicrobienne doit être objective, vérifiable et justifiée. Les documents fournis doivent former un dossier complet intégrant également une partie des données demandées dans la note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 (saisine n° 2017-SA-0149). Ceci inclut les copies des publications citées, les détails d'étude et tout autre document cité. L'évaluation des données porte sur des conditions d'emploi précisément déterminées. Tout changement des paramètres (ou de paramètres susceptibles d'influencer l'efficacité antimicrobienne ou l'innocuité de l'aliment) devra faire l'objet d'une nouvelle demande.

Afin de rendre les données à fournir plus compréhensibles, des figures, schémas et diverses autres informations sont inclus dans les annexes de cet avis. Pour la présentation des données d'efficacité antimicrobienne, le GT LEAF recommande également de suivre la trame proposée ci-après (et reprise en annexe 2), et de renseigner les rubriques qui suivent.

3.3.1. Contexte et finalité

La finalité et la/les cible(s) microbienne(s) du traitement doivent être clairement indiquées (voir Tableau 1, peut être complété par le pétitionnaire dans le but de faciliter la description de la finalité).

Tableau 1 - Finalités et cible(s) microbienne(s) de l'usage de l'auxiliaire technologique

Le traitement a-t-il pour finalité ? (plusieurs finalités peuvent être indiquées) :	Cible(s) microbienne(s) ⁵ (répondre pour chaque famille/espèce, préciser si les cibles font l'objet d'un critère réglementaire)		
	effet global, sur la charge microbienne totale	effet ciblé sur un/des agent(s) d'altération	effet ciblé sur un/des agent(s) pathogène(s)
a) une action sur la charge microbienne des produits végétaux (e.g. à visée assainissante vis-à-vis d'un agent pathogène ou d'un agent d'altération pour améliorer la conservation du produit)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
b) une action sur le devenir des populations microbiennes au cours de la conservation à l'issue du traitement (e.g. limiter leur survie, ou leur développement)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
c) une action sur l'état sanitaire de l'eau de lavage / des jus de procédé (e.g. éviter la contamination des produits végétaux lors du lavage, la formation de biofilm, l'encrassement des systèmes de filtration)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
d) l'amélioration des rendements de production par la diminution de micro-organismes d'altération ou préjudiciables au procédé (e.g. consommation des substrats par des micro-organismes ⁶)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	

⁵ Les termes « microbien » ou « micro-organisme » sont utilisés pour mentionner bactéries, virus, levures, moisissures, ainsi que parasites.

⁶ ex. la consommation de sucres par des bactéries lactiques lors de l'extraction des cossettes de betterave.

3.3.2. Présentation de l'auxiliaire technologique, des matrices végétales, des cibles microbiennes et du procédé technologique

La demande du pétitionnaire doit mentionner avec précision la nature de l'auxiliaire technologique (AT), la matrice traitée, la cible microbienne, le procédé technologique et l'étape à laquelle l'AT peut être utilisé ainsi que les conditions de mise en œuvre de l'AT.

L'objectif doit être présenté en précisant notamment s'il s'applique aux denrées alimentaires, aux eaux de lavage et/ou aux jus de procédé.

3.3.2.1. Auxiliaire technologique

Afin de démontrer la pertinence du choix de l'AT dans le cadre d'un processus technologique, le pétitionnaire doit fournir un certain nombre d'informations concernant cet auxiliaire (en plus de celles mentionnées dans la note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 (saisine n° 2017-SA-0149)) :

- sa composition, sa formulation détaillée incluant sa forme active et sa forme d'application (gazeux, liquide, mélange) ;
- son mécanisme d'action et les résistances, directes ou croisées, que pourrait générer l'utilisation de l'AT s'ils sont connus ;
- les utilisations éventuelles de l'AT dans d'autres pays ;
- toutes données supplémentaires susceptibles de démontrer la pertinence du choix de l'AT.

3.3.2.2. Matrices alimentaires végétales

L'efficacité d'un traitement dépend des caractéristiques de la matière première végétale sur laquelle il est appliqué (espèces et variétés, composition, structure, mode de culture, etc.). Ces informations doivent donc être indiquées avec précision.

Lorsque la demande porte sur plusieurs matrices végétales, le pétitionnaire peut se limiter à des essais portant sur une matrice considérée comme un modèle représentatif de la gamme de produits concernés. Dans ce cas, il doit justifier en quoi le produit étudié est représentatif d'autres espèces ou variétés végétales en se référant à des données bibliographiques ou expérimentales adaptées. La variabilité liée aux conditions de culture, aux saisons et aux événements météorologiques doit être prise en compte.

La méthode employée consiste à réaliser les essais en se plaçant dans un « scénario du pire » au regard de l'efficacité antimicrobienne⁷, et en retenant comme modèle le produit alimentaire :

- présentant de manière habituelle les plus forts niveaux de contamination microbiologique (charge microbienne totale, micro-organismes d'altération ou pathogènes) au sein de la gamme de produits ;
- considéré comme le plus difficile à décontaminer, notamment du fait de sa structure (par exemple certaines salades vertes), de sa fragilité (par exemple framboises) ou de ses conditions de culture (par exemple les végétaux cultivés en terre) ;
- destiné à être conditionné et conservé dans les mêmes conditions que les autres produits de la gamme ;
- utilisé de la même manière que les autres produits de la gamme par le consommateur (produits consommés crus ou cuits par exemple).

⁷ le scénario du pire (« *worst case scenario* » en anglais) au regard de la démonstration de l'efficacité antimicrobienne par le pétitionnaire considérera une surestimation du risque microbiologique, ce qui en fait une approche « protectrice » au regard des microorganismes présents. Cela se traduit dans le contexte de ces présentes lignes directrices par exemple à minimiser la concentration de la substance atteignable dans les essais ou son temps de contact au cours du procédé. Cependant, ce scénario du pire au regard de l'efficacité antimicrobienne n'est pas le même que celui considéré pour l'évaluation de l'innocuité de la substance, qui, au contraire, maximise généralement la concentration de la substance ou son temps de contact au cours du procédé.

Le pétitionnaire doit apporter tous les éléments d'information disponibles permettant de répondre aux exigences précisées ci-dessus.

3.3.2.3. Cibles microbiennes

Les végétaux sont contaminés par divers micro-organismes présentant des sensibilités variables aux agents antimicrobiens ; de ce fait le choix du traitement dépend des micro-organismes ciblés. Par conséquent, le pétitionnaire doit indiquer précisément les cibles microbiennes visées. Il peut s'agir :

- d'un ou plusieurs agents microbiens précisément nommés (genre, espèce), pouvant être des bactéries, virus, levures, moisissures, ou parasites ;
- d'un groupe microbien identifié par ses caractéristiques taxonomiques (exemple : les levures) ou culturales (exemple : micro-organismes mésophiles aérobies).

Selon les cas, ces micro-organismes cibles peuvent être des agents pathogènes, d'altération, et/ou des indicateurs de contamination.

Si ces micro-organismes répondent à des critères microbiologiques réglementaires, il convient de le mentionner.

Pour chaque micro-organisme cible, le pétitionnaire doit indiquer et justifier l'effet recherché sur la population : effet microbicide (non détection, réduction, abatement), ou microbiostatique (maintien de la concentration, stabilisation) et préciser s'il s'agit de respecter ces valeurs cibles au niveau du produit ou de l'eau de lavage ou des jus de procédé.

Dans certains cas, il est possible de suivre l'évolution microbiologique du produit par l'intermédiaire d'un indicateur d'intérêt (par exemple, formation d'acide lactique par des bactéries lactiques). Dans ce cas, la nature de l'indicateur suivi, sa pertinence au regard de l'effet recherché et la valeur cible associée doivent être indiquées et justifiées.

Certaines informations doivent être fournies par le pétitionnaire pour étayer la pertinence du choix des cibles et des seuils :

- les caractéristiques microbiologiques des aliments végétaux concernés, présentées sur la base des données de la littérature scientifique ou de l'expertise du pétitionnaire : nature et quantité des micro-organismes pouvant être présents sur les végétaux avant l'étape de traitement considérée ;
- les critères microbiologiques applicables aux produits concernés (critères réglementaires, critères de qualité définis par les professionnels notamment dans les guides de bonnes pratiques, etc.) ;
- les arguments permettant de considérer que les micro-organismes ciblés sont pertinents au regard du produit et de son procédé de traitement, en particulier en documentant:
 - les données de prévalence et niveaux de contamination ;
 - la relation entre le niveau de contamination et la durée de conservation du produit,
 - la capacité de développement / de survie de l'agent ciblé dans la matrice alimentaire et durant les étapes de traitement ;
 - l'impact de certains micro-organismes sur le procédé technologique (par exemple lors de la production de sucre : diminution du rendement, formation de biofilms colmatants, etc.).

3.3.2.4. Procédé technologique et modalités d'emploi de l'AT

• Le procédé et les opérations unitaires concernées

Le pétitionnaire doit décrire de manière détaillée le processus industriel dans lequel s'inscrit l'utilisation de l'AT afin de justifier son utilité. Si des diagrammes de fabrication existent, ils doivent être décrits.

La présentation de la filière de traitement dans son ensemble doit permettre d'apprécier le devenir des denrées après application de l'AT. Les conditions de conservation du végétal après l'ensemble des étapes d'utilisation de l'AT doivent être caractérisées (conditionnement, durée, température).

- **L'utilisation de l'AT dans le procédé et les modalités de maîtrise du procédé**

Les étapes d'emploi de l'AT dans le procédé de transformation des denrées doivent être précisément identifiées et caractérisées (prélavage, lavage, refroidissement, etc.). Le nombre réel d'étapes du procédé dans lesquelles l'AT est utilisé doit être précisé.

Le dispositif de l'étape où l'AT est utilisé doit être précisé :

- traitement discontinu ou continu ;
- trempage statique ou dynamique, type d'agitation, ou aspersion sur tapis ;
- dispositif en boucle ou en circuit fermé, à renouvellement partiel ou à fond perdu, quantité d'eau à utiliser, rythme de renouvellement ;
- durée unitaire des opérations ;
- ratio eau/végétaux ;
- rendement horaire (tonnage traité).

Le pétitionnaire doit indiquer les modalités à respecter afin d'assurer la maîtrise de l'étape d'emploi de l'AT telles que:

- les modalités permettant de garantir le respect de la dose et du temps de contact prévus (protocoles à respecter, moyens de contrôle à mettre en place), conditions dans lesquelles l'eau de lavage doit être renouvelée ;
- les paramètres à surveiller afin de garantir l'activité de l'AT (par exemple, température, pH, etc.) ;
- les contrôles à réaliser pour s'assurer de la stabilité de l'AT au cours du procédé (dégradation, neutralisation, réaction avec d'autres composés chimiques) et, dans le cas contraire, mesures de maîtrise et contrôles pour garantir le maintien de sa concentration à un niveau suffisant.

3.3.3. Méthodologie

3.3.3.1. Données et essais

3.3.3.1.1. Données de la littérature et modèles de microbiologie prévisionnelle

Le pétitionnaire est invité à fournir toutes les données disponibles permettant l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne de l'AT, en particulier :

- si des données sur l'AT et les produits végétaux concernés sont disponibles et publiées dans des journaux scientifiques (revues à comité de lecture) ou si l'AT et les produits végétaux concernés ont déjà été évalués dans un autre État membre de l'UE, une synthèse des données disponibles doit être effectuée. Il est attendu que les références soient répertoriées et qu'une traduction pour les publications et /ou données qui ne sont disponibles ni en français, ni en anglais soit fournie. Le pétitionnaire doit justifier la pertinence des publications sélectionnées par rapport à l'objectif ciblé. Le dossier doit comporter les informations ayant permis de sélectionner les conditions d'essais (concentrations, durée de contact, pH, température, qualité de l'eau, etc.) pour répondre aux objectifs finaux de l'utilisation de l'AT ;
- si des modèles de microbiologie prévisionnelle ont été utilisés, le pétitionnaire doit justifier leur pertinence au regard de l'objectif ciblé. Le dossier doit présenter les simulations permettant de définir les conditions d'essai (notamment la concentration, la durée de contact, le pH et la température) pour répondre aux objectifs de l'étude. Les modèles mathématiques doivent être utilisés dans leur domaine de validité.

La collecte de données issues de la littérature ainsi que l'utilisation des approches de microbiologie prévisionnelle peuvent représenter une démarche complémentaire permettant de consolider la démonstration. Une validation de l'efficacité de l'AT pour la matrice alimentaire concernée, sur l'agent microbien ciblé et dans les conditions de mise en œuvre de l'AT prévues par le pétitionnaire est nécessaire.

3.3.3.1.2. Essais réalisés en conditions maîtrisées (échelles laboratoire et pilote)

Les essais réalisés en conditions « maîtrisées » correspondent :

- à des essais réalisés en laboratoire, consistant à étudier l'effet de l'AT sur les micro-organismes cibles sur/dans la matrice végétale étudiée ;
- à des essais à l'échelle pilote, c'est-à-dire la reproduction à une échelle réduite du procédé industriel. Cette dernière approche est à favoriser par rapport à une échelle laboratoire. Si le dossier ne comporte que des essais à l'échelle laboratoire, le choix doit être argumenté.

Les conditions de réalisation des essais⁸ doivent reproduire le plus fidèlement possible celles du procédé industriel. En particulier, si le procédé industriel est continu, les essais en conditions pilotes doivent être réalisés également en continu sur une durée représentative pour évaluer l'impact de l'utilisation de l'AT sur l'aliment et le procédé lui-même.

Pour l'utilisation de l'AT aux étapes de lavage/ refroidissement, un dossier ne comprenant que des données relatives aux eaux de procédé sera considéré comme non recevable. Les analyses microbiologiques doivent porter impérativement sur :

- les végétaux traités, puisque la qualité microbiologique des végétaux mis sur le marché doit être maîtrisée ;
- les eaux de lavage dans lesquelles l'AT est utilisé.

Pour l'utilisation de l'AT aux étapes de transformation de produits intermédiaires dans des processus complexes, les analyses doivent porter impérativement sur ces produits (par exemple les jus de procédé tel que le « jus vert » en filière sucrerie).

Lorsqu'il est techniquement impossible de procéder à un essai en conditions pilotes, l'instruction de la demande peut être réalisée en deux phases successives :

▶ (i) Évaluation des résultats des essais en laboratoire

Un premier dossier comprenant les résultats des essais en laboratoire (pouvant intégrer des données issues de la littérature et/ou de modèles de microbiologie prévisionnelle) est soumis pour évaluation par l'Anses. Le choix des conditions d'essai en laboratoire doit être justifié en fonction des conditions d'utilisation industrielle et des objectifs de l'étude. La méthodologie employée sera détaillée (contamination artificielle, naturelle, niveau de contamination, méthode de suivi, etc.). Les résultats des essais seront présentés (cf. partie 3.3.4 présentation des résultats).

Cette étape constitue un préalable indispensable lorsque les cibles microbiennes ne peuvent être évaluées directement pendant les essais en conditions industrielles d'utilisation. Elle permet d'apprécier l'opportunité de réaliser les essais industriels.

▶ (ii) Instruction finale

Présentation des résultats des essais en conditions réelles d'utilisation, à l'échelle industrielle⁹.

Dans tous les cas, les conditions des essais (concentration, durée de contact, température, pH) doivent se rapprocher autant que possible des conditions d'utilisation prévues. Des données doivent être

⁸ Les aliments traités avec l'AT lors des essais en laboratoire et / ou en conditions pilotes ne sont pas destinés à être consommés.

⁹ Les aliments obtenus à l'échelle industrielle sans dossier préalable démontrant l'innocuité de l'AT ne sont pas destinés à être consommés.

fournies permettant de démontrer que les points clés du protocole d'emploi de l'AT ont été respectés (voir parties 3.3.2.4. *Procédé technologique et modalités d'emploi* de l'AT et 3.3.3.2. *Plan d'échantillonnage et traitements statistiques*).

- **Recours à une contamination artificielle du produit**

Dans le cadre d'essais impliquant une contamination artificielle du produit, le dossier comportera les informations relatives aux actions suivantes :

- sélection des souches microbiennes (privilégier les souches isolées de la denrée alimentaire considérée) et/ou de leurs substituts (surrogate)¹⁰ ;
- conservation des souches ;
- préparation de l'inoculum ;
- mode de contamination ;
- suivi de l'implantation des souches.

L'état physiologique des micro-organismes doit être adapté aux objectifs de l'étude (e.g. cas du « scénario du pire » ou adapté à des conditions reproduisant les conditions industrielles).

L'annexe 3 présente quelques exemples pratiques relatifs aux étapes de contamination artificielle, au taux d'inoculum / substitut ou encore au mode de contamination des végétaux.

3.3.3.1.3. Essais réalisés à l'échelle industrielle

La détermination des conditions de réalisation des essais industriels¹¹ doit bénéficier de résultats préalablement obtenus à l'échelle pilote ou laboratoire (concentration, temps de séjour etc.).

Les conditions de réalisation de ces essais (durée de contact, température, pH, qualité de l'eau, etc.) doivent permettre de reproduire les conditions réelles d'utilisation prévues.

Les lignes industrielles utilisées pour les essais sont également utilisées pour produire des aliments destinés à la consommation humaine, de sorte qu'il n'est pas envisageable de réaliser ces essais avec des denrées inoculées artificiellement avec des agents pathogènes. Si le procédé le permet, des micro-organismes cibles ou substituts non pathogènes pour l'humain peuvent être inoculés et suivis (voir détails dans la partie 3.3.3.1.2.). De manière plus habituelle, les essais à l'échelle industrielle sont réalisés sur la matrice végétale « naturellement » contaminée. Les essais considéreront la situation critique (scénario du pire) d'un point de vue de l'efficacité antimicrobienne, incluant donc une charge microbienne importante. La définition de la situation critique sera justifiée à travers des données quantitatives issues notamment d'autocontrôles ou bibliographiques concernant la même matrice alimentaire. Dans tous les cas, le choix des paramètres suivis au cours de ces essais doit être justifié.

Les produits concernés par ces essais industriels doivent faire l'objet obligatoirement :

- d'un suivi de leur qualité microbiologique au cours du traitement par l'AT permettant d'évaluer l'effet de l'AT par comparaison à un témoin (voir 3.3.3.2. *Plan d'échantillonnage et traitements statistiques*) ;
- d'analyses permettant de vérifier la conformité des produits finis aux critères microbiologiques réglementaires, lorsqu'ils existent.

3.3.3.2. Plan d'échantillonnage et traitements statistiques

La structure de l'étude menée pour montrer l'efficacité antimicrobienne de l'AT revendiquée sur les différentes cibles microbiologiques dépend de l'effet attendu de cet AT par rapport à un témoin suivi dans les mêmes conditions de procédé (voir définition au 3.3.3.2.1.). Le type d'étude et le choix des méthodes statistiques de traitement des données collectées doivent être adaptés à l'effet attendu de l'AT (voir tableau 2).

¹⁰ Substitut ou surrogate : généralement, agent non pathogène ayant une capacité démontrée de survie similaire ou supérieure à celle du micro-organisme cible, dans la matrice et dans les conditions de transformation étudiées.

Tableau 2 - Types d'études à mener selon l'effet attendu d'un nouvel auxiliaire technologique par rapport à un témoin.

Effet attendu du nouvel auxiliaire technologique proposé	Type d'étude à mener
l'AT est plus efficace que le témoin	étude en supériorité
l'AT est aussi efficace que le témoin (ni plus, ni moins)	étude en équivalence
l'AT est au moins aussi efficace que le témoin	étude en non-infériorité

De plus, le plan d'échantillonnage doit tenir compte de l'amplitude de l'effet attendu, du nombre d'échantillons nécessaires, des sources de variabilité et d'incertitude, et de la puissance statistique. Ces éléments sont indispensables pour la réalisation de traitements statistiques dans le cadre d'une démonstration de l'efficacité antimicrobienne d'un AT, et sont présentés dans les parties ci-dessous (parties 3.3.3.2.1. *Témoins* à 3.3.3.2.4. *Méthodes de l'exploration statistique des données collectées*) et schématisés dans la figure 1.

Les tests statistiques à utiliser dépendent notamment de la nature des données étudiées (quantitatives, qualitatives, booléennes, etc.), des modalités d'appariement ou non des données, de l'indépendance des variables, de la loi de distribution des variables, du nombre de variables testées simultanément.

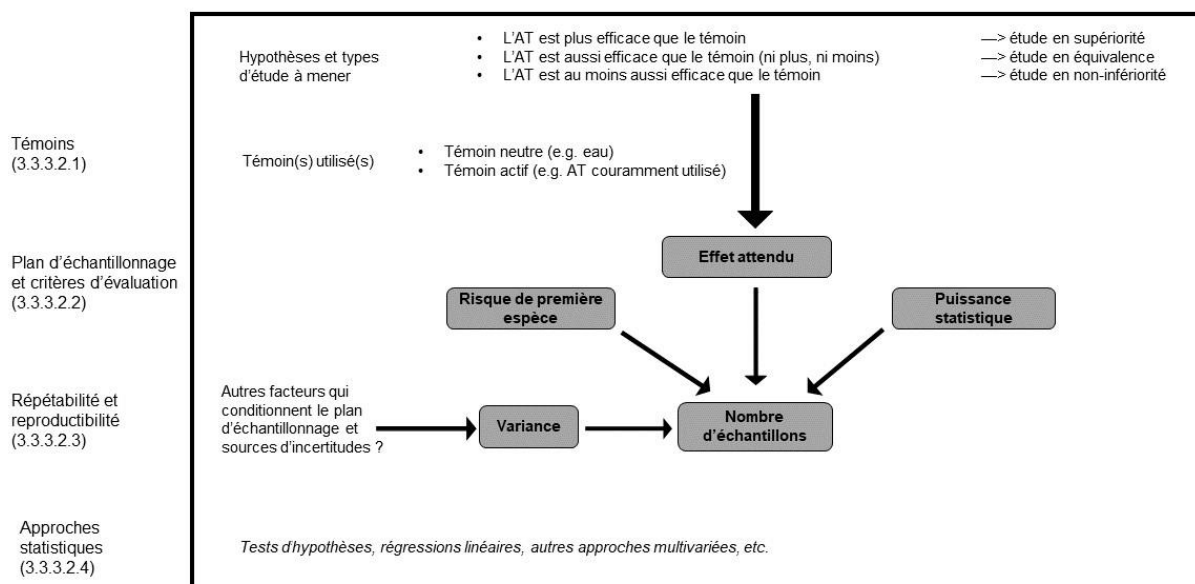


Figure 1 : Illustration de la démarche globale pour la réalisation des traitements statistiques permettant de montrer l'efficacité antimicrobienne d'un auxiliaire technologique.

3.3.3.2.1. Témoins

La comparaison du nouvel AT à un témoin est nécessaire pour démontrer l'efficacité antimicrobienne revendiquée.

Selon le cas, ce témoin peut être :

- un témoin neutre tel que l'eau, c'est-à-dire un milieu dépourvu d'activité antimicrobienne vis-à-vis des agents ciblés (parfois appelé témoin absolu) ;
- un témoin actif tel qu'un AT déjà autorisé (appelé ci-après « témoin actif de référence », voir l'arrêté du 19 octobre 2006).

Les hypothèses à mettre en évidence pour démontrer l'efficacité revendiquée du nouvel AT peuvent être différentes :

(i) Dans le cas d'une comparaison par rapport à un témoin neutre : une différence significative entre l'utilisation du nouvel AT et du témoin neutre permet de montrer l'efficacité de l'AT dans l'absolu. Si le procédé est rigoureusement identique, l'effet mécanique¹² peut être alors considéré comme identique pour le produit témoin et pour la denrée traitée avec l'AT ;

(ii) Dans le cas d'une comparaison à un témoin actif de référence : la similitude ou la différence d'efficacité du nouvel AT en conditions d'utilisations similaires est évaluée (le témoin actif doit alors être un AT couramment utilisé dans la filière concernée).

Plus précisément, la mise en évidence de l'efficacité revendiquée peut être faite par la démonstration :

- 1) de non-infériorité entre les effets des deux AT, c'est-à-dire que le nouvel AT est au moins aussi efficace que l'AT de référence mais qu'il n'est pas possible de conclure à la stricte équivalence ;
- 2) de stricte équivalence entre les deux AT ;
- 3) que le nouvel AT est significativement plus efficace que l'AT de référence.

La nature du témoin ne change pas la méthode d'étude qui dépend uniquement de l'objectif et de l'effet qu'on cherche à mesurer. Il est important de noter que les méthodes statistiques usuelles sont conçues pour mettre en évidence une différence ; par conséquent, les essais en équivalence et non-infériorité nécessitent plus d'échantillons (voir Annexe 4).

Dans les deux cas, essais avec témoin neutre et témoin actif de référence, est inclus l'effet intrinsèque mécanique du procédé.

Il est fortement recommandé d'effectuer la comparaison avec les deux témoins, témoin neutre et témoin actif de référence.

Pour une analyse statistique robuste, le nombre d'échantillons est dépendant de l'amplitude attendue de l'effet du l'AT, c'est-à-dire la différence attendue entre l'utilisation de l'AT et le témoin. Le nombre d'échantillons doit être augmenté si la différence attendue est faible (voir paragraphe 3.3.3.2.2).

Une attention particulière doit être portée à ce que les essais sur les témoins reposent sur exactement les mêmes opérations unitaires et les mêmes conditions expérimentales que lors de l'emploi du nouvel AT. Si l'utilisation de ce dernier implique une modification du procédé (par exemple l'ajout d'une étape de rinçage après utilisation de l'AT), alors les essais témoins devront inclure cette même étape.

3.3.3.2.2. Plan d'échantillonnage et critères d'évaluation

La collecte des données expérimentales doit être réalisée selon un plan d'expériences adapté à l'échelle d'analyse et aux hypothèses à tester (Tableau 2).

L'établissement de ce plan, notamment en termes de points d'échantillonnage au cours du procédé et du nombre d'échantillons nécessaires pour mettre en évidence l'efficacité revendiquée, doit être justifié et prendre en compte :

- l'amplitude de l'effet attendu ;
- le risque statistique de première espèce fixé *a priori* (noté α), ici, la probabilité de conclure que l'AT est efficace alors qu'il ne l'est pas ;
- la puissance de l'approche statistique visée (noté $1 - \beta$), ici, la capacité de l'approche à détecter les faibles amplitudes de l'effet de l'AT ;

¹² Effet mécanique : décrochage des micro-organismes lié au procédé, à la pression exercée par l'eau de lavage, du brassage des végétaux

- la variance des mesures (incertitudes analytiques et sources de variabilité telles que les cibles microbiennes ou les matrices alimentaires végétales cibles, cf. partie 3.3.2. *Présentation de l'auxiliaire technologique, des matrices végétales, des cibles microbiennes et du procédé technologique*).

D'autres facteurs peuvent modifier le procédé et impacter l'efficacité de l'auxiliaire technologique pendant les essais. Ils doivent être également pris en compte, par exemple la modification des ratios de la réutilisation d'eau ou de la durée du procédé. Ces facteurs conditionnent la définition spatio-temporelle des différents points d'échantillonnage.

Suivant l'objectif visé et la nature du procédé, les points d'échantillonnage diffèrent d'une situation à une autre :

- produit végétal soumis à DLC : *a minima*, avant traitement, après traitement et à la DLC estimée du produit. Il importe de garantir que l'emploi de l'AT ne crée pas de conditions favorables au développement ultérieur des micro-organismes dans le produit au cours de la phase de conservation normale du produit ;
- jus de procédé : cinétique à différents points dans l'étape d'opération unitaire (e.g. filière sucrière, distillerie) ;
- eau de lavage : *a minima*, avant, pendant et après traitement, en cours de recyclage (cinétique).

Pour chaque point d'échantillonnage, des outils existent et sont disponibles pour la définition du nombre d'échantillons nécessaires en fonction de l'objectif visé.

L'annexe 4.1 « *Démarche globale pour l'élaboration de la structure de l'étude à mener* » illustre ces éléments en détail.

3.3.3.2.3. Répétabilité et reproductibilité

Le plan d'échantillonnage réalisé doit prendre en compte d'autres facteurs qui peuvent influencer le nombre d'échantillons nécessaires à analyser et qui permettent de représenter les différentes sources potentielles de variabilité et d'incertitude connues. Dans la démarche de définition du nombre d'échantillons conduisant à une bonne répétabilité¹³ et reproductibilité¹⁴ du test, il est important de connaître et justifier l'inclusion/exclusion de ces différentes sources de variabilité/incertitude avec différentes approches comme des études préliminaires, les données de la littérature, les connaissances du terrain ou encore les modèles mathématiques. Quelques exemples de facteurs et de sources de variabilité / incertitude sont listées ci-dessous (liste non exhaustive, voir également norme NF EN ISO 20976-2 (2022)) :

- incertitudes analytiques ;
- variabilité inter-lot¹⁵ en condition « terrain » ;
- échantillonnage intra-lot¹⁶ (plusieurs prélèvements pour un point d'échantillonnage) ;
- échantillonnage avec séries indépendantes (répétitions biologiques) et nécessité de prise en compte, à l'aide de modèles secondaires, de la variabilité des facteurs extrinsèques (matrices alimentaires, saisonnalité, température, diversité des souches, etc.) ;
- variabilité associée au procédé, par exemple avec une réutilisation de l'eau.

¹³ La répétabilité est définie par les conditions de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent la même procédure opératoire, les mêmes opérateurs, le même système de mesure, les mêmes conditions de fonctionnement et le même lieu, ainsi que des mesurages répétés sur le même objet ou des objets similaires pendant une courte période de temps.

¹⁴ La reproductibilité est définie par les conditions de mesurage dans un ensemble de conditions qui comprennent des lieux, des opérateurs et des systèmes de mesure différents, ainsi que des mesures répétées sur le même objet ou des objets similaires.

¹⁵ La variabilité inter-lot est donnée par l'analyse de répliquats biologiques (mesures sur plusieurs lots étudiés).

¹⁶ La variabilité intra-lot est donnée par l'analyse de répliquats techniques/analytiques (plusieurs échantillons d'un même lot).

3.3.3.2.4. Méthodes de l'exploration statistique des données collectées

La démonstration de l'efficacité antimicrobienne d'un nouvel AT par rapport à un témoin doit être appuyée par une méthode statistique, tout en prenant en compte la variabilité dans les données collectées. Quelques exemples de méthodes d'exploration statistique sont donnés ci-dessous (liste non exhaustive) :

- des tests d'hypothèse adéquats (paramétriques et/ou non paramétriques) peuvent être utilisés pour comparer les statistiques descriptives qui résument les valeurs observées entre les essais témoin et utilisation de l'AT (ex. comparaison de moyennes, percentiles, médianes, quartiles, P95) (cf. annexe 4.2 « *Choix de tests statistiques et conditions d'application* » et annexe 7.1 « *Illustration - Impact des paramètres permettant de déterminer le nombre d'échantillons nécessaires dans le cadre de la démonstration avec un test de comparaison de l'efficacité de l'AT par rapport à un témoin neutre* ») ;
- la détermination de la probabilité de dépasser les valeurs seuils ciblées pour chacun des essais et des AT ;
- l'utilisation des analyses de séries temporelles, par exemple dans le cas où les mesures sont effectuées sur une longue période de plusieurs jours ou semaines (ex : données de suivi de l'acide lactique dans la filière sucrerie) ;
- démonstration de non-infériorité ou de supériorité lors de la comparaison entre deux AT (annexe 7.2 « *Illustration - Détermination du nombre d'échantillons en fonction des types d'étude à mener selon l'effet attendu d'un nouvel auxiliaire technologique par rapport à un témoin* ») ;
- approche de régression (linéaire ou non linéaire), par exemple dans le cas du suivi de la concentration bactérienne au cours du temps, ou encore la concentration bactérienne en fonction du temps de lavage (exemple d'illustration en annexe 7.3 « *Illustration : Approche comparative de modèles de régression linéaire dans le cadre de la démonstration de l'efficacité d'un AT* ») ;
- autres approches statistiques adéquates permettant d'identifier les relations entre l'ensemble des indicateurs mesurés ainsi que des paramètres considérés. Ces approches, dites « approches multivariées », peuvent présenter une grande diversité de types d'analyse dont le choix doit être justifié en fonction des objectifs et questionnements définis au préalable ainsi que d'autres conditions d'application (e.g. nature des données et des variables, nombre d'échantillons, corrélation, multi-colinéarité). En fonction de la question posée, il peut s'agir d'analyses exploratoires (e.g. permettant d'identifier les liens potentiels entre les indicateurs et paramètres) ou explicatives (e.g. permettant d'identifier les paramètres qui expliquent au mieux la différence entre les modalités).

3.3.3.3. Analyses réalisées

Les analyses microbiologiques et physico-chimiques doivent être réalisées à l'aide de méthodes normalisées lorsqu'elles existent, de méthodes reconnues au niveau international ou de méthodes alternatives validées selon des protocoles internationalement acceptés (par exemple sur la norme NF EN ISO 16140-2 (2016)).

Il est demandé que les essais soient entrepris par un laboratoire ayant en place un système d'assurance qualité, permettant de garantir la fiabilité des résultats (par exemple voir les normes NF EN ISO 7218 (2007) ou NF EN ISO/IEC 17025). Dans ces conditions, ces essais peuvent être réalisés en interne ou externalisés.

3.3.3.3.1. Analyses microbiologiques des échantillons

Les méthodes de détection ou de quantification des micro-organismes cibles sont à décrire précisément (normes utilisées, milieux de culture, temps et température d'incubation, etc.).

Afin de maîtriser le temps de contact, les propriétés antimicrobiennes de l'AT seront neutralisées avant la quantification des agents microbiens. La méthode de choix est la méthode par dilution-neutralisation¹⁷. Le neutralisant doit être validé pour l'AT soumis à l'essai et la cible microbienne.

Les analyses microbiologiques dépendent à la fois des cibles et des matrices étudiées. Elles comprennent de manière synthétique deux étapes :

- 1- la récupération des micro-organismes, sur aliment, dans l'eau ou dans les jus de procédé ;
- 2- la quantification des micro-organismes : par dénombrement en milieu solide ; par des méthodes de titrage de virus infectieux (UFP, TCID₅₀¹⁸), par une évaluation indirecte du nombre des cibles microbiennes¹⁹, par des méthodes de biologie moléculaire²⁰.

L'annexe 5 présente en particulier des recommandations concernant les méthodes pour la quantification des virus et des parasites.

3.3.3.3.2. Analyses physico-chimiques des conditions d'emploi

Les paramètres physico-chimiques permettant de valider le respect des conditions de réalisation des essais seront identifiés, surveillés et maîtrisés. La durée d'application de l'AT sur la matrice végétale (le temps de séjour) sera précisée.

A titre d'exemple, ces paramètres peuvent être :

- un suivi de la concentration en AT au cours du temps / en différents points du procédé ;
- le suivi de la température, du pH, de l'acidité dans le milieu (si pertinent) ;
- certaines caractéristiques de l'eau de lavage au cours du procédé (par exemple la concentration en matière organique).

3.3.4. Présentation des résultats des analyses

3.3.4.1. Présentation et traitement des données

Il est demandé de fournir l'ensemble des données brutes de quantification disponibles correspondant aux différents échantillons analysés (y compris les réplicats techniques/analytiques) en vue d'évaluer la variabilité / distribution observée dans les données collectées et de vérifier les tests statistiques proposés. Ainsi, en complément du dossier présentant les expérimentations, les données brutes sont à fournir dans un fichier numérique tabulé (par exemple .csv ; .tsv ; .xlsx), dont les métadonnées et légendes permettent d'identifier facilement les prélèvements concernés, afin que les données soient facilement utilisables pour procéder à leur analyse. Les données numériques présentées uniquement sous forme de graphique, d'image ou de photo ne pourront pas être prises en compte lors de l'évaluation de la demande.

Les données pourront être résumées par des statistiques descriptives (moyennes, percentiles, médianes, quartiles, P95 etc.), tout en précisant le nombre d'échantillons.

Le traitement des données appliqué doit être également tracé, notamment les étapes de nettoyage et de structuration.

Si des données sont exclues du traitement, il convient de le mentionner et de l'argumenter.

¹⁷ Si la dilution neutralisation ne fonctionne pas, la filtration sur membrane peut être utilisée pour récupérer les bactéries, levures, moisissures ou parasites.

¹⁸ UFP : Unités Formatrices de Plages de lyse. TCID₅₀ /50% *Tissue Culture Infectious Dose*.

¹⁹ Ces méthodes peuvent permettre une mesure indirecte, voire en continu de l'activité métabolique de micro-organismes (ex. modification du pH, évolution d'un composé produit par les micro-organismes). Dans ce cas, le pétitionnaire devra démontrer par la bibliographie ou par des expérimentations la pertinence et la maîtrise de la (ou des) méthode(s) choisie(s) dans le cadre de son procédé industriel, ainsi que le lien quantitatif permettant de relier l'activité métabolique à la charge microbienne.

²⁰ Des méthodes de biologie moléculaire (ex. qPCR, Integrity-PCR) peuvent être utilisées dans le cas où il n'y a pas de méthodes permettant la quantification directe des micro-organismes vivants et/ou virus infectieux.

En particulier, si des logiciels ou des codes informatiques sont utilisés, les fonctions d'analyse peuvent être partagées (sur demande).

3.3.4.2. Résultats des analyses microbiologiques à chaque point d'échantillonnage

Les résultats des analyses microbiologiques suivant le plan d'échantillonnage établi (voir 3.3.3.2) seront présentés sous forme de graphiques accompagnés des valeurs numériques (voir recommandations 3.3.4.1).

L'unité de quantification sera précisée²¹, exprimée en \log_{10} UFC.g⁻¹, \log_{10} UFC.mL⁻¹, \log_{10} UFC.cm⁻² pour les bactéries/levures/moisissures, en nombre de parasites (oocystes ou kystes ou œufs).g⁻¹ ou .mL⁻¹, en UFP ou équivalent TCID₅₀. g⁻¹ ou mL⁻¹ pour les virus²².

La démonstration de l'efficacité antimicrobienne par les traitements statistiques comparant les différentes modalités (essais avec témoins et AT) doit être effectuée selon les éléments méthodologiques décrits en 3.3.3.2.4. « *Méthodes de l'exploration statistique des données collectées* » (et illustrés dans les annexes 4 et 7).

Les données brutes peuvent être transformées avant le traitement statistique pour répondre à des objectifs particuliers (tel que le calcul d'un potentiel d'inactivation, le tracé d'une cinétique d'inactivation, ou le calcul d'un potentiel de croissance après le traitement) (voir définition dans l'annexe 6).

3.3.4.3. Résultats des analyses microbiologiques indirectes à chaque point d'échantillonnage

Si des méthodes indirectes de quantification des micro-organismes telles que celles basées sur l'évolution de leurs activités métaboliques (production acide lactique, consommation d'un glucide, évolution du pH) sont utilisées, le pétitionnaire doit fournir les résultats permettant de relier l'activité métabolique à la charge microbienne (telle qu'exprimée dans la partie 3.3.4.2).

Les résultats des analyses microbiologiques indirectes pourront être présentés sous forme de graphique, accompagnés des valeurs numériques (voir partie 3.3.4.1).

La démonstration de l'efficacité antimicrobienne par les traitements statistiques comparant les différentes modalités (essais avec témoins et AT) doit être effectuée selon les éléments méthodologiques décrits dans la partie 3.3.3.2.4 « *Méthodes de l'exploration statistique des données collectées* » (et illustrés dans les annexes 4 et 7).

3.3.4.4. Résultats de la surveillance des conditions de traitement pendant l'étude

Les paramètres physico chimiques permettant de valider la maîtrise de la réalisation des essais (définis dans la partie 3.3.2.4) pourront être présentés sous forme de graphique, accompagné des valeurs numériques (voir 3.3.4.1).

Ces données pourront faire l'objet de traitements statistiques tels que proposés dans la partie 3.3.3.2.4).

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DU GT LEAF ET DU CES BIORISK

Le présent avis complète les lignes directrices et les données requises dans la note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 (saisine n° 2017-SA-0149). En particulier, les présentes lignes directrices ont été conçues pour préciser les informations nécessaires à la préparation du dossier

²¹ Si la quantification est basée sur des méthodes alternatives et/ou de biologie moléculaire, les hypothèses d'équivalence en micro-organismes vivants ou virus infectieux devront être précisées.

²² UFC : unité formant colonie. UFP : unité formant plages de lyse. Pour les moisissures, les unités « UFT » (unité formant thalle) peuvent également être utilisées : \log_{10} UFT.g⁻¹, \log_{10} UFT.mL⁻¹ ou \log_{10} UFT.cm².

de demande d'évaluation de l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires technologiques (AT) utilisés comme agents de décontamination des végétaux permettant leur évaluation par l'Anses. Cette liste n'est pas exhaustive, et le pétitionnaire pourra apporter toute donnée supplémentaire qui lui paraîtra utile pour justifier sa demande. Les préconisations figurant dans le présent avis de l'Anses ont vocation à être mentionnées par le gestionnaire dans un document à valeur réglementaire. Le GT LEAF propose également en annexe de cet avis des recommandations pour aider à la constitution de ces dossiers de demande.

Le GT LEAF rappelle que l'usage des AT ne peut se substituer aux bonnes pratiques agricoles lors de la production, ni aux bonnes pratiques d'hygiène lors de la transformation des végétaux. L'usage nécessite de se conformer aux conditions d'applications spécifiées, par exemple la concentration maximale et la nécessité d'assurer un rinçage après l'application.

Les travaux d'expertise menés par l'Anses ces dix dernières années mettent en évidence plusieurs axes d'amélioration, tant au niveau de la réglementation relative à l'emploi des AT, que de la qualité des dossiers visant à démontrer l'efficacité antimicrobienne d'une solution ou d'une substance ajoutée au cours du processus de transformation des denrées végétales et faisant l'objet d'une demande d'autorisation d'emploi en tant qu'AT.

Au niveau de la réglementation, et des autorisations des substances en tant qu'AT, l'arrêté du 19 octobre 2006 autorise des AT classés dans les catégories définies dans l'annexe du décret n° 2011-509. Ces catégories reflètent le rôle technologique que l'AT assure. La présente expertise soulève que :

- dans la catégorie « *divers* », se trouvent certaines substances ayant un rôle équivalent à celui des « agents de décontamination des produits d'origine végétale » qui devraient être reclassées dans les deux catégories décrites ci-dessous (par exemple, les solutions à base d'extraits de houblon utilisés lors de la production du sucre (saisine n° 2003-SA-0089) ;
- la dénomination actuelle de la catégorie « *agents de décontamination des produits d'origine végétale* » regroupe les substances visant principalement deux rôles technologiques distincts: i) la prévention de la contamination microbienne des végétaux en maîtrisant la qualité des eaux de lavage et/ou des jus de procédé, ou ii) la réduction/diminution de la contamination des végétaux. Cette dénomination devrait être revue pour distinguer explicitement ces deux rôles.

De plus, l'arrêté du 19 octobre 2006 n'indique que de manière très sommaire les conditions d'emploi des AT autorisés. Il serait nécessaire de détailler les modalités à respecter (notamment les paramètres à maîtriser) pour garantir que l'AT présente l'effet et l'innocuité pour lequel il a été évalué.

Pour la constitution des dossiers, le GT LEAF attire particulièrement l'attention des pétitionnaires sur :

- la définition des objectifs de l'utilisation de l'AT ;
- l'identification et la justification des cibles microbiennes ;
- la description précise du procédé dans lequel l'AT est utilisé ;
- l'importance de l'élaboration d'un plan d'échantillonnage pertinent, associé à des méthodes statistiques adaptées ;
- l'importance de la nature des échantillons à analyser en fonction de l'objectif visé (végétaux, eaux, jus de procédé, etc.) ;
- l'utilisation de méthodes analytiques reconnues, par des laboratoires ayant en place un système d'assurance qualité, permettant de garantir la fiabilité des résultats ;
- la mise à disposition de l'ensemble des données et la présentation des résultats permettant de démontrer l'efficacité antimicrobienne de l'AT.

De manière globale, le GT LEAF et le CES BIORISK rappellent que les populations microbiennes évoluent pendant la durée de vie du produit, et en particulier pour les denrées d'origine végétale très périssables conservées au froid positif et faisant donc l'objet d'une DLC (date limite de consommation). Il conviendra de tenir compte des conséquences de l'emploi de l'AT sur l'évolution des populations de

micro-organismes utilisés pour fixer cette date et de réévaluer la durée de vie des produits en conséquence.

Le GT LEAF souligne que dans la filière des denrées végétales et d'origine végétale (DVOV), l'utilisation d'AT peut être une mesure de maîtrise nécessaire. Des changements récents dans les pratiques culturales (ex. irrigation des végétaux avec des eaux usées traitées), ou des procédés lors de la transformation (ex. réutilisation accrue de l'eau au cours du processus) nécessitent de fait une nouvelle analyse des dangers et une vérification que l'emploi de l'AT demeure une mesure de maîtrise adaptée. Le CES BIORISK attire l'attention des pétitionnaires sur le besoin d'explorer des résistances potentielles, directes ou croisées, que pourrait générer l'utilisation d'un AT vis-à-vis d'un autre stress ou d'un autre agent antimicrobien.

Au regard du rôle déterminant des essais industriels pour l'acquisition de données relatives à la démonstration de l'efficacité de l'AT et des contraintes techniques, économiques et environnementales dans leur réalisation, le GT LEAF et le CES BIORISK encouragent :

- à ce que les protocoles des essais soient soumis et évalués au préalable par le gestionnaire, avec, si besoin, une sollicitation de l'Anses comme appui ;
- dans les cas où l'innocuité de l'AT est démontrée en amont et que les données instruites en première intention démontrent l'efficacité antimicrobienne à l'échelle du laboratoire et/ou pilote, à permettre des autorisations temporaires d'utilisation de l'AT (pouvant aller jusqu'à une année) ayant pour objectif l'acquisition de données complémentaires robustes pour démontrer l'efficacité antimicrobienne. Pendant ces essais, le pétitionnaire doit s'assurer que les DVOV soient saines pour la consommation, en vérifiant que les risques microbiologiques et chimiques sont maîtrisés, notamment en augmentant la fréquence des auto-contrôles.

Le GT LEAF et le CES BIORISK identifient plusieurs perspectives de recherche dans le domaine des AT à effet antimicrobien :

- en termes de méthodologie pour la détection, l'identification et la quantification des virus et des parasites, le développement de nouvelles méthodes pourrait permettre une meilleure évaluation de l'efficacité antimicrobienne des AT ;
- au vu du peu de disponibilité d'AT efficaces au regard des applications, il est nécessaire d'identifier et d'évaluer de nouvelles substances qui pourraient répondre aux objectifs technologiques antimicrobiens ;
- l'exploration des résistances que pourrait générer l'utilisation d'un AT vis-à-vis d'un autre stress ou d'un autre agent antimicrobien ;
- dans une démarche d'évaluation globale, l'utilisation d'un AT devrait prendre en compte à la fois les modifications des communautés microbiennes des végétaux au cours, et post transformations, mais également l'impact plus global sur le microbiote digestif humain lors de la consommation des végétaux.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

Dans le contexte réglementaire des auxiliaires technologiques pour l'alimentation soumis à autorisation, selon les termes du décret n° 2011-509 du 10 mai 2011, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie pour élaborer, en remplacement d'un document de l'Afssa datant de 2005, un document venant préciser le volet « démonstration de l'efficacité » des lignes directrices figurant dans l'arrêté du 7 mars 2011.

Le présent avis complète la note d'appui scientifique et technique de l'Anses du 5 octobre 2018 pour la constitution des dossiers pour tous les auxiliaires technologiques, en vue de démontrer l'innocuité de la substance utilisée.

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

L'Anses rappelle que l'utilisation de substances ou de mélanges chimiques en tant qu'auxiliaire technologique pour maîtriser la qualité microbiologique lors de la fabrication des denrées alimentaires est principalement conditionnée par l'évaluation de leur innocuité, ainsi que de la sécurité de l'emploi par les opérateurs.

Afin d'assurer une évaluation robuste de l'efficacité antimicrobienne de l'auxiliaire technologique, les protocoles d'essais jouent un rôle déterminant. L'Agence souligne la possibilité qu'ils puissent être soumis au préalable à l'autorité compétente, qui pourra solliciter en tant que de besoin l'appui de l'Anses.

L'application de mesures préventives telles que les bonnes pratiques agricoles et les bonnes pratiques d'hygiène au cours de la production primaire et des activités post-récolte restent des moyens efficaces de réduire le risque de contamination par des agents pathogènes humains dans tous végétaux cultivés. Un système basé sur l'analyse des risques et la maîtrise des points critiques (HACCP) prévient la contamination microbiologique, réduit la contamination croisée et réduit le risque de contamination par des agents pathogènes.

Enfin, l'Anses rappelle que la question des dangers microbiologiques dans les denrées végétales et d'origine végétale est une préoccupation forte des instances traitant des risques alimentaires au niveau international (cf. les travaux récents de la [FAO & OMS²³](#) et de l'[EFSA²⁴](#)). Alors que les préparations enzymatiques font l'objet d'un cadre réglementaire européen, ce n'est pas le cas des auxiliaires technologiques chimiques. Aussi, l'évaluation sanitaire des auxiliaires technologiques gagnerait à être harmonisée au niveau européen dans un objectif de protection du consommateur.

Pr Benoit Vallet

²³ *Prevention and control of microbiological hazards in fresh fruits and vegetables Part 4: Specific commodities*
<https://www.fao.org/3/cc7460en/cc7460en.pdf>

²⁴ *Microbiological hazards associated with the use of water in the post-harvest handling and processing operations of fresh and frozen fruits, vegetables and herbs*

MOTS-CLÉS

Lignes directrices, Auxiliaire technologique, Efficacité antimicrobienne, Végétaux
Guidelines, Processing aid, Antimicrobial efficacy, Vegetables

BIBLIOGRAPHIE

- Afssa. 2003. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'emploi d'un extrait de houblon en tant qu'auxiliaire technologique en sucrerie (saisine n° 2003-SA-0089). Afssa (Maisons-Alfort)
- Afssa. 2005. Recommandations pour la présentation des données permettant d'évaluer l'efficacité des antimicrobiens appliqués sur, ou incorporés dans, les aliments - Mai 2005. Afssa (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2003sa0363.pdf>
- Afssa. 2010. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à l'autorisation d'emploi d'une solution à base d'acide peracétique pour la décontamination microbiologique des farines dans le procédé de meunerie du blé, en tant qu'auxiliaire technologique, à la suite de l'avis Afssa du 1er mars 2006 (saisine n° 2010-SA-0013). Afssa (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT2010sa0013.pdf>.
- Anses. 2011. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'autorisation d'emploi d'un extrait de houblon en tant qu'auxiliaire technologique pour la production de levure (saisine n° 2011-SA-0221). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT2011sa0221.pdf>
- Anses. 2012a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une solution stabilisée de chlorite de sodium en tant qu'auxiliaire technologique pour la fabrication d'alcool de bouche (saisine n° 2012-SA-0014). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT2012sa0014.pdf>
- Anses. 2012b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'extension d'autorisation d'emploi de deux solutions : l'une d'acide peracétique, d'acide acétique et de peroxyde d'hydrogène et l'autre de peroxyde d'hydrogène seul, pour la maîtrise de la qualité microbiologique en amidonnerie - féculerie (saisine n° 2011-SA-0142). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/AAAT2011sa0142.pdf>
- Anses. 2012c. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi de l'hypochlorite de sodium comme auxiliaire technologique dans la production de végétaux frais prêts à l'emploi (saisine n° 2012-SA-0158). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2012sa0158.pdf>
- Anses. 2013a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la demande d'extension d'autorisation d'emploi du formol en sucrerie en tant qu'auxiliaire technologique (saisine n° 2013-SA-0107). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2013sa0107.pdf>
- Anses. 2013b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'essais de monochloramine comme auxiliaire technologique en sucrerie pour la décontamination des jus de betterave (saisine n° 2012-SA-0232). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2012sa0232.pdf>
- Anses. 2013c. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux compléments d'information concernant une demande d'autorisation d'essais industriels de monochloramine comme auxiliaire technologique en sucrerie pour la décontamination des jus de betterave (saisine n° 2013-SA-0091). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2013sa0091.pdf>
- Anses. 2014a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi en tant qu'auxiliaire technologique d'une solution à base d'acide peracétique pour le lavage des légumes destinés à l'appertisation (saisine n°2014-SA-0021). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2014sa0021.pdf>
- Anses. 2014b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'essais industriels de monochloramine comme auxiliaire

- technologique en amidonnerie (saisine n°2014-SA-0108). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2014sa0108.pdf>
- Anses. 2014c. Extrait de l'avis du 4 mars 2014 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi en tant qu'auxiliaire technologique d'une solution à base d'acide peracétique en amidonnerie (saisine n° 2013-SA-0193). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2013sa0193.pdf>
- Anses. 2015a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à des résultats d'essais industriels pour tester l'efficacité d'une solution de chlorite de sodium en tant qu'auxiliaire technologique pour la fabrication d'alcool de bouche (saisine n°2014-SA-0221). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2014sa0221.pdf>
- Anses. 2015b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'extension d'autorisation d'emploi du monensin de sodium comme auxiliaire technologique pour la fabrication de l'alcool éthylique d'origine agricole. (saisine n°2015-SA-0081). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2015sa0081.pdf>
- Anses. 2016a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'avis relatif à une demande d'extension d'autorisation d'emploi d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, lors du lavage des poireaux destinés à la surgélation (saisine n°2016-SA-0055). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2016SA0055.pdf>
- Anses. 2016b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande de modification de la teneur maximale acceptable en résidus des composés organo-halogénés adsorbables (AOX) dans les végétaux de 4ème gamme, soumis à un lavage par de l'eau contenant du chlore en tant qu'auxiliaire technologique autorisé dans la réglementation française. (saisine n°2015-SA-0165). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2015SA0165.pdf>
- Anses. 2017a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à demande d'autorisation d'emploi d'une solution de monochloramine, en tant qu'auxiliaire technologique, en amidonnerie (saisine n°2017-SA-0006). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2017SA0006.pdf>
- Anses. 2017b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une solution de monochloramine, en tant qu'auxiliaire technologique, en sucrerie.(saisine n°2017-SA-0007). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2017SA0007.pdf>
- Anses. 2017c. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'extension d'autorisation d'emploi d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage des herbes aromatiques destinées à la surgélation. (saisine n° 2015-SA-0245). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2015SA0245.pdf>
- Anses. 2017d. Extrait de l'avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une autorisation d'emploi d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage de légumes destinés à la déshydratation (saisine n°2017-SA-0146). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2017SA0146.pdf>
- Anses. 2018a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi de monochloramine comme auxiliaire technologique, pour la production de fécule et de fécule modifiée de pommes de terre en féculerie. (saisine n°2018-SA-0128). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2018SA0128.pdf>
- Anses. 2018b. Avis et rapport de l'Anses relatif à l'attribution des sources des maladies infectieuses d'origine alimentaires (saisine n° 2015-SA-0162). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2015SA0162Ra-2.pdf>
- Anses. 2018c. Note d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relative aux « règles de constitution des dossiers de demande d'autorisation d'auxiliaires technologiques et l'acceptation des calculs théoriques en lien avec l'évaluation de l'exposition » (saisine n° 2017-SA-0149). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2017SA0149.pdf>
- Anses. 2019. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'extension d'utilisation de l'ozone dans l'eau, en tant qu'auxiliaire

- technologique, pour le lavage des salades prêtes à l'emploi (dites de 4ème gamme) (saisine n°2019-SA-0119). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2019SA0119.pdf>
- Anses. 2020a. Avis et rapport de l'Anses relatif à la hiérarchisation des dangers biologiques et chimiques dans le but d'optimiser la sécurité sanitaire des aliments (saisine n° 2016-SA-0153). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0153Ra.pdf>
- Anses. 2020b. Extrait de l'avis du 25 novembre 2020 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'extension d'emploi de colophane comme agent de décontamination des produits d'origine végétale, pour emploi en sucrerie (saisine n°2020-SA-0061). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2020SA0061.pdf>
- Anses. 2020c. Extrait de l'avis du 09 janvier 2020 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'extension d'emploi d'une solution à base d'acide peracétique (APA), en tant qu'auxiliaire technologique, dans l'eau de lavage des salades prêtes à l'emploi (dites de 4ème gamme), à une concentration maximale de 100 mg/litre (saisine n°2019-SA-0154). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2019SA0154.pdf>
- Anses. 2020d. Extrait de l'avis du 27 octobre 2020 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi du diméthylthiocarbamate de sodium, en tant qu'auxiliaire technologique, en sucrerie (saisine n°2019-SA-0132). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2019SA0132.pdf>
- Anses. 2021a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une solution à base d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, dans l'eau de lavage de l'ensemble des références de végétaux crus prêts à l'emploi (dits de 4ème gamme) hormis les salades prêtes à l'emploi, à une concentration de 100 mg/litre d'eau de lavage, suivi d'un rinçage (saisine n°2021-SA-0075). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2021SA0075.pdf>
- Anses. 2021b. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'emploi d'une solution d'acide peracétique en tant qu'auxiliaire technologique pour la décontamination de fruits entiers non pelés destinés à la transformation (saisine n°2021-SA-0041). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2021SA0041.pdf>
- Anses. 2021c. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'avis relatif à l'autorisation d'essais dans des conditions industrielles d'une solution d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage avant surgélation des fruits rouges destinés à la transformation. (saisine n°2020-SA-0147). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2020SA0147.pdf>
- Anses. 2021d. Extrait de l'avis du 06 janvier 2021 de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande d'autorisation d'essais industriels concernant l'emploi de l'arginate d'éthyle laurique, en tant qu'auxiliaire technologique, comme désinfectant dans la production d'éthanol (saisine n°2019-SA-0137). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2019SA0137.pdf>
- Anses. 2022. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif aux résultats microbiologiques et biochimiques des essais industriels conduits dans le cadre d'une demande d'extension d'usage d'une solution d'acide peracétique, en tant qu'auxiliaire technologique, pour le lavage avant surgélation des fruits rouges destinés à la transformation (saisine n°2021-SA-0155). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/ESPA2021SA0155.pdf>
- Anses. 2023a. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail projet d'arrêté relatif aux conditions de production et d'utilisation des eaux usées traitées [issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines] pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts (saisine n° 2022-SA-0238). Anses (Maisons-Alfort). <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAU2022SA0238.pdf>
- Anses. 2023b. Avis relatif aux projet de décret relatif aux eaux réutilisées dans les entreprises du secteur alimentaire et portant diverses dispositions relatives à la sécurité sanitaire des eaux destinées à la consommation humaine et projet d'arrêté relatif à l'autorisation de production et d'utilisation d'eau réutilisée en vue de la préparation et de la conservation dans les entreprises alimentaires de toutes denrées et marchandises destinées à l'alimentation humaine (saisine 2023-SA-0088). Maisons-Alfort : Anses, 63 p.- Publication prochaine.

- Arrêté du 7 mars 2011. Arrêté du 7 mars 2011 relatif aux lignes directrices pour la constitution des dossiers de demande d'autorisation d'emploi d'auxiliaires technologiques en alimentation humaine.
- Arrêté du 19 octobre 2006. Arrêté du 19 octobre 2006 relatif à l'emploi d'auxiliaires technologiques dans la fabrication de certaines denrées alimentaires.
- Bouman, A. C., A. J. ten Cate-Hoek, B. L. Ramaekers et M. A. Joore. 2015. "Sample Size Estimation for Non-Inferiority Trials: Frequentist Approach versus Decision Theory Approach." *PLoS One* 10 (6): e0130531. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130531>.
- Conover W. 1999. "Practical Nonparametric Statistics" Third Edition, Wiley & Sons url: <https://www.math.ttu.edu/~wconover/book.html>
- Décret n° 2011-509. Décret n° 2011-509 du 10 mai 2011 fixant les conditions d'autorisation et d'utilisation des auxiliaires technologiques pouvant être employés dans la fabrication des denrées destinées à l'alimentation humaine.
- Directive 2009/32/CE. Directive 2009/32/CE du Parlement européen et du Conseil du 23 avril 2009 relative au rapprochement des législations des États membres concernant les solvants d'extraction utilisés dans la fabrication des denrées alimentaires et de leurs ingrédients (refonte).
- EFSA BIOHAZ Panel (EFSA Panel on Biological Hazards), Koutsoumanis, K., Ordonez, A. A., Bolton, D., Bover-Cid, S., Chemaly, M., De Cesare, A., Herman, L., Hilbert, F., Lindqvist, R., Nauta, M., Nonno, R., Peixe, L., Ru, G., Simmons, M., Skandamis, P., Suffredini, E., Banach, J., Ottoson, J., Zhou, B., da Silva Felicio, M.T., Jacxsens, L., Lourenço Martins, J., Messens, W. et Allende, A. 2023. "Microbiological hazards associated with the use of water in the post-harvest handling and processing operations of fresh and frozen fruits, vegetables and herbs (ffVHs). Part 1 (outbreak data analysis, literature review and stakeholder questionnaire)". *EFSA Journal* 21(11), 1–111. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2023.8332>
- FAO & OMS. 2022. "Summary report of the Joint FAO/WHO Expert Meeting on the Prevention and Control of Microbiological Hazards in Fresh Fruits and Vegetables (Part 4: Commodity-specific interventions) - Issued in September 2022." url: <https://www.who.int/publications/m/item/joint-fao-who-expert-meeting-on-microbiological-risk-assessment-on-the-prevention-and-control-of-microbiological-hazards-in-fresh-fruits-and-vegetables-part4>
- Fleming, T. R., K. Odem-Davis, M. D. Rothmann et Y. Li Shen. 2011. "Some essential considerations in the design and conduct of non-inferiority trials." *Clin Trials* 8 (4): 432-9. <https://doi.org/10.1177/1740774511410994>
- Flight, L. et S. A. Julious. 2022. "A practical guide to sample size calculations: Installation of the app SampSize." *Pharm Stat* 21 (5): 1109-1110. <https://doi.org/10.1002/pst.2215>
- Hayriye, Bozkurt, H. D'souza Doris et P. Michael Davidson. 2015. "Thermal Inactivation of Foodborne Enteric Viruses and Their Viral Surrogates in Foods." *Journal of Food Protection* 78 (8): 1597-1617. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-14-487>
- Herr, M., A. Descatha A. et P. Aegerter P.. 2017. "Non-inferiority and equivalence trials: methodological key points Essais de non-infériorité et d'équivalence : points clés de méthodologie." *La Revue de Médecine Interne*: Epub ahead of print. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2017.06.010>
- Julious, S. A. 2004. "Sample sizes for clinical trials with normal data." *Stat Med* 23 (12): 1921-86. <https://doi.org/10.1002/sim.1783>
- Julious, S. A. et M. J. Campbell. 2012. "Tutorial in biostatistics: sample sizes for parallel group clinical trials with binary data." *Stat Med* 31 (24): 2904-36. <https://doi.org/10.1002/sim.5381>
- Kowalska, Beata et Magdalena Szczech. 2022. "Differences in microbiological quality of leafy green vegetables." *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 29 (2): 238
- Lakens, D. 2023. "Is my study useless? Why researchers need methodological review boards." *Nature* 613 (7942): 9. <https://doi.org/10.1038/d41586-022-04504-8>
- Lung, K. R., M. A. Gorko, J. Llewelyn et N. Wiggins. 2003. "Statistical method for the determination of equivalence of automated test procedures." *J Autom Methods Manag Chem* 25 (6): 123-7. <https://doi.org/10.1155/s146392460300021x>
- Mengyi, Hu et B. Gurtler Joshua. 2017. "Selection of Surrogate Bacteria for Use in Food Safety Challenge Studies: A Review." *Journal of Food Protection* 80 (9): 1506-1536. <https://doi.org/https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-16-536>
- Norme ISO 15553. 2006. Qualité de l'eau - Isolement et identification des oocystes de *Cryptosporidium* et des kystes de *Giardia*. ISO 15553:2006.

- Norme ISO 18744. 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Recherche et dénombrement de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies. ISO 18744:2016.
- Norme NF EN ISO 7218. 2007. Microbiologie des aliments - Exigences générales et recommandations. NF EN ISO 7218.
- Norme EN ISO/IEC 17025. 2017. Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais. NF EN ISO/IEC 17025.
- Norme NF EN ISO 15216-2. 2019. Microbiologie dans la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 2 : méthode de détection. NF EN ISO 15216-2.
- Norme NF EN ISO 16140-2. 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence. NF EN ISO 16140-2.
- Norme NF EN ISO 20976-1. 2019. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologique - Partie 1 : tests de croissance pour étudier le potentiel de croissance, le temps de latence et le taux de croissance maximal. NF EN ISO 20976-1.
- Norme NF EN ISO 20976-2. 2022. Microbiologie de la chaîne alimentaire — Exigences et lignes directrices pour la réalisation des tests d'épreuve microbiologiques — Partie 2 : tests d'inactivation pour étudier le potentiel d'inactivation et les paramètres de la cinétique d'inactivation NF EN ISO 20976-2.
- Norme NF V01-002. 2021. Hygiène des aliments - Lexique de l'hygiène des aliments. NF V01-002.
- OMS. 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. : World Health Organization Geneva.
- Partyka, Melissa L et Ronald F Bond. 2022. "Wastewater reuse for irrigation of produce: a review of research, regulations, and risks." *Science of the Total Environment* 828: 154385.
- Règlement (CE) n°853/2004. Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale
- Règlement (CE) n° 178/2002. Règlement (CE) n° 178/2002 du Parlement européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires.
- Règlement (CE) n° 852/2004. Règlement (CE) n° 852/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 relatif à l'hygiène des denrées alimentaires.
- Règlement (CE) n° 1333/2008. Règlement (CE) n° 1333/2008 du Parlement européen et du Conseil du 16 décembre 2008 sur les additifs alimentaires.
- Règlement (UE) n° 1169/2011. Règlement (UE) n° 1169/2011 du Parlement européen et du Conseil du 25 octobre 2011 concernant l'information des consommateurs sur les denrées alimentaires, modifiant les règlements (CE) n° 1924/2006 et (CE) n° 1925/2006 du Parlement européen et du Conseil et abrogeant la directive 87/250/CEE de la Commission, la directive 90/496/CEE du Conseil, la directive 1999/10/CE de la Commission, la directive 2000/13/CE du Parlement européen et du Conseil, les directives 2002/67/CE et 2008/5/CE de la Commission et le règlement (CE) n° 608/2004 de la Commission.
- Règlement (UE) n° 2018/848. Règlement (UE) 2018/848 du parlement européen et du conseil du 30 mai 2018 relatif à la production biologique et à l'étiquetage des produits biologiques, et abrogeant le règlement (CE) no 834/2007 du Conseil.
- Règlement d'exécution (UE) n° 2021/1165. Règlement d'exécution (UE) 2021/1165 de la commission du 15 juillet 2021 autorisant l'utilisation de certains produits et substances dans la production biologique et établissant la liste de ces produits et substances.
- Sun, Y., X. Zhao, Y. Ma, Z. Ma, Z. He, W. Zhao, P. Wang, S. Zhao et D. Wang. 2022. "Investigation on the Microbial Diversity of Fresh-Cut Lettuce during Processing and Storage Using High Throughput Sequencing and Their Relationship with Quality." *Foods* 11 (12). <https://doi.org/10.3390/foods11121683>
- Turan, Fatma Nesrin et Mustafa Şenocak. 2007. "Evaluating "superiority", "equivalence" and "non-inferiority" in clinical trials." *Annals of Saudi Medicine* 27 (4): 284-288. <https://doi.org/doi:10.5144/0256-4947.2007.284>.

CITATION SUGGÉRÉE

Anses. (2023). Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la mise à jour des lignes directrices permettant d'évaluer l'efficacité antimicrobienne des auxiliaires technologiques utilisés comme agents de décontamination des denrées d'origine végétale. (Saisine 2022-SA-0136). Maisons-Alfort : Anses, 55 p.

ANNEXE 1 : PRESENTATION DES INTERVENANTS

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

GROUPE DE TRAVAIL (GT LEAF)

Présidente

Mme Régine TALON – INRAE – Directrice de recherche, chargée de mission. Sciences des aliments, écologie microbienne, produits fermentés, ferments, bactéries pathogènes.

Membres

M. Michel BACCAUNAUD – Retraité – Technologies de conservation et de transformation alimentaires, nouveaux procédés de fabrication, filières frais et transformées, impact des procédés sur la matrice alimentaire, réactions d'oxydation et de dégradation des aliments.

M. Frédéric BORGES – Université de Lorraine – Maître de conférences. Listeria, génie génétique, biopréservation, écosystèmes alimentaires fermentées, génotypage, phénotypage, HACCP.

M. Gilles BORNERT – Service de santé des armées de Rennes – Vétérinaire en chef. Microbiologie des aliments et des eaux, écologie microbienne, réglementation, sécurité sanitaire des aliments, HACCP, filière eau et restauration collective.

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort – Chef de service. Hygiène des aliments, épidémiologie, microbiologie des aliments, plan de maîtrise sanitaire, EDCH.

Mme Noémie DESRIAC – Université Bretagne occidentale – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, bactéries sporulées, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress, microbiologie prévisionnelle.

M. Michel GAUTIER – Institut Agro – Professeur. Microbiologie alimentaire, biologie moléculaire, OGM microbiens, bactériophages, aliments fermentés, bactéries pathogènes.

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments – Directrice de recherche. Virologie alimentaire, méthodes de détection, procédés de décontamination.

Mme Nadia OULAHAL – Université Claude-Bernard Lyon 1 – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, hygiène des aliments, interactions biomolécules antimicrobiennes - aliments, écosystème microbien alimentaire, biofilms, biopréservation.

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier – Professeur des universités. Sécurité sanitaire des aliments, microbiologie alimentaire et industrielle, mycologie, mycotoxines, écologie microbienne, technologie alimentaire, HACCP, biotechnologie, filières fruits, café et cacao.

RAPPORTEUR

Mme Aurélie BIGOT-CLIVOT – Université Reims de Champagne Ardenne – Maître de conférences. Parasites protozoaires, biologie moléculaire, méthodes de détection, écotoxicologie, bivalves

COMITÉ D'EXPERTS SPÉCIALISÉ

- CES « Évaluation des risques biologiques liés aux aliments (BIORISK) – (2022-2026)

Président

M. Philippe FRAVALO – Conservatoire National des Arts et Métiers, Professeur. Microbiologie des aliments, filières viandes, dangers bactériens, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, méthodes (dont métagénomique 16S des contenus digestifs et des surfaces, caractérisation moléculaire des dangers), élevage /abattage.

Membres

M. Frédéric AUVRAY – École nationale vétérinaire de Toulouse – Ingénieur de recherche. Microbiologie des aliments et écologie microbienne, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, bactéries pathogènes zoonotiques, microbiote, bactériophages, diagnostic microbiologique et séquençage de génomes.

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

M. Frédéric BORGES – Université de Lorraine – Maître de conférences. *Listeria*, génie génétique, biopréservation, écosystèmes alimentaires fermentées, génotypage, phénotypage, HACCP.

M. Gilles BORNERT – Service de santé des armées de Rennes – Vétérinaire en chef. Microbiologie des aliments et des eaux, écologie microbienne, réglementation, sécurité sanitaire des aliments, HACCP, filière eau et restauration collective.

M. Frédéric CARLIN (*jusqu'en mars 2023*) – INRAE – Directeur de recherche. Bactéries sporulées, *Bacillus*, *Clostridium*, effets des procédés, microbiologie prévisionnelle, produits végétaux.

Mme Catherine CHUBILLEAU – Centre hospitalier de Niort – Chef de service. Hygiène des aliments, épidémiologie, microbiologie des aliments, plan de maîtrise sanitaire, EDCH.

Mme Monika COTON – Université de Brest – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, produits fermentés, mycologie, Ecologie microbienne, métabolites secondaires (dont mycotoxines, amines biogènes, composés volatils), méthodes analytiques, biologie moléculaire.

Mme Noémie DESRIAC – Université Bretagne occidentale – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, bactéries sporulées, mécanismes d'adaptation des microorganismes au stress, microbiologie prévisionnelle.

Mme Florence DUBOIS-BRISSONNET – AgroParisTech – Professeur. Microbiologie des aliments, biofilms, mécanismes d'adaptation bactérienne au stress (dont conservateurs, désinfectants, réfrigération), biochimie membranaire, *Listeria monocytogenes*.

M. Michel FEDERIGHI – Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort – Professeur. Microbiologie des aliments, hygiène et qualité des aliments, analyse des dangers, HACCP, filières et technologies alimentaires des viandes et des produits transformés.

M. Michel GAUTIER – Institut Agro – Professeur. Microbiologie alimentaire, biologie moléculaire, OGM microbiens, bactériophages, aliments fermentés, bactéries pathogènes.

Mme Michèle GOURMELON – IFREMER – Chargée de recherche. Bactériologie et biologie moléculaire, écologie microbienne des milieux marins côtiers dont coquillages et zones conchylicoles et du continuum terre-mer, bactéries environnementales et d'intérêt sanitaire, *Campylobacter*.

Mme Sandrine GUILLOU – ONIRIS – Ingénieur de recherche. Evaluation des risques sanitaires, microbiologie et écologie microbienne des aliments, modélisation, *Campylobacter*, procédés de décontamination, méthode de détection, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux, filière volaille.

M. Stéphane GUYOT – Institut Agro Dijon – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, poudres alimentaires, pathogènes, bactéries, virus, procédés de décontamination, mécanismes d'adaptation aux stress environnementaux.

M. Didier HILAIRE – Direction générale pour l'armement – Ingénieur, adjoint innovation ouverte ; architecte décontamination et contre-mesures médicales NRBC. Toxines bactériennes et végétales, toxines botuliques, risques biologiques, décontamination et identification des agents biologiques.

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

Mme Claire LE HENAFF-LE MARREC – Bordeaux INP, INRAE – Professeur des universités. Microbiologie des aliments, écologie microbienne, bactéries lactiques, bactériophages, fermentation malo-lactique.

Mme Sandra MARTIN-LATIL – Anses, Laboratoire de sécurité des aliments – Directrice de recherche. Virologie alimentaire, méthodes de détection, procédés de décontamination.

Mme Jeanne-Marie MEMBRÉ – INRAE – Ingénieure de recherche. Appréciation quantitative du risque microbiologique, modélisation, microbiologie prévisionnelle, évaluation risque-bénéfices et multicritères, statistiques appliquées.

M. Eric OSWALD – CHU Toulouse - Université de Toulouse – Professeur des universités-Praticien hospitalier. Pathogénicité bactérienne, Toxines, *Escherichia coli*, antibiorésistance, génomique microbienne, microbiote, One *health*, infectiologie.

Mme Nadia OULAHAL – Université Claude-Bernard Lyon 1 – Maître de conférences. Microbiologie des aliments, hygiène des aliments, interactions biomolécules antimicrobiennes - aliments, écosystème microbien alimentaire, biofilms, Biopréservation.

M. Pascal PIVETEAU – INRAE – Directeur de recherche. *Listeria monocytogenes* ; écologie microbienne, écologie des bactéries pathogènes dans les agroenvironnements, systèmes alimentaires, filière végétaux.

Mme Sabine SCHORR-GALINDO – Université Montpellier – Professeur des universités. Sécurité sanitaire des aliments, microbiologie alimentaire et industrielle, mycologie, mycotoxines, écologie microbienne, technologie alimentaire, HACCP, biotechnologie, filières fruits, café et cacao.

Mme Régine TALON – INRAE – Directrice de recherche, chargée de mission. Sciences des aliments, écologie microbienne, produits fermentés, ferments, bactéries pathogènes.

Membres du CES en potentiel conflit d'intérêt qui n'ont pas participé à l'expertise

M. Georges DAUBE – Université de Liège – Professeur des universités. Microbiologie des aliments, évaluation quantitative de risques microbiologiques, HACCP, Bonnes Pratiques d'Hygiène, filière viande et lait.

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims, Université Reims Champagne-Ardenne – Professeur des universités-Praticien Hospitalier, Chef de service Hôpital Reims, Directeur du CNR de la Toxoplasmose. Evaluation des risques sanitaires, parasitologie, mycologie médicale, infectiologie clinique, épidémiologie, biologie moléculaire.

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM) sous la direction de Nathalie ARNICH (adjointe à la cheffe d'unité) et d'Hélène GAYON (cheffe d'unité).

Coordination et contribution scientifiques

Mme Estelle CHAIX, Chargée de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

Contribution scientifique

M. Laurent GUILLIER, Chef de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

M. Ngoc-Du Martin LUONG, Chargé de projets scientifiques, UERALIM, Direction de l'Évaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

M. Nicolas BOUDAUD – ACTALIA

Mme Clémence MILLET – CTCPA

Mme Stella PLANCHON – CTCPA

Mme Isabelle VILLENA – CHU Reims, Université Reims Champagne-Ardenne, Directeur du CNR de la Toxoplasmose.

M. François ZUBER – CTCPA

ORDRE DES AUTEURS SUGGÉRÉ

Régine TALON, Michel BACCAUNAUD, Frédéric BORGES, Gilles BORNERT, Catherine CHUBILLEAU, Noémie DESRIAC, Michel GAUTIER, Sandra MARTIN-LATIL, Nadia OULAHAL, Sabine SCHORR-GALINDO, Aurélie BIGOT-CLIVOT, Laurent GUILLIER, Ngoc-Du Martin LUONG, Estelle CHAIX

ANNEXE 2 : TRAME DE DOSSIER

Le GT LEAF et le CES BIORISK recommandent que le dossier fasse mention explicitement des éléments suivants :

1. Contexte et finalité

Le traitement a-t-il pour finalité ? (plusieurs finalités peuvent être indiquées) :	Cibles microbiennes ²⁵ (répondre pour chaque famille/espèce, préciser si les cibles font l'objet d'un critère réglementaire)		
	effet global, sur la charge microbienne totale	effet ciblé sur un/des agent(s) d'altération	effet ciblé sur un/des agent(s) pathogène(s)
a) une action sur la charge microbienne des produits végétaux (e.g. à visée assainissante vis-à-vis d'un agent pathogène ou d'un agent d'altération pour améliorer la conservation du produit)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
b) une action sur le devenir des populations microbiennes au cours de la conservation à l'issue du traitement (e.g. limiter leur survie, ou leur développement)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
c) une action sur l'état sanitaire de l'eau de lavage / des jus de procédé (e.g. éviter la contamination des produits végétaux lors du lavage, la formation de biofilm, l'encrassement des systèmes de filtration)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	
d) l'amélioration des rendements de production par la diminution de micro-organismes d'altération ou préjudiciables au procédé (e.g. consommation des substrats par des micro-organismes ²⁶)	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Stabilisation <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>
	Réduction <input type="checkbox"/>	Réduction <input type="checkbox"/>	

2. Présentation de l'auxiliaire technologique, des matrices végétales, des cibles microbiennes et du procédé technologique

- a. Auxiliaire technologique
- b. Matrices alimentaires végétales
- c. Cibles microbiennes
- d. Procédé technologique et modalités d'emploi de l'AT

3. Méthodologie

- a. Données et essais
- b. Plan d'échantillonnage et traitements statistiques
- c. Analyses réalisées

4. Résultats des analyses

- a. Résultats des analyses microbiologiques
- b. Résultats de la surveillance des conditions de traitement pendant l'étude

5. Annexes et documents supplémentaires

- a. Données brutes et traitement des données

²⁵ Les termes « microbien » ou « micro-organisme » sont utilisés pour mentionner bactéries, virus, levures, moisissures, ainsi que parasites.

²⁶ Ex. la consommation de sucre par des bactéries lactiques lors de l'extraction des cossettes de betterave.

ANNEXE 3 : RECOMMANDATIONS RELATIVES AUX ETAPES DE CONTAMINATION ARTIFICIELLE, AU TAUX D'INOCULUM, A L'UTILISATION DE SUBSTITUT, ET AU MODE DE CONTAMINATION

Quels que soient les micro-organismes cibles, les étapes de contamination artificielle du produit reposent sur les éléments suivants :

- sélection des souches ;
- préparation de l'inoculum ;
- si l'objectif est une réduction microbienne, la concentration de l'inoculum devra être supérieure à la réduction logarithmique visée ;
- la justification du mode de contamination en fonction des objectifs de l'étude: trempage, aspersion, brumisation, par transfert, goutte à goutte).

Des recommandations sont proposées dans les paragraphes ci-après en fonction des différentes catégories des agents ciblés.

■ Bactéries/Moisissures/Levures

- **Sélection des souches microbiennes :**
 - privilégier les souches isolées de la matrice alimentaire concernée par l'étude,
 - donner l'origine des souches,
 - identifier, caractériser les souches,
 - justifier les souches sélectionnées,
 - utiliser des souches individuelles ou cocktails de souches d'une même espèce pour prendre en compte la variabilité intraspécifique,
- **Si substituts :** utiliser des souches substituts pertinentes s'il est impossible de manipuler des souches pathogènes (Hayriye, Doris et Davidson 2015; Mengyi et Joshua 2017).
- **Conservation des souches :** congélation, lyophilisation
- **Préparation de l'inoculum :** préparer de sorte que les cellules végétatives ou spores aient été adaptées aux conditions environnementales qui simulent le procédé. Si l'objectif est une réduction microbienne, la concentration obtenue devra être supérieure à la réduction logarithmique visée (norme NF EN ISO 20976-2 2022).
 - Préparation des cellules végétatives : les souches doivent être cultivées pour obtenir un inoculum standardisé dont les conditions physiologiques et la concentration sont adaptées à l'objectif. La culture initiale doit être réalisée dans des milieux non sélectifs dans des conditions adaptées à une croissance optimale. Cette culture peut être utilisée dans des conditions optimales ou adaptées pour simuler les conditions de contamination potentielle (ex : acidité, teneur en eau, en sel, sucre...)
 - Préparation des spores bactériennes: la ou les souches cibles doivent être cultivées dans un milieu de culture approprié et incubées dans des conditions qui favoriseront un taux élevé de sporulation (par exemple aérobies/anaérobies, milieu, température). La suspension de spores doit être lavée afin d'éliminer les nutriments. Les suspensions de spores peuvent ensuite être stockées dans des conditions appropriées pour éviter la germination jusqu'à ce qu'elles soient nécessaires pour l'étude d'inactivation. Avant la réalisation de l'étude d'inactivation, effectuer un dénombrement de la suspension de spores sur le même milieu que celui qui sera utilisé pour l'étude après un traitement thermique approprié pour inactiver les cellules végétatives
 - Préparation des spores fongiques : après 7 jours de culture du champignon sur milieu gélosé non sélectif à la température optimale de sporulation, les suspensions de spores fongiques sont préparées par ajout de 1 à 5 mL d'eau physiologique et agitation simple ou avec utilisation de billes, et éventuelle filtration pour éliminer le mycélium. Elles sont ensuite calibrées par comptage au microscope avec cellule hématimétrique et dilution suivant les besoins de concentration pour l'inoculation.
- **Mode de contamination :**
 - en surface (trempage, aspersion, brumisation, par transfert, goutte à goutte) ;
 - dans la masse (au cours du procédé, par injection) (norme NF EN ISO 20976-2 2022).

■ Virus

- **Sélection des souches virales** : Privilégier les virus entériques pathogènes cultivables ou ceux de la même famille (souche adaptée du VHA (ex. HM175/18f) ou souches animales de norovirus (ex. norovirus murin (MNV)).
- **Si substitués** :

Le choix des substitués devra être justifié (un ou un mélange de bactériophages). Les bactériophages (e.g. ARN F-spécifiques tel que le MS2) peuvent être utilisés. La réalisation d'une étude comparative à l'échelle laboratoire devra être réalisée pour montrer une efficacité égale ou supérieure de l'AT pour réduire le titre infectieux du surrogate en comparaison de la réduction obtenue pour le titre infectieux de la souche virale cible.

- **Conservation des souches** : congélation : -80°C
- **Préparation de l'inoculum** : si l'objectif est une réduction microbienne, la concentration de la suspension virale obtenue devra être supérieure à la réduction logarithmique visée.
 - Les suspensions virales sont produites par culture cellulaire (i.e. surnageant de cellules infectées clarifié).
 - L'origine des cellules hôtes (e.g. lignées cellulaires pour les virus de mammifères ; bactéries pour les bactériophages) utilisées pour produire les stocks viraux devra être mentionnée.
- **Mode de contamination** :
 - Surface : inoculation par dépôt (goutte à goutte ; volume total de 10µL à 100 µL) ; séchage à température ambiante sous PSM (10-20 min)

■ Parasites

- **Sélection des souches** :
 - privilégier les oocystes de *Toxoplasma gondii*, de *Cryptosporidium parvum* et de *Cyclospora cayetanensis*. Kystes de *Giardia duodenalis* et d'*Entamoeba histolytica*. Œufs d'*Echinococcus multilocularis*
- **Obtention des oocystes/kystes/œufs**

Les formes environnementales ne se cultivant pas : indiquer l'espèce de l'hôte infecté à partir duquel les parasites ont été prélevés et purifiés. Indiquer le laboratoire d'origine.

- identifier, caractériser les souches,
- justifier les souches sélectionnées
- origine des parasites
 - oocystes de *T. gondii* à partir de fèces de chat expérimentalement contaminé, puis purification par gradient de sucrose.
 - œufs d'*E. multilocularis* sont obtenus à partir d'échantillons fécaux de carnivores infectés (renard).
 - oocystes de *C. cayetanensis* et les kystes de *E. histolytica* sont prélevés à partir de fèces d'humains infectés
 - oocystes de *C. parvum* et les kystes de *G. duodenalis* peuvent être obtenus via des fournisseurs : les oocystes de *C. parvum* proviennent généralement de selles de veaux expérimentalement inoculés, et les kystes de *G. duodenalis* à partir de gerbilles expérimentalement inoculées.
- **Si utilisation de substitués** :
 - *T. gondii* : microsphères (billes de verre ou de latex fluorescentes). Prédiction relativement bonne du transport des parasites dans les eaux, mais pas d'information sur l'infectiosité (Shapiro et al., 2012).
 - *C. parvum* : spores de *Bacillus subtilis* (Bradford et al., 2016)
 - *C. cayetanensis* : le manque de méthodes *in vivo* ou *in vitro* pour tester la viabilité a incité les chercheurs à utiliser des parasites de substitution, tels que *Eimeria* et *Toxoplasma* (Ortega and Sanchez, 2010).
- **Conservation des souches** : à 4°C dans un milieu de stockage adapté, les durées de conservation permettant le maintien de la viabilité varient en fonction des parasites
 - Oocystes de *T. gondii* : dans une solution aqueuse contenant 2% d'H₂SO₄ à 4°C (Conservation 1 an)
 - Oocystes de *C. parvum* et kystes de *G. duodenalis* : dans du PBS à 4°C (Conservation 3 mois pour *C. parvum*, 2 mois pour *G. duodenalis*)
 - Oocystes de *C. cayetanensis* : dans du dichromate de potassium à 2,5 % à 4°C (Conservation 2 mois)

- Œufs d'*E. multilocularis* : dans du PBS avec pénicilline, streptomycine et fongizone (1:100) à 4°C (Conservation 6 à 7 mois pour *E. multilocularis*)
- **Préparation des suspensions de parasites aux concentrations connues :**
 - préparer de sorte que les oocystes ou kystes ou œufs aient été adaptés aux conditions environnementales qui simulent le procédé.
 - Si l'objectif est une réduction du nombre d'oocystes/kystes/œufs, la concentration obtenue devra être supérieure à la réduction logarithmique visée
 - les suspensions doivent être lavées afin d'éliminer le milieu de stockage (qui pourrait interférer avec les analyses ultérieures)
- **Mode de contamination**
 - par dépôt (goutte à goutte) de 10 à 100 µL de suspension par matrice suivi d'un séchage de 2h sous PSM.

ANNEXE 4 : ÉLABORATION DU PLAN D'ÉCHANTILLONNAGE ET TRAITEMENTS STATISTIQUES

1. Démarche globale pour l'élaboration de la structure de l'étude à mener

L'élaboration de la structure de l'étude à mener pour montrer l'intérêt du nouvel AT proposé dépend de l'effet attendu de cet AT par rapport à un témoin « eau » ou « autre AT ». Selon l'effet attendu, le type d'étude sera différent. Le tableau 3 résume le lien entre effet attendu et type d'étude à mener²⁷.

Tableau 3 – Types d'étude à mener selon l'effet attendu d'un nouvel auxiliaire technologique par rapport à un témoin.

Effet attendu du nouvel AT proposé	Type d'étude à mener
l'AT est plus efficace que le témoin	étude en supériorité
l'AT est aussi efficace que le témoin (ni plus, ni moins)	étude en équivalence
l'AT est au moins aussi efficace que le témoin	étude en non-infériorité

La nature du témoin ne change pas la méthode d'étude qui ne dépend que de l'objectif et de l'effet qu'on cherche à mesurer.

Les essais en équivalence et non-infériorité nécessitent plus d'échantillons. Les méthodes statistiques sont en effet conçues pour mettre en évidence une différence. Mettre en évidence une équivalence qu'elle soit bilatérale (essai en équivalence) ou unilatérale (essai en non-infériorité) relève du principe inverse : montrer l'absence de différence. Or, l'absence de différence est l'hypothèse dite nulle qui préside aux principes des tests statistiques : le test statistique est prévu pour rejeter cette hypothèse s'il y a une différence mais pas pour montrer qu'il n'y a pas de différence si l'hypothèse nulle n'est pas rejetée.

Ne pas mettre en évidence de différence a deux causes possibles :

- il n'y a pas de différence
- la puissance statistique du test ne permet pas de mettre en évidence une différence si elle existe.

Le tableau 4 indique les hypothèses testées.

Tableau 4 - Hypothèses à émettre dans les tests statistiques selon les différents types d'étude à mener.

Type d'étude	Objectif	Hypothèse testée	
		Variables quantitatives	Variables qualitatives
Supériorité	Déterminer si le procédé étudié A est plus efficace que le procédé témoin B	$H_0 : \mu_A = \mu_B$ $H_1 : \mu_A > \mu_B$	$H_0 : p_A = p_B$ $H_1 : p_A > p_B$
Équivalence	Déterminer s'il n'y a pas de différence entre le critère de jugement retenu entre les procédés A et B	$H_0 : \mu_A - \mu_B < -d \text{ et } \mu_A - \mu_B > d$ $H_1 : \mu_A \text{ non différente de } \mu_B$	$H_0 : p_A - p_B < d \text{ et } p_A - p_B > d$ $H_1 : p_A \text{ non différente de } p_B$
Non-infériorité	Déterminer si le procédé étudié n'a pas d'effet inférieur au procédé témoin	$H_0 : \mu_A - \mu_B \geq d$ $H_1 : \mu_A - \mu_B < d$	$H_0 : p_A - p_B \geq d$ $H_1 : p_A - p_B < d$

H_0, H_1 : hypothèses nulles et hypothèses alternatives, respectivement ; d : seuil de différence retenu ; μ_A, μ_B : moyennes pour les procédés A et B, respectivement ; p_A, p_B : proportions dans les groupes A et B, respectivement.

²⁷ Références bibliographiques de l'annexe 4.1 (Bouman *et al.* 2015; Fleming *et al.* 2011; Flight et Julious 2022; Herr, Descatha et Aegerter 2017; Julious 2004; Julious et Campbell 2012; Lakens 2023; Lung *et al.* 2003; Turan et Şenocak 2007)

Le nombre d'échantillons nécessaires pour montrer une supériorité, une non-infériorité ou une équivalence doit donc être suffisant pour que la puissance statistique permette de ne pas être en situation de ne pas pouvoir mettre en évidence une différence si elle existe et pouvoir conclure, avec l'incertitude statistique habituelle, qu'il n'y a pas de différence.

Les paramètres qui sont utilisés pour estimer le nombre d'échantillons nécessaires sont :

- le risque de première espèce α choisi (classiquement de 5 %) ;
- la puissance statistique visée, liée au risque de deuxième espèce β retenu : $1 - \beta$ (généralement, 80 % dans le cas d'un essai en supériorité, 90 à 95 % en cas d'essai en équivalence ou non-infériorité) ;
- la variance de la mesure réalisée (elle est estimée par des essais préliminaires ou issue de données de la littérature, à ne pas confondre avec la variance de la moyenne de la population qui est égale au carré de l'erreur standard) ;
- l'écart acceptable à la mesure réalisée (e.g. valeur critique) permettant de décrire le seuil à partir duquel la différence est significative ou non (par exemple, un maximum d'écart de 15 % entre les deux mesures est habituellement retenu pour pouvoir dire une absence de différence) ;
- le nombre d'échantillons analysés dans chacune des modalités testées, témoin et essai.

L'impact des paramètres cités ci-dessus sur le nombre d'échantillon nécessaires est illustré dans l'annexe 7.1.

Le nombre d'échantillons nécessaires pour pouvoir montrer l'effet du nouvel AT est spécifique de chaque situation. Pour α, β , variance et écart étudié identiques, l'effectif nécessaire est croissant si l'on passe d'une étude en supériorité à une étude en équivalence et d'une étude en équivalence à une étude en non-infériorité.

Les formules sont disponibles dans le tableau 5 ci-dessous et de nombreux outils interactifs de calcul existent et sont accessibles en ligne, par exemple : SampSize²⁸, EpiInfo²⁹, BioStaTGV³⁰, etc. (illustration dans la figure 2).

Comparer 2 moyennes observées

Calcul Aide

Saisie des paramètres

Moyenne du premier groupe μ_1 5

Moyenne du deuxième groupe μ_2 4

$d = |\mu_1 - \mu_2|$ 1

Ecart type commun σ 0.5

Risque de première espèce α 0.05 valeur entre 0 et 1

Puissance $1 - \beta$ 0.9 valeur entre 0 et 1

Nature du test Bilatéral Unilatéral

Calculez

Résultats

Nombre de sujets nécessaires n (par groupe)

epiR package 0.9-96

- Nombre total de sujet 10
- Nombre sujet dans le groupe 1 5
- Nombre sujet dans le groupe 2 5

Figure 2 – Exemple d'outil interactif (BioStaTGV) pour estimer un nombre d'échantillons nécessaires pour une comparaison de moyennes entre deux modalités.

Les tests statistiques qui seront utilisés dépendent notamment de la nature des données étudiées (quantitatives, qualitatives, booléennes, etc.), des modalités d'appariement ou non des données, de l'indépendance des variables, de la loi de distribution des variables, du nombre de variables testées simultanément (voir annexe 4.2).

²⁸ Outil SampSize disponible en ligne : <https://app.sampsize.org.uk/>

²⁹ Suite d'outils logiciels disponibles en ligne : https://www.cdc.gov/epiinfo/fra/fr_index.html

³⁰ Outil BioStaTGV disponible en ligne : <https://biostatgv.sentiweb.fr/?module=etudes/sujets>.

Tableau 5 - Quelques exemples de situations expérimentales possibles et paramètres à prendre en compte pour l'estimation du nombre minimal d'échantillons nécessaires. Des exemples illustratifs sont présentés en annexe 7.2

Exemple	1	2	3
Objectif	Montrer l' efficacité de l'AT par rapport à un témoin neutre (eau)	Montrer que l'AT est aussi efficace (ni plus ni moins) que l'AT actif de référence choisi	Montrer que l'AT n'est pas moins efficace que l'AT actif de référence choisi
Type d'étude	étude en supériorité	étude en équivalence	étude en non-infériorité
Type de test	bilatéral	bilatéral	unilatéral
Critère de jugement	comparaison de l'abattement moyen (en log) obtenu avec l'AT à l'abattement moyen obtenu avec le témoin neutre (eau)	comparaison de l'abattement moyen (en log) obtenu avec l'AT à l'abattement moyen obtenu avec le témoin (AT actif de référence)	comparaison de l'abattement moyen (en log) obtenu avec l'AT avec le témoin (AT actif de référence)
Hypothèse nulle H ₀	l'efficacité ne diffère pas entre l'AT et le témoin neutre (eau)	l'efficacité de l'AT est différente de celle de l'AT actif de référence	l'efficacité de l'AT est moindre que celle de l'AT actif de référence
Hypothèse alternative H ₁	l'efficacité diffère entre l'AT et le témoin neutre (eau)	l'efficacité de l'AT est équivalente à celle de l'AT actif de référence	l'efficacité de l'AT n'est pas inférieure à celle de l'AT de référence
Différence δ fixée a priori	différence delta minimum à observer pour pouvoir conclure que les mesures sont différentes au moins égale à la variance	différence delta maximum à observer pour pouvoir conclure que les mesures sont équivalentes avec l'AT de référence et l'AT testé	différence delta maximum à observer pour pouvoir conclure que l'une des mesures n'est pas inférieure à l'autre avec l'AT testé par rapport à celle obtenue avec l'AT de référence
Risque de première espèce α	5%	5%	2,5%
Z _{α}	1,96	1,96	2,24
Z _{1-α}	1,64	1,64	1,96
Z _{1-α/2}	1,96	1,96	2,24
Variance σ^2	σ^2	σ^2	σ^2
Risque de deuxième espèce β	10%	10%	10%
Puissance statistique 1 - β	90%	90%	90%
Z _{1-β}	1,28	1,28	1,28
Z _{1-2β}	1,64	1,64	1,64
Rapport entre le nombre d'échantillons témoins (eau ou AT de référence) par échantillon étudié (AT testé)	$k = n_{\text{témoin}}/n_{\text{AT étudié}}$	$k = n_{\text{témoin}}/n_{\text{AT étudié}}$	$k = n_{\text{témoin}}/n_{\text{AT étudié}}$
Nombre d'échantillons nécessaires minimum	$n_{\text{AT étudié}} \geq \frac{k+1}{k} \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2 ;$ si $k = 1$: $n_{\text{AT étudié}} \geq 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2$	$n_{\text{AT étudié}} \geq \frac{k+1}{k} \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta/2})^2$ si $k = 1$: $n_{\text{AT étudié}} \geq 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta/2})^2$	$n_{\text{AT étudié}} \geq \frac{k+1}{k} \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2$ si $k = 1$: $n_{\text{AT étudié}} \geq 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2$

2. Choix de tests statistiques et conditions d'application : généralités

Le choix des tests statistiques à réaliser se base aussi sur différentes conditions d'application préalables à vérifier, notamment (i) la **normalité** des données dans chaque groupe / modalité, (ii) l'**homoscédasticité** (égalité des variances) entre les différents groupes et (iii) l'**indépendance** et/ou l'**appariement** des données. La vérification ou non de ces conditions orientera vers un choix adéquat pour le test statistique à utiliser. Deux grandes classes de tests statistiques peuvent être considérées en fonction de ces conditions et du nombre d'échantillons, des **tests paramétriques** et **non-paramétriques**.

- (i) **Normalité** : en général, si le nombre d'échantillons est supérieur à 30 échantillons par groupe/modalité, la condition de normalité est *considérée comme vérifiée* ; si le nombre d'échantillons est inférieur à 30 échantillons par groupe/modalité, l'hypothèse de normalité peut être « supposée » (notamment s'il y a vraiment très peu d'échantillons) ou testée (par exemple en utilisant un test de Shapiro-Wilk pour vérifier la normalité dans chacun des groupes/modalités) ;
- (ii) **Homoscédasticité** (égalité des variances) : si la normalité est vérifiée, l'hypothèse d'homoscédasticité peut être testée (par exemple en utilisant un test de Fisher d'égalité des variances entre les différents groupes).
- (iii) **Indépendance et/ou appariements des données** : l'objectif est de vérifier si la collecte des données est indépendante entre les différents groupes / modalités (par exemple, a) considéré comme **dépendant** si l'analyse entre la condition témoin et l'AT porte sur exactement le même végétal ayant subi les deux essais successifs; b) considéré comme **indépendant** s'il y a deux lots de végétaux traités dans deux essais différents).

Dans les différentes situations que l'on peut rencontrer :

- dans le cas idéal, si toutes les conditions sont vérifiées, un test de comparaison paramétrique peut être réalisé pour mettre en évidence la différence entre les deux groupes. On peut utiliser donc par exemple un test *t* de Student pour comparer les deux moyennes observées, analyse de variances ANOVA s'il y a plus de deux modalités à comparer, etc. ;
- en cas de non-vérification d'une condition, par exemple en cas de normalité mais hétéroscédasticité, la comparaison entre les modalités peut être faite par exemple avec un test Aspin-Welch (une forme d'adaptation du test *t* de Student pour les groupes à variances inégales) pour comparer deux groupes, test de Friedman pour comparer plus de deux groupes ;
- en cas de non normalité, il est conseillé d'utiliser les tests non-paramétriques, par exemple le test non-paramétrique de Mann-Whitney pour deux groupes/modalités, Kruskal-Wallis pour trois groupes ou plus, etc. ;
- enfin, si les échantillons ne sont pas indépendants, il est primordial de le prendre en compte dans les tests (par exemple test de Student pour données appariées, etc.).

En sortie des tests statistiques réalisés, il est important de connaître la valeur *p-value* qui sera à comparer au risque α prédéfini pour pouvoir conclure sur une différence significative ou non et aussi de l'amplitude de l'effet / l'amplitude de la différence observée. Le choix de tests statistiques à faire pour mettre en évidence un effet / une différence attendue dépend donc de différentes conditions d'application et du plan d'échantillonnage.

Il est enfin à noter que les tests non paramétriques sont en général moins puissants que les tests paramétriques, c'est-à-dire il serait plus difficile de mettre en évidence un effet significatif de faible amplitude avec les tests non-paramétriques. Par contre, ils présentent l'avantage d'être bien adaptés aux petits échantillons et de ne pas recourir aux hypothèses de normalité (Conover, 1999).

ANNEXE 5 : QUANTIFICATION DES VIRUS ET DES PARASITES

Les virus et les parasites sont des agents dont la quantification peut nécessiter des protocoles particuliers.

■ Virus

La méthode de la norme NF EN ISO 15216-2 (2019) repose sur la détection des norovirus humains (génogroupes I et II) et le virus de l'hépatite A (VHA) dans l'eau embouteillée, les fruits et les végétaux, les fruits de mer et sur les surfaces, par RT-qPCR.

L'utilisation de ces méthodes normalisées dans le cadre d'études d'inactivation virale n'est pas recommandée dans la mesure où la détection de génomes viraux n'est pas corrélée à la présence de virus infectieux.

Les méthodes à privilégier pour quantifier les virus infectieux sont les méthodes traditionnelles de titrage infectieux (UFP, TCID₅₀) ou alternatives (*Integrated Cell Culture*-RT-qPCR, impédancemétrie).

Des méthodes alternatives existent, telle que *Integrity-RT-qPCR*, qui permet de quantifier des génomes viraux par RT-qPCR après un traitement des échantillons (concentrats de virus) avec des molécules (monoazides, dérivés du platine). Cette méthode permet de détecter des génomes viraux de particules virales intactes / non altérées.

■ Parasites

Les méthodes de détection et de quantification de *Cryptosporidium* et *Giardia* dans l'eau et dans les légumes verts frais à feuilles et les fruits à baies sont normalisées (purification par séparation immunomagnétique, détection et quantification au microscope par immunofluorescence (normes ISO 15553 2006 et ISO 18744 2016). Toutefois, les techniques de biologie moléculaire sont généralement utilisées pour la quantification directe des parasites sur aliment, dans l'eau ou dans les jus de diffusion, même si ces méthodes ne sont pas normalisées. La qPCR, qui est une méthode sensible et spécifique, peut être une alternative à la microscopie.

ANNEXE 6 : PRESENTATION DES RESULTATS DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

■ Potentiel d'inactivation

Le potentiel d'inactivation (Δ) ou la destruction logarithmique du micro-organisme est la différence entre la concentration avant et après le traitement évalué (toutes deux exprimées dans la même unité par exemple \log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻²) (cf. ISO 20976-2):

$$\Delta = \text{inactivation logarithmique} = \log_{10} N_0 - \log_{10} N_{\text{fin}} = \log_{10} (N_0/N_{\text{fin}})$$

où N_0 est la concentration microbienne avant le traitement à l'AT (t_0), exprimée en \log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻²; N_{fin} est la concentration microbienne une fois le traitement achevé, exprimée en \log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻².

Le niveau de réduction ciblée lors du traitement à l'AT sera précisé afin de valider si l'inactivation logarithmique est supérieure ou égale à ce dernier.

Les résultats du potentiel d'inactivation sont propres aux conditions et à la matrice étudiées et ne peuvent être extrapolés à d'autres conditions.

■ Cinétique d'inactivation

Il s'agit de la variation dans le temps de la concentration des micro-organismes cibles soumis à un procédé d'inactivation exprimé en \log_{10} (cf. ISO 20976-2). La cinétique représentant le dénombrement en \log_{10} UFC.g⁻¹, \log_{10} UFC.mL⁻¹, \log_{10} UFC.cm⁻² tout au long du traitement à l'AT, peut être ajustée en utilisant des modèles mathématiques (voir annexe 7.3).

■ Potentiel de croissance

Le potentiel de croissance correspond à la différence entre la concentration logarithmique (\log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻²) des micro-organismes cibles la plus élevée et la concentration logarithmique des micro-organismes cibles initiale (norme NF EN ISO 20976-1 2019).

Le potentiel de croissance (Δ) est calculé à partir de la moyenne des répliquas techniques/analytiques pour chaque point d'échantillonnage et exprimé en \log_{10}

$$\Delta = \text{potentiel de croissance} = \log_{\text{max}} - \log_{\text{initial}}$$

où \log_{max} est la concentration des micro-organismes cibles la plus élevée, exprimée en \log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻², et \log_{initial} la concentration initiale de la flore cible exprimée en \log_{10} UFC.g⁻¹, ou mL⁻¹, ou cm⁻².

ANNEXE 7 : ELEMENTS COMPLEMENTAIRES – EXEMPLES ILLUSTRANT LES APPROCHES STATISTIQUES NECESSAIRES LORS DE L'ELABORATION DE PLAN D'ECHANTILLONNAGE ET DE LA DEMONSTRATION DE L'EFFICACITE ANTIMICROBIENNE

L'objectif de cette annexe est d'illustrer une démarche lors de l'établissement d'un plan d'échantillonnage dans le cadre de l'évaluation de l'efficacité antimicrobienne d'un auxiliaire technologique. Le logiciel utilisé pour ces illustrations est R, les formules présentées peuvent être réutilisées. Cependant, d'autres logiciels de calcul existent, et peuvent fournir les mêmes informations statistiques. L'ensemble de cette annexe 7 a uniquement vocation à servir d'aide à la compréhension de la démarche statistique auprès des pétitionnaires.

1. Illustration - Impact des paramètres permettant de déterminer le nombre d'échantillons nécessaires dans le cadre de la démonstration avec un test de comparaison de l'efficacité de l'AT par rapport à un témoin neutre

Note : Dans cette illustration, les données sont 'fictives' : elles sont simulées à l'aide d'une fonction mathématique (la fonction *rnorm* intégrée dans le logiciel R).

■ Cas d'étude

Considérons un exemple hypothétique où l'on souhaite évaluer l'efficacité d'un AT pour décontaminer la surface de végétaux. Dans cette expérience simulée on compare deux modalités :

- lavage des végétaux avec de l'eau (modalité « Témoin ») ;
- lavage des végétaux avec de l'eau supplémentée en AT (modalité « Essai »).

Trois répétitions d'expériences indépendantes ($n = 3$) sont considérées (trois réplicats biologiques, c'est-à-dire trois lots de végétaux différents, trois expériences de lavage différentes réalisées sur trois jours différents, le tout réalisé avec les mêmes équipements).

On considère qu'après lavage, les micro-organismes associés aux végétaux sont dénombrés à l'aide de la technique faisant appel à la préparation d'une suspension mère, la réalisation de dilutions décimales puis le comptage de colonies sur gélose de culture. Le résultat du dénombrement est exprimé en UFC.g⁻¹.

■ Données

Trente³¹ valeurs aléatoires ont été générées, issues d'une loi normale de moyenne $\mu = 5$ et d'écart-type $\sigma = 1$ pour simuler 30 répétitions expérimentales obtenues en laboratoire ($n = 30$). La figure 3 présentant la distribution de ces 30 valeurs générées suggère que ces dernières semblent suivre une distribution normale centrée sur la valeur de 5.

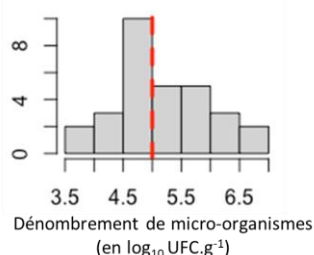


Figure 3 – Distribution des résultats de dénombrement des micro-organismes (données simulées avec la fonction R *rnorm()* suivant une distribution normale théorique de moyenne $\mu = 5$ et d'écart-type $\sigma = 1$). Le

³¹ Dans le cas d'une génération de $n = 3$ en suivant la même loi normale, on obtient par exemple trois valeurs suivantes : 4,4, 3,2 et 4,5 log₁₀ UFC.g⁻¹. Dans ce cas, on ne peut pas raisonnablement vérifier que les données suivent la loi normale, l'échantillon étant trop petit. Étant donné que la fonction *rnorm()* tire au hasard des données d'une distribution théorique, la répétition de l'exécution de cette fonction génère des valeurs différentes, de manière similaire à ce que l'on obtiendrait en répétant une expérience de dénombrement en laboratoire. Ainsi, dans la suite de cette illustration, cette fonction *rnorm()* est utilisée pour simuler aléatoirement des données expérimentales, car on considère la plupart du temps que les expériences de dénombrement microbiologique produisent des données suivant cette loi.

trait pointillé vertical correspond à la moyenne de la distribution normale théorique selon laquelle les données ont été générées.

■ Démonstration de l'efficacité et hypothèses à tester

L'étude à mener consiste à démontrer que l'emploi du nouvel AT lors du lavage permet un abattement du nombre de micro-organismes de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ par rapport au lavage à l'aide du témoin neutre utilisé (eau). Pour information, les végétaux lavés avec uniquement de l'eau présentent une concentration bactérienne théorique de $5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$. Les données expérimentales obtenues avec trois échantillons ($n = 3$) sont présentées dans la figure 4.

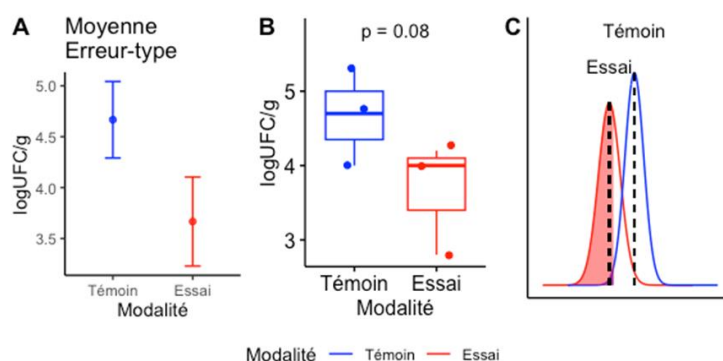


Figure 4 : Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées avec la fonction *norm()* intégrée dans le logiciel R. La valeur de *p* indiquée correspond à la *p-value* du test *t* de Student comparant les deux modalités étudiées.

Dans la figure 4, les données générées montrent que la distribution des données obtenues, résumées avec les valeurs moyennes et écart-types, ne sont pas chevauchantes entre les deux modalités « témoin » et « essai », ce qui semble indiquer une différence entre l'utilisation de l'AT et le lavage uniquement à l'eau.

Pour mettre en évidence cette différence, un test d'hypothèse appelé test *t* de Student unilatéral peut être effectué. Le test *t* de Student est un test paramétrique permettant de comparer les moyennes observées dans les deux modalités considérées.

Les hypothèses du test sont :

- hypothèse nulle H_0 : pas de différence entre les deux modalités ;
- hypothèse alternative H_1 (test unilatéral) : l'utilisation de l'AT induit une réduction du nombre de micro-organismes par rapport à l'utilisation de l'eau.

Les différentes conditions d'application du test *t* de Student doivent être vérifiées au préalable, à savoir (i) l'indépendance des données obtenues, (ii) la normalité des données dans chaque modalité, (iii) l'homoscédasticité (égalité des variances) entre les deux modalités :

- les données sont aléatoirement générées avec une fonction mathématique, elles peuvent donc être considérées comme indépendantes ; dans la réalité il convient de vérifier par exemple, que le végétal échantillonné pour l'essai AT n'est pas exactement le même que celui utilisé pour l'essai témoin ;
- dans le cas d'un nombre très faible d'échantillons ($n = 3$) comme illustré ci-dessus dans la figure 4, la condition de normalité des données ne peut pas être testée, par conséquent, on ne peut que supposer que les données suivent la loi normale ; il est toutefois important de noter que cette supposition peut diminuer la confiance que l'on accordera au résultat du test statistique ;
- pour la même raison du faible nombre d'échantillons, on suppose que l'homoscédasticité est vérifiée.

Sur la base de ces considérations, le test de Student peut être réalisé : le résultat du test donne une valeur de *p-value* égale à 0,08 (Figure 4), indiquant que l'hypothèse nulle H_0 ne peut pas être rejetée avec un risque de première espèce α fixé à 5%.

On en conclut que, **malgré un écart important visuellement observé dans la représentation graphique**, les données obtenues **n'ont donc pas pu montrer une différence significative entre les deux modalités**, soit l'efficacité de l'AT dans la réduction des micro-organismes présents sur les végétaux.

Le résultat du test obtenu ci-dessus montre que la différence visuellement observée dans la représentation graphique aurait pu être obtenue uniquement par l'effet du hasard de l'échantillonnage. En effet, avec la même hypothèse de départ, c'est-à-dire une contamination moyenne théorique des végétaux lavés uniquement à l'eau de $5 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, t un écart-type de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ et un abattement de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, il est possible d'obtenir d'autres données aléatoires pour lesquelles les moyennes observées peuvent être très proches et/ou des écart-types plus élevés et chevauchants. Cette situation est illustrée dans la figure 5 ci-dessous avec les données présentant des écart-types chevauchants. Le résultat du test t de Student confirme cette observation visuelle dans le graphique et ne montre pas de différence significative entre les deux modalités ($p = 0,34$, supérieur au risque α fixé à 5%).

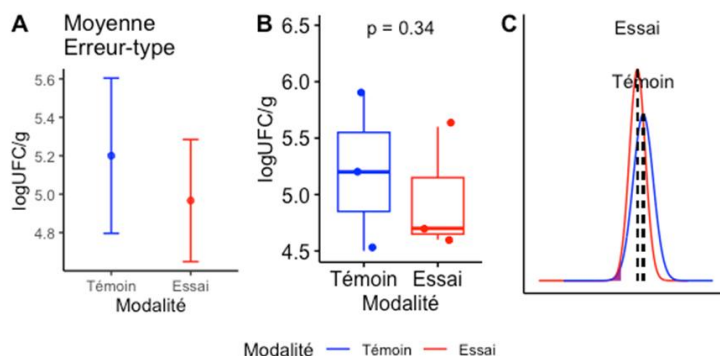


Figure 5 - Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées avec la fonction *rnorm()* intégrée dans le logiciel R. La valeur de p indiquée correspond à la p -value du test t de Student comparant les deux modalités étudiées.

Toujours de manière aléatoire et avec la même hypothèse de contamination théorique et d'abattement ainsi que le même nombre d'échantillons $n = 3$, il est également possible d'obtenir des données pouvant présenter par hasard une configuration qui peut conduire à un résultat de test de Student pour lequel la p -value serait cette fois-ci inférieure à $\alpha = 0,05$, soit une différence significative entre les deux modalités. La figure 6 montre une telle situation où il est en effet possible d'obtenir un test à la limite de la significativité.

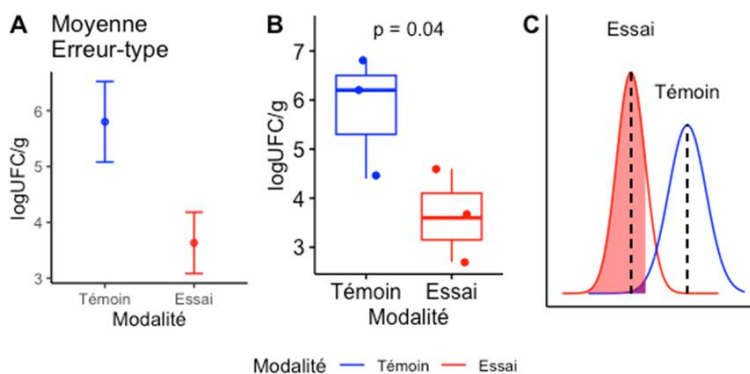


Figure 6 - Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées avec la fonction *rnorm()* intégrée dans le logiciel R. La valeur de p indiquée correspond à la p -value du test t de Student comparant les deux modalités étudiées.

En conclusion de cette analyse, les trois simulations ci-dessus (figures 4, 5 et 6) font toutes partie du même scénario hypothétique où les données générées sont basées sur un abattement réel de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ après traitement avec l'AT et d'un écart-type de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$. Il a été montré que dans 2 situations sur 3, la p -value du test de Student obtenue est supérieure au risque α fixé à 0,05. Ces résultats montrent ainsi qu'avec le test utilisé dans ce plan d'échantillonnage **avec seulement 3 essais biologiques ($n = 3$) il est difficile de démontrer par l'expérience et de façon fiable un abattement de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$** . Le test n'est donc pas suffisamment puissant pour démontrer cet abattement relativement faible par l'AT par rapport à l'écart-type de $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$.

La puissance du test t de Student peut être calculée par une fonction mathématique ou un outil de calcul (par exemple avec la fonction `power.t.test()` intégrée dans le logiciel R) en donnant en entrée de la fonction les paramètres tels que le nombre de répétitions n , l'abattement attendu et l'écart-type. En intégrant les paramètres considérés dans les trois exemples ci-dessus dans la fonction R `power.t.test()`, la puissance du test est estimée à 0,27, ce qui est très faible.

Il est recommandé en général **de concevoir une expérimentation en visant une puissance minimum de 0,8** pour que le résultat d'une expérience soit fiable.

Pour augmenter cette puissance, deux leviers peuvent être envisagés :

1. augmenter le nombre de répétitions n ,
2. réduire l'écart-type.

Pour illustrer les différents cas de figures possibles, la même fonction `power.t.test()` utilisée précédemment permet également d'estimer le nombre de répétitions expérimentales n qu'il faudrait réaliser en prenant en compte l'abattement visé, l'écart-type mesuré et la puissance statistique souhaitée.

■ Cas de figure 1

Avec la même configuration que précédemment (abattement visé et écart-type à $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$), il faudrait réaliser 13 échantillons pour obtenir un effet significatif avec une puissance statistique souhaitée à 0,8. Trois simulations réalisées avec 13 répétitions par simulation confirment ces résultats (cf. illustration dans la figure 7).

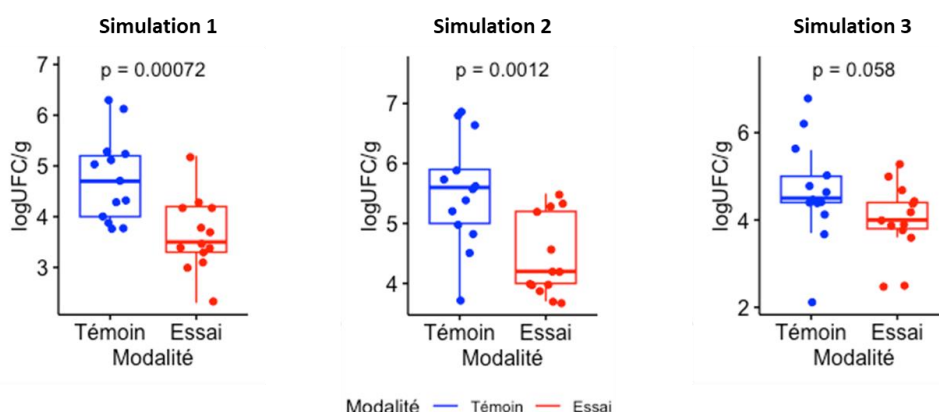


Figure 7 - Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées, pour trois simulations indépendantes, avec la fonction `rnorm()` intégrée dans le logiciel R. La valeur de p indiquée correspond à la p -value du test t de Student comparant les deux modalités étudiées. Configuration des simulations avec abattement visé à $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$, écart-type à $1 \log_{10} \text{ UFC.g}^{-1}$ et nombre de lots analysés (répétitions biologiques) $n = 13$.

■ Cas de figure 2

Un autre levier serait de réduire l'écart-type si le nombre de répétitions n ne peut être augmenté. Cela se traduit de manière expérimentale par exemple par la maîtrise des conditions d'analyse pour réduire l'incertitude de mesure. Attention, il ne s'agit pas d'exclure à posteriori des données mesurées trop éloignées de la moyenne et pouvant être justifiées comme « aberrantes » pour diminuer l'écart-type. Dans le cas où la réduction de l'écart-type n'est expérimentalement pas possible, il faut se rapprocher du cas numéro 1 et de l'augmentation du nombre d'échantillons.

La fonction `power.t.test()` montre qu'il faudrait réduire l'écart-type à 0.4 pour être en mesure d'avoir un effet significatif avec une puissance statistique élevée et un nombre de répétitions $n = 3$ (cf. illustration Figure 8).

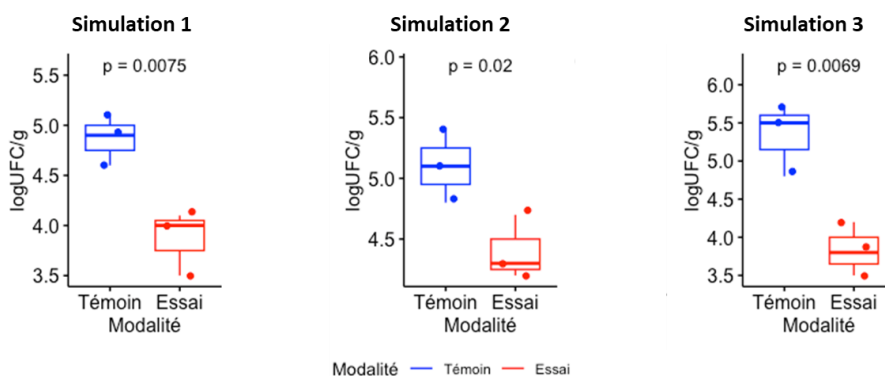


Figure 8 - Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées, pour trois simulations indépendantes, avec la fonction *rnorm()* intégrée dans le logiciel R. La valeur de *p* indiquée correspond à la *p-value* du test *t* de Student comparant les deux modalités étudiées. Configuration des simulations avec abattement visé à 1 log₁₀ UFC.g⁻¹, écart-type à 0.4 log₁₀ UFC.g⁻¹ et nombre de lots analysés (répétitions biologiques) *n* = 3.

■ **Cas de figure 3**

La dernière possibilité serait d'utiliser un AT très efficace, c'est-à-dire avec un abattement théorique plus important. La fonction *power.t.test()* montre qu'il faudrait un abattement d'au moins 2,48 log₁₀ UFC.g⁻¹ pour être en mesure de montrer une différence significative avec un nombre de répétitions *n* = 3, un écart-type de 1 log₁₀ UFC.g⁻¹ et une puissance statistique de 80 % (cf. illustration Figure 9).

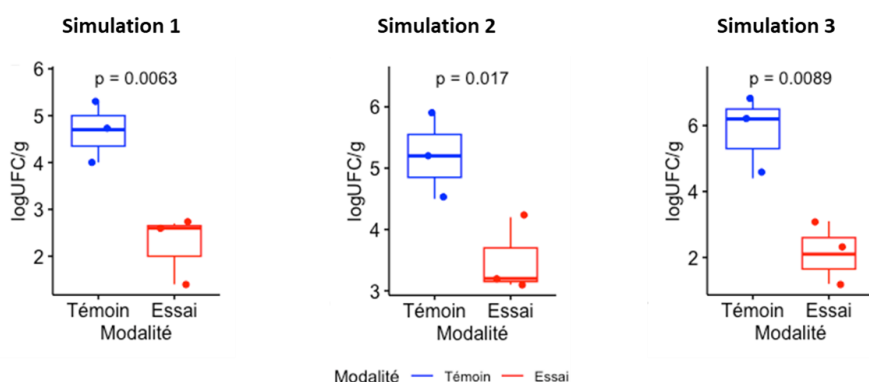


Figure 9 - Dénombrement de micro-organismes sur les végétaux après un lavage avec de l'eau et avec un AT (modalité « essai »). Les données sont générées, pour trois simulations indépendantes, avec la fonction *rnorm()* intégrée dans le logiciel R. La valeur de *p* indiquée correspond à la *p-value* du test *t* de Student comparant les deux modalités étudiées. Configuration des simulations avec abattement visé à 2.48 log₁₀ UFC.g⁻¹, écart-type à 1 log₁₀ UFC.g⁻¹ et nombre de lots analysés (répétitions biologiques) *n* = 3.

Conclusion

Dans le contexte de démonstration de l'efficacité d'un essai avec AT par rapport à un témoin, les illustrations ci-dessus **soulignent l'importance du nombre d'échantillons nécessaires à collecter**. Les résultats et conclusions des tests statistiques réalisés pour la comparaison et donc l'abattement visé par l'utilisation de l'AT, l'écart-type attendu des mesures et la puissance statistique du test conditionnent le nombre d'échantillons nécessaires.

Les situations où l'abattement visé est faible et l'écart-type entre les mesures élevé, reflétant généralement diverses sources de variabilité et d'incertitude, nécessitent un plus grand nombre d'échantillons.

2. Illustration - Détermination du nombre d'échantillons en fonction des types d'étude à mener selon l'effet attendu d'un nouvel AT par rapport à un témoin

Les exemples ci-dessous illustrent la détermination du nombre d'échantillons nécessaires pour le plan expérimental pour différentes situations où le nouvel AT est comparé à un AT de référence afin de démontrer une non-infériorité entre ces deux AT.

■ Situation A. L'AT étudié est aussi efficace que l'AT de référence

On veut comparer l'absence de différence d'efficacité entre un nouvel AT (AT étudié) et un AT témoin actif de référence connu comme étant efficace. Deux types d'essais peuvent être ainsi envisagés : essai de non-infériorité et essai d'équivalence.

1. Essai de non infériorité

On veut pouvoir montrer que l'AT étudié n'est pas moins efficace que l'AT de référence. On doit se mettre en condition d'un essai de non infériorité.

L'efficacité des AT est évaluée par le niveau d'abatement observé entre la valeur du dénombrement bactérien avant l'AT et la valeur du dénombrement après l'AT. Le niveau d'abatement observé est la moyenne du log de dénombrements perdus entre l'avant AT et l'après AT.

La variance (σ^2) des dénombrements est de 0,3 log.

La différence maximale (δ) indiquant que l'AT étudié n'est pas moins efficace que l'AT de référence est de 0,5 log d'abatement observé.

Le nombre d'échantillons nécessaires peut être calculé en utilisant la formule suivante (cf. annexe 4.1, tableau 5) :

$$n = 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha/2} + Z_{1-\beta})^2$$

avec $\alpha = 5\%$ et $\beta = 90\%$ (risque de première et seconde espèce prédéfinie, respectivement)

L'effectif nécessaire est de 30 échantillons dans chaque groupe, si le nombre d'échantillons est le même dans les deux groupes ($k = 1$).

2. Essai d'équivalence

On veut pouvoir montrer que l'AT étudié n'est ni plus ni moins efficace que l'AT de référence. On doit se mettre en condition d'un essai d'équivalence.

Dans cette situation, le nombre d'échantillons est calculé avec la formule suivante (cf. annexe 4.1, tableau 5) :

$$n = 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta/2})^2$$

avec $\alpha = 5\%$ et $\beta = 90\%$.

Avec les mêmes paramètres σ et δ que précédemment, le nombre d'échantillons à réaliser est de 26 dans chaque groupe.

■ Situation B. L'AT étudié est plus efficace que l'AT de référence

On veut comparer l'efficacité de l'AT étudié à celle de l'AT de référence. Pour pouvoir montrer que l'AT étudié est plus efficace que l'AT de référence, on doit se mettre en condition d'essai de supériorité.

3. Essai en supériorité

Le nombre d'échantillons nécessaires est calculé avec la formule (cf. annexe 4.1, tableau 5):

$$n = 2 \cdot \frac{\sigma^2}{\delta^2} (Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta})^2$$

avec $\alpha = 5\%$ et $\beta = 90\%$.

Avec les mêmes paramètres σ et δ que précédemment, le nombre d'échantillons à réaliser est de 20 dans chaque groupe.

3. Illustration - Approche comparative de modèles de régression linéaire dans le cadre de la démonstration de l'efficacité d'un AT

Cette partie est structurée en deux sous-parties qui portent sur les généralités des modèles de régression linéaire simple (partie généralités Annexe 5.a) et une illustration de l'application de cette approche sur un exemple hypothétique (partie illustrations annexe 5.b). Ces deux parties sont présentées ci-dessous.

a. Modèles de régression linéaire : généralités

Un modèle de régression linéaire (ou modèle linéaire) vise à établir une relation linéaire entre une variable y dite à expliquer (e.g. mesure du niveau de contamination microbienne) et une (ou plusieurs) variable(s) x dite explicative(s) (e.g. temps, pH, etc.). Un modèle linéaire simple est couramment construit sous la forme d'une équation de type polynôme du premier degré $y = ax + b$. Les paramètres a et b permettant de décrire la forme linéaire entre les variables sont à estimer par ajustement aux données expérimentales collectées. Cet ajustement peut s'effectuer, par différentes méthodes, permettant en général de minimiser la différence entre la valeur observée/mesurée et la valeur correspondante prédite par le modèle, appelée les résidus du modèle. En pratique, les principales étapes de construction et de validation du modèle sont :

- évaluation visuelle de la relation linéaire dans les données collectées ;
- évaluation de la corrélation entre les deux variables ;
- construction du modèle ;
- vérification des hypothèses sur les résidus du modèle ;
- évaluation de la significativité et de la précision du modèle.

La construction d'un modèle linéaire se base sur plusieurs hypothèses à vérifier sur les résidus qui doivent notamment :

- **suivre** une distribution de **loi normale** centrée sur 0,
- être indépendants, on dit qu'ils ne doivent pas être **autocorrélés**,
- être distribués de façon homogène, autrement dit leur variance doit être constante, on parle d'**homoscédasticité**.

La vérification de ces conditions est illustrée ci-dessous.

■ Normalité des résidus

Si le modèle décrit bien le phénomène étudié alors l'écart entre les mesures expérimentales et les valeurs théoriques prédites par le modèle doit correspondre à l'erreur de mesure. Cette erreur étant aléatoire, elle est supposée suivre la loi normale. L'hypothèse de normalité des résidus d'un modèle peut s'évaluer en représentant graphiquement leur distribution (sous la forme d'un histogramme et grâce à la droite de Henry). Deux situations de l'ajustement de modèles aux deux jeux de données différents sont illustrées dans la Figure 10 :

- situation 1 : les résidus semblent suivre une distribution normale. Les points semblent suivre la droite de Henry théorique et sont inclus dans la zone d'incertitude, comme attendu pour des données suivant la loi normale ;
- au contraire, dans la situation 2, la distribution des résidus n'est pas symétrique, et des points s'écartent fortement de la droite théorique (figure 1F). Les résidus du modèle ne suivent donc pas une distribution normale.

Un test d'hypothèse peut être réalisé pour évaluer la conformité des résidus avec la loi normale à l'aide du test de Shapiro-Wilk, ce qui confirme l'évaluation visuelle des résidus ci-dessus.

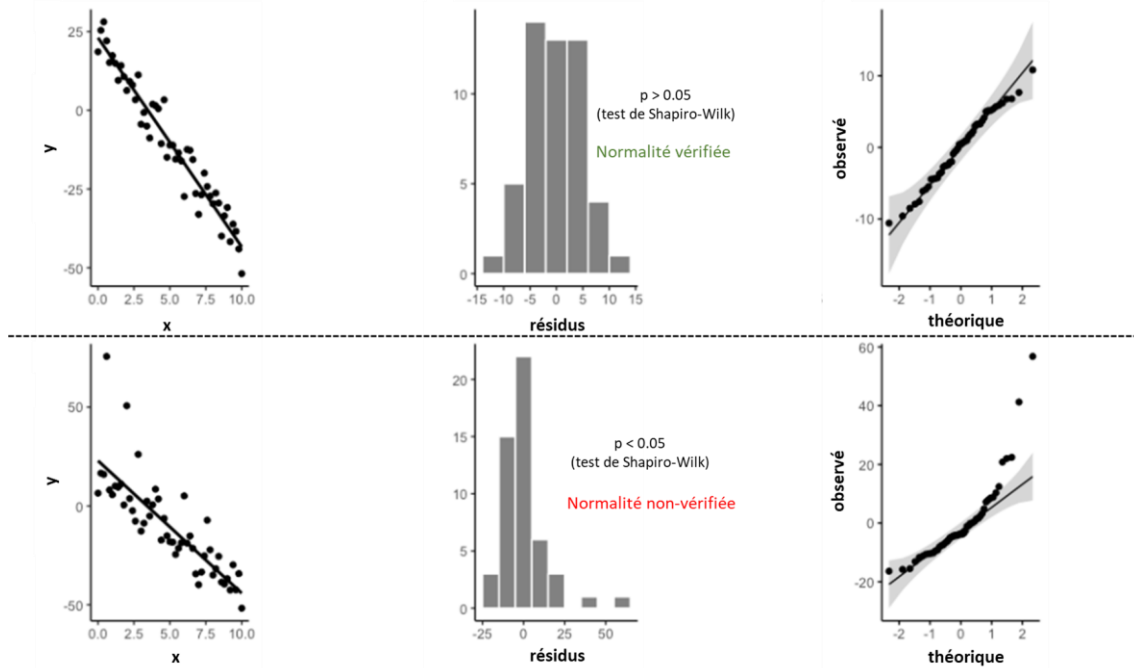


Figure 10 - Vérification de l'hypothèse de normalité des résidus de modèles linéaires ajustés à deux jeux de données différents (figures en haut et en bas). Figures à gauche : nuage des points et la droite ajustée décrivant une relation entre les variables x et y . Figures du milieu : distribution des résidus. Figures à droite : Diagramme quantile-quantile avec la droite de Henry permettant d'évaluer la normalité des résidus.

■ Autocorrélation

Les résidus sont dépendants, on dit aussi qu'ils sont auto-corrélés, lorsque leurs valeurs sont corrélées entre elles. Une telle autocorrélation apparaît lorsque le modèle choisi n'est pas optimal et que les résidus contiennent de l'information autre que l'erreur de mesure. Autrement dit, lorsqu'on prend une valeur de résidu au hasard, les valeurs voisines ont tendance à être proches. Deux exemples sont présentés dans la figure 11 ci-dessous. Dans l'exemple de la figure 11-A, on décèle que pour les valeurs extrêmes de y , les valeurs de résidus ont tendance à être positives, alors que pour les valeurs centrales de y les résidus ont tendance à être négatifs, contrairement à l'exemple de la figure 11-C où les valeurs ne semblent pas corrélées.

Le corrélogramme est classiquement utilisé pour visualiser cette autocorrélation. Cette représentation graphique présente le coefficient de corrélation entre chaque résidu de chaque point et les résidus des valeurs suivantes ($lag1$, $lag2$, etc...). Le coefficient de corrélation à $lag0$, correspondant à la corrélation d'une valeur par rapport à elle-même qui est toujours maximal et égal à 1 (voir figures 11-B, D). Les autres valeurs de corrélation doivent être comprises entre les lignes en pointillés correspondant à l'intervalle de confiance. Par ailleurs, la distribution des valeurs de coefficient de corrélation doit être aléatoire le long de l'axe des abscisses.

Dans la figure 11-B, le coefficient correspondant au $lag1$ est significatif car sa valeur est supérieure à la limite haute de l'intervalle de confiance. Par ailleurs, la distribution ne semble pas aléatoire. Ces résultats semblent révéler une autocorrélation. Au contraire, dans la figure 11-D les coefficients de corrélation sont tous compris dans l'intervalle de confiance et leur distribution semble aléatoire, indiquant une absence d'autocorrélation.

Outre l'outil graphique, il est possible de tester l'autocorrélation des résidus à l'aide du test de Durbin-Watson. Dans ce test, l'hypothèse nulle est que les données ne sont pas auto-corrélées et qu'elles le sont dans l'hypothèse alternative. Les résultats du test avec les données des deux situations illustrées confirment l'évaluation visuelle de l'autocorrélation des résidus (figures 11)

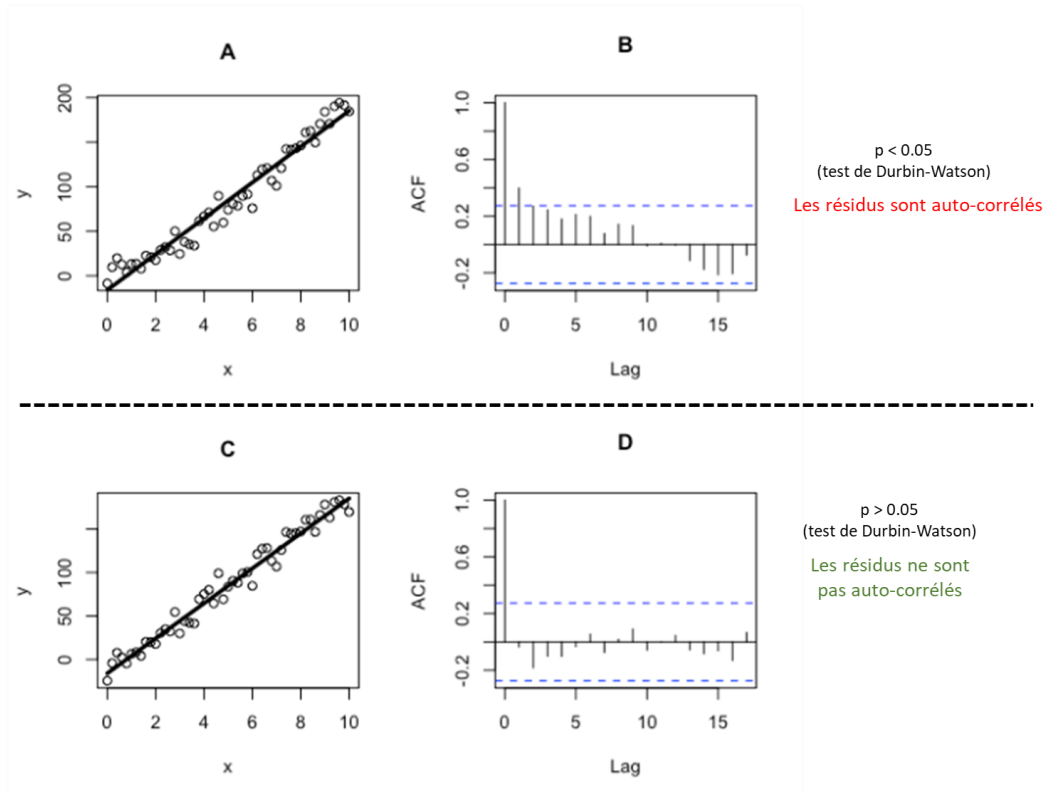


Figure 11 - Vérification de l'hypothèse d'autocorrélation des résidus de modèles linéaires ajustés aux deux jeux de données différents (figures en haut et en bas). Figures A et C : nuage des points et la droite ajustée décrivant une relation entre les variables x et y . Figures B et D : corrélogramme.

■ Homoscédasticité

On parle d'homoscédasticité lorsque la variance des résidus est homogène. Au contraire, si cette variance augmente ou diminue lorsque la variable explicative augmente, alors cette variance est hétérogène : on parle d'hétéroscedasticité. La condition d'homoscédasticité est nécessaire pour pouvoir valider un modèle de régression linéaire.

Deux exemples sont illustrés dans la figure 12. L'homoscédasticité peut se déceler sur les données brutes comme illustré dans les figures 12-A et 12-C. Elle peut être également évaluée en visualisant la répartition de la racine carré des résidus standardisés en fonction des valeurs de y calculées avec le modèle (figures 12 B et 12 D). Par exemple, dans la figure 12B, les valeurs semblent former un entonnoir caractéristique d'une hétéroscedasticité contrairement aux données de la figure 12D où la répartition des résidus standardisés est homogène, caractéristique d'une homoscédasticité. Enfin, l'homoscédasticité peut être également évaluée grâce au test de Breush-Pagan.

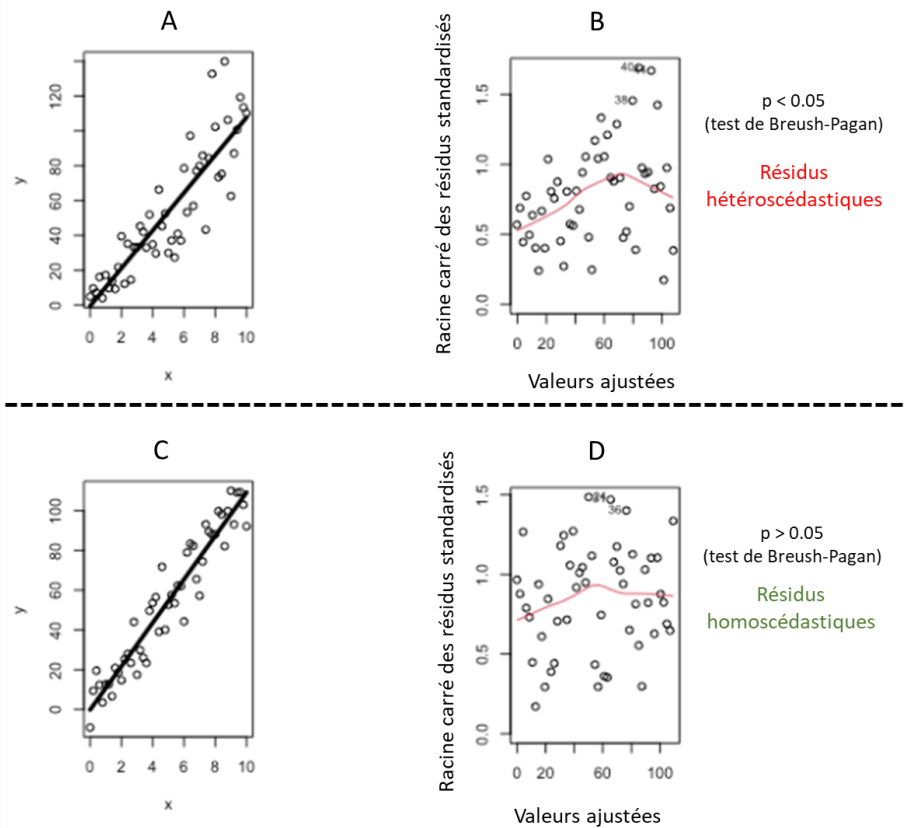


Figure 12 -Vérification de l'hypothèse d'homoscédasticité des résidus de modèles linéaires ajustés aux deux jeux de données différents (figures en haut et en bas). Figures A et C : nuage des points et la droite ajustée décrivant une relation entre les variables x et y . Figures B et D : répartition de la racine carrée des résidus standardisés en fonction des valeurs ajustées par le modèle linéaire.

b. Exemple / Cas d'étude

On considère l'exemple hypothétique où l'on souhaite évaluer l'effet d'un auxiliaire technologique (AT) pour décontaminer la surface de végétaux par rapport à un témoin neutre. Dans cette expérience simulée, on évalue plus précisément l'effet du temps de contact de l'AT avec les végétaux sur la cible microbiologique choisie qui est la Flore Aérobie Mésophile (FAM). L'expérience comporte deux modalités :

- "Essai" : utilisation d'un AT ;
- "Témoin-Eau" : témoin neutre sans utilisation d'AT.

Trois répétitions d'expériences indépendantes ($n = 3$) sont considérées (trois lots de végétaux différents, trois expériences de lavage différentes réalisées sur trois jours différents, le tout réalisé avec les mêmes équipements). Le dénombrement de la FAM associée aux végétaux est réalisé avec différents temps de contact avec l'eau de lavage selon une méthode conventionnelle de dénombrement bactérien. Cette dernière fait appel à la préparation d'une suspension mère, la réalisation de dilutions décimales puis comptage de colonies sur gélose de culture. La concentration bactérienne est exprimé en \log_{10} UFC.g⁻¹.

Selon ce plan d'expérience, un jeu de données artificielles a été généré par simulation avec le logiciel R et présenté dans la figure 13.

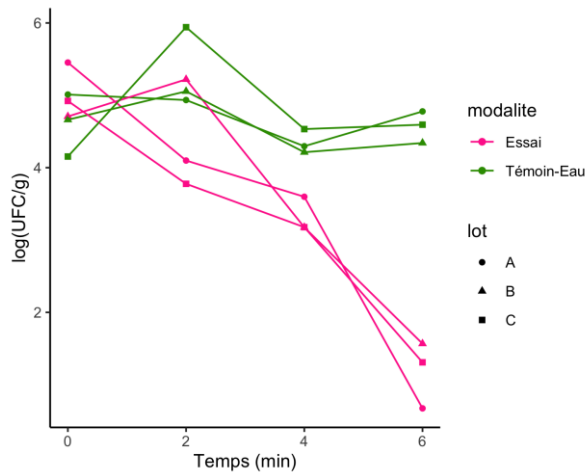


Figure 13 – Dénombrement de la Flore Aérobie Mésophile à la surface des végétaux en fonction du temps de contact avec l’eau de lavage contenant un AT (essai) ou avec de l’eau (témoin) (données fictives).

Les données sont caractérisées par une grande dispersion (figure 13). Elles semblent montrer une tendance de la FAM à décroître au cours du temps pour les modalités essai avec AT et témoin. Cette décroissance semble plus lente pour le témoin eau comparé à l’essai avec l’AT.

Pour pouvoir évaluer l’efficacité antimicrobienne de l’AT par rapport au témoin-eau, une approche de comparaison de modèles de régression linéaires est utilisée. Pour ce faire, deux modèles linéaires sont ajustés aux données correspondant aux deux modalités. L’évaluation de la différence entre ces modalités est effectuée en comparant les paramètres caractéristiques des droites ajustées avec une analyse de covariance (ANCOVA). Cette analyse permet de déterminer s’il existe une différence significative de pente ou d’ordonnée à l’origine entre les équations des droites ajustées.

Les étapes de l’analyse sont:

- Évaluation de la linéarité ;
- Construction du modèle ;
- Vérifier les conditions de validation du modèle de régression linéaire ;
- Analyse du modèle.

■ Construction du modèle linéaire

La représentation graphique des données semble suggérer une évolution de type linéaire (figure 13) pour chacune des modalités considérées. Dans le modèle ANCOVA à construire, on cherche à expliquer le suivi du dénombrement microbien par deux variables explicatives dont une variable quantitative qui est le temps de lavage et une variable qualitative qui est la modalité (essai ou témoin). Une des modalités de la variable qualitative est considérée comme modalité de référence. Dans notre cas d’étude, nous considérons la modalité “Essai (avec AT)” comme référence. (NB: En général, les logiciels de calcul tels que R prennent par défaut la première modalité présente dans le tableau de données comme référence.)

Les données observées semblent suggérer une réduction linéaire entre la concentration bactérienne et le temps de lavage, avec une vitesse de réduction potentiellement différente entre les deux modalités. Il serait donc pertinent de construire le modèle permettant la concentration bactérienne FAM_{ij} au cours du temps $temps_{ij}$ selon les différentes modalités comme suit:

$$FAM \sim temps + modalité + temps:modalité,$$

avec $temps:modalité$ correspondant à l’interaction entre les deux variables permettant de décrire la différence de la vitesse de réduction entre les modalités.

Le modèle peut être exprimé sous sa forme analytique décomposée avec ses paramètres comme suit:

$$FAM_{ij} = \mu + \alpha_i + (\gamma + \beta_i) \cdot \text{temps}_{ij} + \epsilon_{ij},;$$

avec les paramètres μ étant l'ordonnée à l'origine (appelé également « *intercept* ») associée à la modalité de référence du modèle (soit la modalité "essai"), α_i correspondant à l'écart entre la modalité i par rapport à la modalité de référence, γ correspondant à la pente décrivant la relation linéaire au cours du temps pour la modalité de référence du modèle s, β_i correspondant aux différences de la pentes entre les modalités et les erreurs résiduelles ϵ_{ij} supposée suivant une loi normale centrée sur 0.

En utilisant un outil de calcul (tel que R) pour ajuster le modèle à nos données, les paramètres du modèle peuvent être estimés (cf. tableau 6). Ces valeurs permettent de déterminer la droite ajustée aux données (voir représentation graphique figure 15)

Tableau 6 – Modèle ANCOVA : tableau d'analyse de covariance et estimation des paramètres du modèle.

Variables	Somme des carrés des écarts	Degrés de liberté	F-value	p-value
Temps de contact (min)	13,9882	1	45,15	p < 0.001
Modalité (témoin ou AT)	9,1696	1	29,59	p < 0.001
Interaction Temps de contact x Modalité	9,9257	1	32,03	p < 0.001
Erreurs résiduelles ϵ_{AT} et $\epsilon_{témoin}$ à chacun des temps de contact	6,1977	20		
Paramètres du modèle	Estimation	Erreur standard	t-value	p-value
<i>l'essai (avec AT) est utilisé comme référence</i>				
Intercept μ de l'essai avec AT (ou ordonnée à l'origine)	5,36037	0,26890	19,935	p < 0.001
Réduction logarithmique par temps de contact (min) γ (pente de la régression linéaire de l'essai avec AT)	-0,62902	0,07187	-8,753	p < 0.001
Modalité "Témoin-Eau" $\alpha_{témoin}$ (écart des régressions linéaires à l'intercept entre la modalité Eau par rapport à la modalité de référence AT)	-0,48939	0,38028	-1,287	0.218
Temps : Modalité "Témoin-Eau" $\beta_{témoin}$ (différence sur la pente des régressions linéaires entre la modalité Eau par rapport à la modalité de référence AT)	0,57520	0,10163	5,660	p < 0.001

NB : Pour chaque variable, les logiciels fournissent les estimations de F-value et t-value, permettant in fine d'estimer la p-value indiquant la significativité de chacune des variables explicatives (temps de contact et modalité).

■ Vérification des conditions de validation du modèle

Les conditions sur les résidus peuvent être vérifiées visuellement ainsi qu'à l'aide de tests statistiques comme illustré précédemment dans l'annexe 7.1. Dans la figure 14 ci-dessous :

- les résidus semblent suivre une loi normale centrée sur 0 (figure 13-A) ($p > 0,05$, test de Shapiro-Wilk),
- ils ne présentent pas d'autocorrélation (figure 13-B) ($p > 0,05$, test de Durbin-Watson),
- les résidus standardisés semblent être répartis de façon homogène et aléatoire (figure 13-C) ($p > 0,05$, test de Breush-Pagan).

Ces résultats suggèrent que les résidus respectent les conditions de validation du modèle.

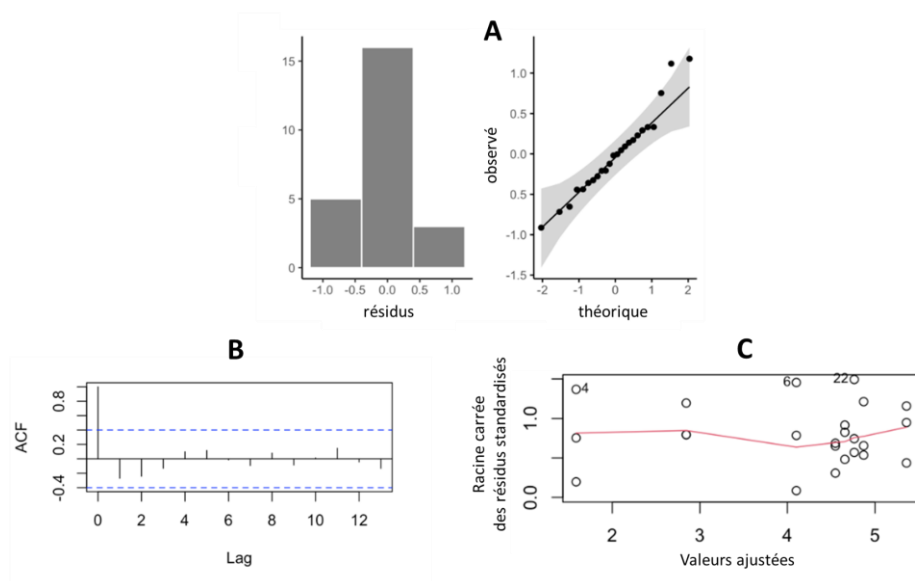


Figure 14 – Vérification des hypothèses sur les résidus associés au modèle de régression ANCOVA. Figures A : distribution des résidus et droite de Henry. Figure B : autocorrélation des résidus. Figure C : répartition des racines carrées des résidus standardisés en fonction des valeurs ajustées par le modèle.

L'ajustement du modèle aux données observées est présenté graphiquement (figure 15). Les droites ajustées sont présentées avec les paramètres estimés du modèle (tableau 6).

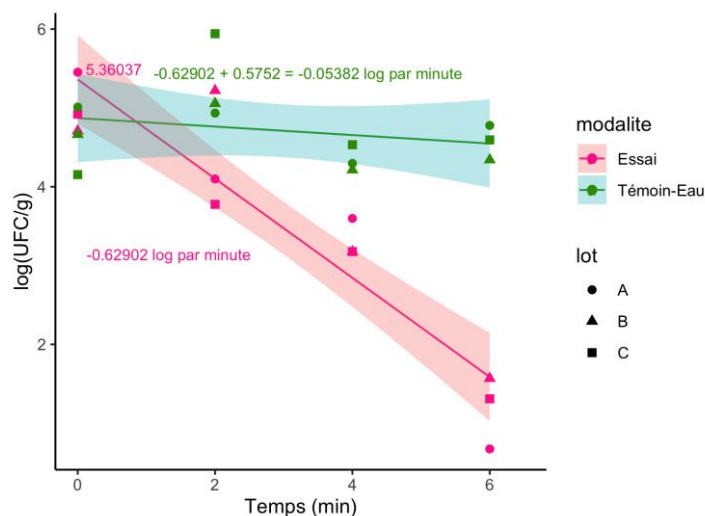


Figure 15 – Représentation graphique du modèle ANCOVA ajusté aux données observées correspondant à la concentration bactérienne des végétaux en fonction du temps de lavage avec deux modalités d'essai avec un témoin neutre (eau) et un nouvel auxiliaire technologique.

■ Analyse du modèle et résultats

Comme présenté dans le tableau 6 :

- La valeur de « l'intercept » μ correspond à l'ordonnée à l'origine de la modalité de référence du modèle, soit la modalité « Essai ». Elle indique que la FAM au début de l'expérience ($t = 0$) est estimée, compte-tenu de la variabilité inter-lot, à environ $5,4 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ (figure 15).
- Le paramètre correspondant à l'effet "Temps" γ correspond à la pente de l'évolution de la FAM au cours du temps pour la modalité de référence du modèle, soit la modalité « Essai ». Ainsi, **la concentration bactérienne diminue de $0,6 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ par une unité de temps (minutes) en présence de l'AT** (figure 15). Ce terme est significatif car la valeur p-value associée est inférieure à 5% (risque de première espèce fixé).
- Le paramètre « Témoin Eau » $\alpha_{\text{témoin}}$ correspond à l'écart entre le témoin et la modalité « Essai » au temps initial $t = 0$. Cet écart est estimé à $-0,48938 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$. Toutefois, les données observées au

temps $t = 0$ n'ont pas montré une significativité pour cet écart ($p > 0.05$). **Ainsi, comme attendu, il y aurait la même concentration en FAM au temps $t = 0$ pour les deux modalités.**

- Le paramètre « Temps - Modalité Témoin-Eau » $\beta_{\text{témoin}}$ correspond à la différence de pente entre les modalités « Essai » et « Témoin-Eau ». **La FAM décroît 0,5752 \log_{10} UFC $g^{-1} \text{ min}^{-1}$ de moins chez le témoin eau comparé à la modalité « Essai ».** La pente de la modalité « Témoin eau » est ainsi estimée à de $-0,05382 \log_{10} \text{ UFC } g^{-1} \text{ min}^{-1}$ (figure 15). Cette **différence est significative** puisque la p-value associée est inférieure à 5% (risque de première espèce fixé). Ainsi, le modèle suggère que, pour un temps de lavage de 6 minutes, la différence de FAM entre les deux modalités est estimée à $3,77 \log_{10} \text{ UFC} \cdot g^{-1}$.

Conclusion

L'AT permet donc bien de réduire la concentration en micro-organismes (FAM) au cours du temps de manière significative. Cette réduction est plus efficace lorsque le temps de contact est plus long.

Il est toutefois important de souligner que :

- le modèle construit est valable dans le domaine expérimental exploré. Dans cet exemple, le modèle ne peut être utilisé pour prédire l'effet de l'AT au-delà de 6 minutes ;
- l'utilisation de cette méthode pour une comparaison entre plus de deux modalités (e.g. un nouvel AT et deux témoins) nécessite des vérifications des conditions de validation complémentaires ainsi que d'autres tests « post-hoc » non montrés dans ce document ;
- comme mentionné dans les parties précédentes, les tests statistiques usuels sont généralement construits pour montrer une différence significative entre les différentes modalités étudiées. Par conséquent, même si la méthode comparative de modèles linéaires illustrée dans cet exemple a permis de montrer une efficacité antimicrobienne d'un AT par rapport à un témoin neutre, cette méthode n'est pas adaptée pour montrer une absence de différence entre, par exemple, une modalité « Essai - nouvel AT » et une modalité « AT actif de référence » dont l'efficacité serait la même.