Étude de la toxinogénèse de *Clostridium botulinum* type B au cours de la maturation de fromages à pâte molle

par

J. BILLON*, J. GUÉRIN** et M. SÉBALD***

Les cas de botulisme humain ayant pour origine l'ingestion de fromages sont exceptionnels dans la littérature (de 1914 à 1951 : dix-huit malades dont huit cas mortels aux U.S.A.) [2].

Trois foyers de botulisme sont survenus dans notre pays en 1973, 1977 et 1978.

Dans ces trois foyers les signes cliniques étaient ceux du botulisme ; les examens toxicologiques effectués sur les sérums des malades (deux foyers) et sur les fromages suspects (deux ou trois foyers) établissaient l'origine botulique de ces intoxications.

Il s'agissait dans tous les cas d'un botulisme de type B. Dans le dernier foyer observé a été isolée, à partir d'un fromage ingéré par les malades, une souche de *Clostridium botulinum* B (souche 83-0) ayant une température optimale de toxinogénèse de 12,5° C et dont la toxine est activable par la trypsine. Cette souche était associée à *Clostridium sporogenes* et à *Clostridium ghoni* dont les filtrats étaient également capables d'activer la toxine.

L'un de nous, avec Jouglard et Gilles avait, à la suite des deux premiers foyers de botulisme survenus en 1973, suspecté les paillons sur lesquels avaient été placés les fromages. Il avait été établi qu'un lot de paillons contaminés par des déjections d'animaux avait été vendu aux dépôts de fromages de Marseille et Lausanne, et c'était dans ces deux villes et le reste de la Suisse que les cas de botulisme humain avaient été constatés.

* Ministère de l'Agriculture, Direction de la Qualité, Services Vétérinaires, Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, 43, rue de Dantzig - 75015 Paris.

** Fromagerie Paul Renard - 89800 Chablis.

*** Laboratoire des Anaérobies, Institut Pasteur, 25, rue du Dr-Roux - 75015 Paris.

Dans le but de vérifier cette hypothèse, il a paru nécessaire de procéder d'une part à une fabrication effectuée à partir de lait et crèmeensemencés par les spores de *C. botulinum*, et d'autre part de montrer le rôle possible d'une contamination exogène à partir de paillons contaminés par cette même souche.

Deux séries d'expérimentation ont été effectuées pour parvenir à éclaircir le problème de la germination des spores et la toxinogénèse de *C. botulinum* B dans ces fromages. Elles ont été réalisées dans un atelier expérimental des fromageries Paul Renard avec toutes les précautions nécessaires pour éviter la contamination des productions normales et de l'environnement.

A. PREMIERE EXPERIMENTATION

I. Fabrication

Elle a été réalisée à partir d'une fabrication de vingt-quatre fromages pesant chacun 1 500 g environ, qui furent ensuite partagés en deux afin d'obtenir 48 échantillons au total. Cette fabrication fut effectuée avec 280 l d'un mélange de lait et de crème ; la moitié de cette quantité a été employée pour la préparation de douze fromages témoins (dont une partie a servi pour une deuxième étape de l'essai : contamination exogène par les paillons) et l'autre moitié a étéensemencée avec des spores de *Clostridium botulinum* B de façon à renfermer approximativement cinquante spores par litre de mélange et a permis de préparer douze autres fromages : (contamination endogène).

La préparation des spores de *C. botulinum* B qui a servi pour l'ensemencement du mélange lait-crème avant la pasteurisation, avait été débarrassée de sa toxine par 3 lavages successifs en eau physiologique, et des cellules végétatives viables, par un chauffage de 10 min à 80° C.

Dans les deux fabrications, témoin etensemencée, la pasteurisation a été assurée par un chauffage à + 75° C pendant 7 s, puis le mélange a été refroidi à + 41° C et envoyé dans une cuve dite de fromagerie pour recevoir la présure et coaguler. Le caillé, après fractionnement, a été réparti dans des moules pour l'égouttage, selon la technique habituelle de préparation de ces types de fromages. Les deux séries de fabrication ont été réalisées dans les mêmes conditions en respectant les délais jugés nécessaires par les professionnels.

Après l'égouttage, les fromages ont été extraits des moules, salés, puis affinés au « haloir », à une température variant entre + 12 et + 13° C pendant 14 j. Après le temps habituel pour cette fabrication (16 j après le début des opérations), les fromages ont été emballés sous papier et placés en stockage réfrigéré à + 4° C. La conservation

au froid a été poursuivie pendant 6 semaines, ce temps correspondant à la période normale d'entreposage avant la consommation. Après cette période les différents fromages des deux séries de fabrication ont été répartis en plusieurs lots, placés dans des conditions particulières de conservation de façon à étudier : d'une part l'incidence de différentes températures de conservation, sur la germination et la toxinogénèse de *C. botulinum*, et d'autre part, les effets d'une contamination exogène par des spores de *C. botulinum* B, sur certains fromages de la fabrication témoin.

Tous les locaux dans lesquels ont été entreposés les fromages avaient une hygrométrie de 90-92 p. 100 H.R.

Afin de tester l'influence d'une contamination exogène sur le développement des toxines, les fromages témoins ont été entreposés à différentes températures sur des paillons. Ces paillons avaient été stérilisés à l'autoclave puis séchés ; sur une partie de ceux-ci, une suspension de spores de *C. botulinum* B avait été pulvérisée de façon à répartir environ cinquante spores par cm².

Des fromages de la série témoin ont été entreposés, après retrait de l'emballage en papier, sur ces paillons, d'autres de la même série ont été entreposés sur des paillons stériles non contaminés.

II. Prélèvements

La toxinogénèse éventuelle des spores de *C. botulinum* (contaminations endogène et exogène) a été suivie au moyen de prélèvements adressés au Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire. Pendant la période d'entreposage à 4° C, les fromages de la fabrication expérimentale ont été analysés à l'emballage et 2, 4 et 6 semaines après celui-ci. Les fromages de la fabrication témoin ont été analysés à l'emballage et 6 semaines plus tard. Ensuite les produits ont été examinés aux temps précisés sur le tableau 2.

III. Méthodes analytiques

Sur chaque échantillon, nous avons déterminé le pH par électrode de pénétration, l'activité de l'eau (Aw) par l'appareil Lufft modèle 5803, et effectué la recherche de la toxine botulique selon la méthode classique [14] dont la partie concernant l'extraction était modifiée comme suit :

Après homogénéisation de la prise d'essai (50 g) dans 100 ml de tampon gélatine-phosphate, pH 6,2, on ajoute 0,1 p. 100 de trypsine en solution aqueuse. Les extraits, neutralisés ou non par le sérum antibotulique B étaient ensuite injectés à des lots de souris pesant 17 à 21 g. Sur certains échantillons, la numération des spores et formes végétatives de *C. botulinum* a été effectuée sur gélose V.L. additionnée de sang de mouton laqué (0,5 ml pour 15 ml de milieu gélosé).

Enfin, sur les premiers échantillons, des contrôles chimiques ont été réalisés : chlorures, ions sodium, potassium et calcium, nitrates et nitrites, matières azotées, matières grasses et matière sèche. Toutes ces déterminations ont été effectuées selon les méthodes décrites dans le « contrôle de la qualité des produits laitiers » [5].

IV. Résultats

1. Composition et mesures physico-chimiques

La composition des produits lors de l'emballage est rapportée dans le tableau 1.

TABLEAU 1

Composition chimique des fromages à l'emballage (16 j après fabrication)
première expérimentation

	Fabrication témoin	Fabrication expérimentale
Matières sèches p. 100	56,1	57,1
Matières grasses p. 100 du prod. sec	68,2	68,7
Matières azotées p. 100	13,7	14,1
Chlorures (en NaCl) p. 100	1,29	0,99
Na ⁺ (mg pour 100 g)	220	184
K ⁺ (mg pour 100 g)	114	108
Ca ⁺ (mg pour 100 g)	292	299
NO ₂ + NO ₃ (mg/kg exprimé en N)	1	1

L'évolution du pH et de l'Aw est indiquée dans le tableau 2.

Les fromages de la fabrication témoin, placés sur paillons contaminés ont subi la même évolution du pH et de l'Aw que ceux de la même fabrication placés sur paillons stériles ou emballés et entreposés aux mêmes températures.

Après la fin de la 8^e semaine d'entreposage, le pH, et, dans une certaine mesure, l'Aw, varient selon la température de conservation.

Les fromages de la fabrication expérimentale,ensemencés avec les spores de *C. botulinum*, ont montré une élévation du pH plus rapide que ceux de la fabrication témoin, cependant le pH n'a jamais dépassé 6,9.

TABLEAU 2

Evolution physicochimique et bactériologique des fromages stockés dans différentes conditions, après un temps de séjour de 6 semaines à 4° C

Fabrication	Age du fromage (1) en semaines	Température de stockage (2)	Durée de stockage (2)	pH	Aw	<i>Clostridium</i> /g	Toxine
Expérimentale	6	4° C	0	5,0-5,6	0,95-0,96		—
	7	12-13° C	1 sem	5,9-6,0	0,95		—
	8		2 sem	6,8-6,9	0,95		—
	9		3 sem	6,6-6,7	0,95	10 ² -10 ³	—
	10		4 sem	6,7-6,8	0,95	10 ⁵	—
	7	20° C	1 sem	6,3-6,85	0,975		5
	8		2 sem	6,6-6,9	0,95		—
	9		3 sem			10 ² -9-10 ³	—
	11		5 sem			9,1-10 ⁶	—
Témoin sur paillon contaminé	6	4° C	0	5,0-5,6	0,95-0,96		—
	7	12-13° C	1 sem	6,3	0,96		—
	8		2 sem	6,2-6,4	0,95		—
	9		3 sem	6,1	0,95	10	—
	10		4 sem	6,1-6,4	0,95		—
	7	20° C	1 sem	6,2	0,96		—
	8		2 sem	5,9-6,2	0,95		—
	9		3 sem			6-10 ²	—
Témoin	6	4° C	0	5,1-5,4	0,96-0,97		
	14		8 sem	5,0-5,6	0,95-0,96		

(1) Age du fromage depuis l'emballage (l'emballage a lieu 2 semaines après fabrication).

(2) Température et durée du stockage après un premier stockage de 6 semaines à 4° C.

2. Examens bactériologiques

Les résultats sont rapportés également dans le tableau 2 ; pour les premiers contrôles nous n'avons pas utilisé la technique décrite ci-dessus, aussi les résultats trouvés n'ont pas été tous relatés.

3. Recherche et dosage de la toxine botulique

Sur tous les échantillons reçus au laboratoire, quarante-deux au total, nous avons effectué la recherche de la toxine botulique sur des lots de souris pesant 17 à 21 g, après avoir effectué l'homogénéisation de la prise d'essai (50 g) dans 100 ml de tampon gélatine phosphate : pH 6,2 et ajouté 0,1 p. 100 de trypsine en solution aqueuse.

Un seul échantillon s'est révélé positif : fabrication expérimentale, conservé 7 j à + 20° C, la quantité de toxine était très faible ; le dosage, selon la méthode de Karber et Beerens, a montré que ce fromage renfermait 5 DL 50 souris par gramme.

Il est intéressant de noter que ce fromage présentait le pH le plus élevé de tous ceux que nous avons examinés : 6,85 ainsi que la valeur de l'Aw la plus haute : 0,975.

Discussion

Après cette première série d'essais nous voyons qu'il n'est pas facile d'induire expérimentalement la production de toxine par *C. botulinum* B dans les fromages à pâte molle.

Nous avons choisi de limiter la contamination à cinquante spores par litre de mélange lait + crème servant à la fabrication, et de contaminer par la même quantité de spores par cm² de paillon afin de rester dans les conditions raisonnables de contamination naturelle.

Il apparaît que le pH et l'Aw semblent favoriser le développement et la toxinogénèse de la souche de *C. botulinum* utilisée pour ces essais.

Le seul prélèvement dans lequel nous avons pu mettre en évidence une faible quantité de toxine était celui dont le pH et l'Aw étaient les plus élevés.

Par ailleurs, il avait été précisé, depuis le début de cette expérimentation, à la suite d'études faites au laboratoire, que la souche 83.0 de *Clostridium botulinum*, isolée d'un fromage à pâte molle à l'origine de la dernière intoxication de 1978, présentait des conditions optimales de toxinogénèse inusuelles, notamment en ce qui concernait la température, aussi fut-il décidé de procéder à une nouvelle série d'essais.

B. DEUXIEME EXPERIMENTATION

Protocole expérimental

L'étude de la souche 83.0 a montré que sa température optimale de toxinogénèse était de + 12,5° C. Par ailleurs avaient été mis en évidence le rôle du pH et de l'Aw, aussi nous avons envisagé une deuxième série d'essais où l'évolution des fromages après la période de fabrication se poursuivrait à + 12° C. Il a été décidé d'associer *Clostridium ghoni* 83 e à *C. botulinum* pour les raisons suivantes :

Cette souche a été isolée également dans les fromages à l'origine de la dernière intoxication botulique ; elle pouvait favoriser la croissance ou la germination de l'espèce toxinogénèse, ou encore activer « *in situ* » la toxine botulique. En effet, il a été montré par une étude au laboratoire (manuscrit en cours de rédaction) que la toxine produite par la souche 83.0 était activée « *in vitro* » soit par la trypsine à 0,1 p. 100, soit par un filtrat de *C. ghoni*. Par ailleurs, *C. ghoni*, protéolytique, pouvait également favoriser l'élévation rapide du pH avant que les valeurs d'Aw ne descendent au-dessous de 0,95. Afin de vérifier l'action inhibitrice du nitrite, nous avons ajouté à une partie du mélange lait-crème,ensemencée par des spores de *Clostridium botulinum*, 300 ppm de nitrate de sodium.

L'ensemencement a été effectué en incorporant 1 500 spores de *Clostridium botulinum* B et le même nombre de spores de *Clostridium ghoni* par litre du mélange lait-crème.

Les paillons ont été contaminés, après stérilisation, par la pulvérisation sur les deux faces d'une suspension de spores de *C. botulinum* B à raison de 1 000 spores par cm².

L'épreuve était donc beaucoup plus sévère que la précédente.

Les contrôles ont eu lieu de la même façon que pour les premiers essais, d'abord à la fin de la période de fabrication (16^e jour après la pasteurisation). Passé ce délai, les fromages des deux fabrications : témoin (= non ensemencée) et expérimentale (= ensemencée) ont été entreposés de la façon ci-après, ce qui a entraîné la distinction des lots suivants :

- lot A : fabrication expérimentale entreposée à + 12° C ;
- lot A' : fabrication expérimentale entreposée à + 4° C ;
- lot B : fabrication expérimentale + 300 ppm nitrate entreposée à + 12° C ;
- lot B' : fabrication expérimentale + 300 ppm nitrate entreposée à + 4° C ;
- lot C : fabrication témoin, entreposée à + 4° C ;

- lot C' : fabrication témoin, placée sur paillons non ensemencés à + 12° C ;
- lot D : fromages de la fabrication témoin, placés sur paillons ensemencés et entreposés à + 12° C.

Résultats

1. Dosages chimiques :

Les résultats analytiques sont regroupés dans le tableau 3.

TABLEAU 3

Composition chimique des fromages à l'emballage (16 j après fabrication)
deuxième expérimentation

	Lots A et C	Lot B
Matières sèches p. 100	52,5	52,8
Matières grasses p. 100 (sur extrait sec)	67,5	68
Chlorures (en NaCl) p. 100	1,5	1,7
Nitrates (en ppm)	2,5	28
Nitrites (en ppm)	0,3	9

Sur le vu de ces dosages on peut penser que la plus grande partie des nitrates ajoutés est passée, après solubilisation, dans le lactosérum exsudé après caillage du lait et qu'une part importante du restant a ensuite été transformée en nitrites sous l'effet de l'action réductrice de la flore bactérienne du fromage.

2. Mesures physico-chimiques

Les résultats sont rapportés dans le tableau 4. Nous voyons qu'à la fin de la période de fabrication (16^e jour), les valeurs de pH et d'Aw varient peu pour les trois lots : pH = 5,32 à 5,33 — Aw = 0,975.

Par la suite, le pH évolue assez lentement, il faut 7 semaines à + 12° C pour atteindre 7,0. Les fromages du lot B ont un pH toujours un peu plus élevé que ceux des lots A et C, ceux du lot D évoluent plus rapidement vers l'alcalinité et le pH atteint 8,0 après 8 semaines à + 12° C.

Par contre les valeurs de l'Aw sont assez constantes.

3. Examens bactériologiques

Les résultats sont rapportés également dans le tableau 4.

TABLEAU 4
Deuxième expérimentation

Délai après la fabrication	1 j		15 j d'entreposage						7 semaines d'entreposage							
Durée et température d'entreposage	Haloïr (+ 12-13° C)		+ 12° C				+ 4° C		+ 12° C				+ 4° C			
Lots	A	B	A	B	C'	D	A'	B'	C	A	B	C'	D	A'	B'	C
pH	5,32	5,33	5,68	5,98	5,74	6,15	6,15	6,41	6,07	6,90	6,94	7,03	7,28	6,08	6,82	6,37
Aw	0,975	0,975	0,955	0,955	0,955	0,965	0,945	0,945	0,950	0,950	0,950	0,950	0,975	0,950	0,950	0,950
Numération des clostridiales par g	5×10 ³	5×10 ³	6×10 ⁶	2,4×10 ⁷	2×10 ⁵	1,8×10 ⁵	1,5×10 ⁵	1,8×10 ⁵	6×10 ⁴	7×10 ⁷	6×10 ⁷	3×10 ⁵	6,5×10 ⁷	3×10 ⁵	2,5×10 ⁵	2,8×10 ⁴
Toxine B présence dosage	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	+ croûte 300 DL 50 900 DMM	—	—	—

TABLEAU 4
Deuxième expérimentation (suite)

Délai après la fabrication	9 semaines d'entreposage							11 semaines d'entreposage						
Durée et température d'entreposage	+ 12° C				+ 4° C			+ 12° C				+ 4° C		
Lots	A	B	C'	D	A'	B'	C	A	B	C'	D	A'	B'	C
pH	7,20	7,36	7,31	8,04	6,35	6,89	6,46	7,42	7,94	7,47	8,02	7,03	7,36	7,08
Aw	0,972	0,960	0,965	0,965	0,950	0,965	0,965	0,950	0,950	0,960	0,965	0,955	0,950	0,945
Numération des clostridiales par g	6×10^7	5×10^7	2×10^5	6×10^7	2×10^6	$1,3 \times 10^6$	$2,9 \times 10^5$	$4,8 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$5,1 \times 10^6$	$6,3 \times 10^7$	3×10^7	$1,2 \times 10^7$	$2,4 \times 10^5$
Toxine B présence dosage	—	—	—	+ croûte 30 DL 50 90 DMM	—	—	—	—	—	—	+ croûte 3 DMM	—	—	—

Les chiffres donnés concernent les numérations de spores et de formes végétatives de *Clostridium*, le milieu gélose VL + sang laqué n'étant pas sélectif pour *C. botulinum*.

Le nombre élevé de *Clostridium* trouvé à partir du 15^e j d'entreposage, nombre attendu étant donné l'importance de l'ensemencement initial du produit pour des lots A et B, n'entraîne pas nécessairement la présence de toxine en quantités décelables comme nous allons le voir ci-dessous : ce nombre élevé pourrait donc correspondre au développement de *C. ghoni*.

4. Recherche et dosage de la toxine botulique

Les résultats suivants ont été obtenus :

- Après 16 j de fabrication et de maturation, de même après 15 j d'entreposage à + 12° C et + 4° C : recherche de toxine négative pour tous les échantillons.

- Après 7 semaines d'entreposage à + 12° C nous avons révélé la présence de toxine botulique de type B dans la croûte des fromages du lot D ; le titre en était de 300 DL 50 souris/g ou 900 DMM souris/g. Les échantillons des autres lots étaient négatifs ainsi que la pâte du fromage du lot D.

- Après 9 semaines : présence de toxine dans la croûte du lot D, le titre en était cette fois de 30 DL souris/g ou 90 DMM souris/g, absence de toxine dans la pâte du lot D et dans les échantillons des autres lots.

- Après 11 semaines : présence de toxine dans la croûte du lot D, à la limite de détection, environ 3 DMM souris/g ; absence dans la pâte du même lot et dans les autres échantillons.

Les chiffres exprimant les doses de toxine relevés dans ce lot D après 7,9 et 11 semaines d'entreposage ont été trouvés à partir de fromages différents, mais ils suggèrent une diminution des titres en toxine au cours du stockage, dans cette expérience.

Le fromage qui présentait la quantité de toxine la plus élevée était celui du lot D qui avait été entreposé sur paillons ensemencé et conservé 7 semaines à + 12° C. Il faut noter que ce fromage avait un pH de 7,28 et un Aw de 0,975 au niveau de la croûte.

Ce fromage a alors été entreposé à + 4° C et nous avons constaté que la quantité de toxine diminuait avec le temps :

- Après 7 jours = 120 DL 50 souris/g de croûte.
- Après 14 jours = 90 DL 50 souris/g de croûte.
- Après 28 jours = 30 DL 50 souris/g de croûte.

L'évolution de la toxinogénèse peut suivre une courbe ascendante pendant quelques semaines, puis la toxine qui est une protéine glo-

bulaire est susceptible d'être altérée par le milieu, surtout lorsque celui-ci est le siège d'un développement microbien et d'une activité enzymatique importante.

CONCLUSION

Ces deux séries d'expérimentation montrent que l'ensemencement, même très important de la matière première (lait et crème) n'entraîne pas la formation de toxine botulique au cours des fabrications normales (délai 14 à 16 jours).

Passé ce délai, si les fromages sont conservés au froid (+ 4° C), il n'y a pas de formation de toxine en quantité appréciable, même si le taux de *Clostridium botulinum* dans la pâte est important.

Nous avons trouvé, au cours de la première expérimentation, de faibles quantités de toxine dans un fromage entreposé à + 20° C et ensemencé initialement par un nombre peu élevé de spores de *C. botulinum*, ce fromage présentait des valeurs de pH et d'Aw élevées.

Les conditions de conservation étaient très sévères et anormales. Le produit présentait un aspect et une odeur de fromage trop fermenté qui le rendaient peu appétant.

Par contre, dans la deuxième expérimentation nous avons vu la toxine se développer très facilement au niveau de la croûte des fromages entreposés sur paillons contaminés à température favorable et à degré hygrométrique élevé.

Nos résultats ont été obtenus en associant à une souche de *C. botulinum* isolée d'un fromage botulique une souche de *C. ghoni* qui lui était associée dans cet aliment incriminé.

Cette association, de par l'activité protéolytique de *C. ghoni* pouvait laisser espérer une protéolyse accélérée du produit et une élévation rapide du pH ce qui aurait pu favoriser la toxinogénèse. En fait l'évolution du pH des produits est comparable dans les différents lots. Seuls les produits entreposés sur paillons contaminés ont présenté une élévation plus rapide.

En l'absence de production de toxine dans les lots A et B on ne peut conclure à un rôle quelconque de *C. ghoni* dans le développement de *C. botulinum* ou l'expression de sa toxinogénèse.

La présence de toxine en quantité élevée dans la croûte de fromage du lot D après 7 semaines d'entreposage à + 12° C montre que, dans des conditions expérimentales voisines de celles que l'on rencontre parfois dans certains entrepôts (température, Aw, pH), *Clostridium botulinum* est capable, à partir de paillons contaminés, de se développer dans la croûte d'un fromage à pâte molle et de produire de la toxine qui diffuse dans le produit. La dose de toxine produite est élevée à 7 et 9 semaines, et diminue fortement à 11

semaines, ce qui laisse supposer une inactivation secondaire de la toxine par les enzymes protéolytiques contenues dans le fromage.

Les travaux effectués en parallèle à cette expérimentation ont permis de définir la température optimale de 12,5° C pour la toxinogénèse par *C. botulinum* B. Cette température a été retenue pour effectuer le stockage de la deuxième expérimentation afin de favoriser la toxinogénèse, mais ne correspond pas à la température normale de stockage des fromages à pâte molle, qui est généralement de 4 à 7° C.

Nous n'avons pas retrouvé de toxine botulique dans la pâte des fromages, mais il est évident que nos conditions expérimentales étaient voisines mais différentes des conditions dans lesquelles se sont trouvés les fromages à l'origine des intoxications botuliques (taux de contamination, associations microbiennes, etc.).

Les fromages fabriqués avec du laitensemencé massivement en spores de *C. botulinum* n'ont pas permis de déceler la présence de toxine.

Cette expérimentation confirme les observations qui avaient été effectuées lors des dernières intoxications botuliques enregistrées en 1973 à Marseille et en Suisse [1, 3] et en 1978 à St-Etienne. En effet, dans chaque cas, l'intoxication a été attribuée à des fromages à pâte molle ayant été affinés sur des paillons. Par contre la toxinogénèse n'a pu être induite expérimentalement dans des produits contenant des spores de *C. botulinum* B et entreposés dans des conditions normales (produits emballés dans du papier et entreposés à 4° C).

Il va de soi que l'entreposage et l'exposition en vue de la vente des fromages à pâte molle sur paillons non stérilisés au préalable doit être proscrite.

Résumé

Des fromages à pâte molle ont été fabriqués après ensemencement du lait par des spores de *Clostridium botulinum* et de *Clostridium ghoni*. Des fromages témoins, fabriqués avec du lait nonensemencé ont été entreposés sur des paillons stériles contaminés avec une suspension de spores de *Clostridium botulinum* B. Tous ces fromages ont été entreposés à différentes températures (4° C, 12° C, 20° C) pendant 11 semaines. La recherche de toxine botulique dans les produits pendant toute cette période de stockage a montré que malgré un ensemencement massif (1 500 spores par litre de lait) la toxine n'apparaît pas. Par contre, le stockage de fromages nonensemencés sur des paillons contaminés, à raison de 1 000 spores par cm², a entraîné la formation de toxine botulique dans la croûte, mais pas dans la pâte. La toxine formée disparaît progressivement pour redevenir indétectable un mois après la teneur maximale.

Summary

STUDIES ON TOXINOGENESIS OF *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* TYPE B DURING MATURATION OF SOFT CHEESE

Soft cheese was made from milk inoculated with spores of *Clostridium botulinum* and *Clostridium ghoni*. For comparison cheeses made from uninoculated milk were stored on sterile straw inoculated with a suspension of spores of *Clostridium botulinum* B.

All the cheeses were kept in store at different temperatures (4° C, 12° C and 20° C) for eleven weeks. Examination for botulism toxin in the cheeses during the storage period demonstrated that the toxin did not appear despite a massive inoculation (1 500 spores/l of milk). The storage of normal cheese on contaminated straw (1 000 spores/cm²) led to the production of toxin in the rind but not in the body of the cheese.

The toxin formed disappeared gradually to become undetectable one month after the maximum level had been attained.

Reçu pour publication en mars 1980.

Bibliographie

- [1] GILLES (G.), JOUGLARD (J.) et SEBALD (M.) (1974). — Sur une épidémie de botulisme humaine. Enquête et hypothèse étiologiques : rôle possible du fromage et des paillons. *Bull. Acad. Vét.*, 47, 165-172.
- [2] SEBALD (M.), JOUGLARD (J.) et GILLES (G.) (1974). — Botulisme humain de type B après ingestion de fromage. *Ann. Microb. (Inst. Pasteur)*, 125 A, 349-357.
- [3] SEBALD (M.) et JOUGLARD (J.) (1977). — Aspects actuels du botulisme. *Revue du Praticien*, 27, 3, 173-175.
- [4] PANTALÉON (J.), BILLON (J.), GILLES (G.), LE TURDU (P.) et ROSSET (R.) (1970). — Hygiène des denrées animales et d'origine animale. Techniques de laboratoire. Imprimerie Commerciale de Douai (Nord).
- [5] SERRES (L.), AMARIGLIO (S.) et PETRANSXIÈNE (D.) (1973). — Contrôle de la qualité des produits laitiers. Tome I. Analyse physique et chimique. Imprimerie Commerciale de Douai (Nord).