



Bulletin épidémiologique Santé animale - alimentation

Mai 2015/numéro 68

Spécial Vigilance sur
la chaîne alimentaire

- 3 Dispositif de surveillance et de vigilance à l'égard des aliments importés de pays tiers
- 5 Brève. Stratégie européenne en matière de vigilance
- 6 Brève. Dispositifs nationaux de surveillance officielle
- 7 Identification de risques chimiques émergents dans l'alimentation humaine et animale
- 9 La nutrivi-gilance
- 11 Vigilance à l'égard des salmonelles isolées de la chaîne alimentaire
- 17 Retour d'expérience sur l'épidémie liée aux graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4
- 21 *Vibrio* impliqués en pathologie humaine
- 26 Les virus entériques dans les aliments : comment passer de la vigilance à la surveillance ?
- 31 Vigilance, veille et surveillance des risques alimentaires phycotoxiques
- 35 Brève. Les plans de contrôles et de surveillance nationaux en filière bovine pour la recherche de résidus d'antibiotiques
- 37 Les ions perchlorate
- 39 Brève. Gestion de l'impact environnemental et sanitaire en situation post-accidentelle
- 39 Brève. Mutualisation des autocontrôles des contaminants en filière céréalière
- 40 Surveillance des expositions alimentaires aux résidus de pesticides
- 46 Les études de l'alimentation totale en France
- 48 La plateforme IdentyPath de l'Anses
- 50 Brève. Détection statistique d'événements inhabituels à partir d'un système de surveillance
- 52 Attribution de source, un formidable outil de santé publique
- 55 Quelle parade aux nouveaux promoteurs de croissance en élevage

ÉDITORIAL

Ce numéro spécial décrit les dispositifs de vigilance sur la chaîne alimentaire et les met en perspective par rapport aux dispositifs de surveillance encadrés par des textes réglementaires spécifiques (par ex. surveillance des zoonoses, surveillance des contaminants chimiques). Il est complémentaire du numéro 50 (mai 2012) qui décrivait les dispositifs de surveillance de la chaîne alimentaire (<https://pro.anses.fr/bulletin-epidemiologique/Documents/BEP-mg-BE50.pdf>).

La surveillance permet une collecte régulière de données afin de répondre à des besoins d'évaluation des risques et *in fine*, d'adopter des mesures appropriées pour la gestion de situations à risque connues. La mise en place de dispositif de surveillance est donc une démarche *a posteriori*. Elle incombe aux exploitants et aux autorités sanitaires, notamment en termes de vérification de la conformité à la législation alimentaire et de détection des situations non maîtrisées.

La vigilance vise la détection de situations ponctuelles considérées comme potentiellement dangereuses pour le consommateur. Les dispositifs doivent contribuer à la détection de nouveaux contaminants ou de phénomènes émergents. La mise en place de dispositifs de vigilance est donc une démarche *a priori*. Selon les prescriptions générales du Paquet hygiène, cette responsabilité incombe explicitement aux autorités nationales (article 34 du règlement 178/2002). Les exploitants n'échappent cependant pas complètement à cette exigence, dans la mesure où ils sont les premiers responsables de la sécurité des produits mis sur le marché ; les procédures fondées sur les principes HACCP incluent par définition une veille à l'égard des nouveaux dangers à considérer dans les plans de maîtrise sanitaire.

Dans le domaine des contaminants microbiologiques, si la survenue des cas humains apparaît souvent comme le déclenchement d'actions à mettre en œuvre sur la chaîne alimentaire, des dispositifs de détection des contaminants le plus tôt possible sur la chaîne alimentaire permettraient de réduire le nombre de ces cas humains. Dans le domaine des contaminants chimiques, il convient d'avoir une approche plus ouverte sur les contaminants à rechercher, en l'absence de risques aigus, sans avoir pour autant la capacité de tout surveiller. L'activité de vigilance doit ainsi permettre de détecter, sur des périodes de temps variables, des situations inhabituelles, tout en garantissant des mesures de gestion proportionnées au risque, dans des délais appropriés.

Dans cette perspective, une démarche analytique performante combinée à des méthodes innovantes d'analyse de données sont en faveur de la caractérisation des nouveaux contaminants, ou de nouvelles voies de contamination. De plus, il convient de privilégier les espaces de mutualisation afin de repérer des signaux faibles qui ne seraient pas détectés par les dispositifs pris individuellement. L'optimisation d'une telle démarche repose sur les interactions entre les acteurs en charge de la surveillance de la santé animale, humaine et de la sécurité sanitaire des aliments. En effet, la politique de sécurité sanitaire de l'alimentation, incluant notamment les activités de vigilance, doit s'appuyer sur une évaluation globale, intégrant les aliments, les animaux et l'Homme. Ainsi des signaux détectés dans un secteur peuvent contribuer à l'orientation des activités de vigilance des autres secteurs, pour éviter l'apparition ou le développement de situations à risque.

L'évaluation des risques apparaît au cœur de l'activité de vigilance, qui doit également s'accompagner de travaux de recherche, pour que les mesures de gestion soient définies dans les meilleurs délais et qu'elles soient proportionnées au risque.

Les articles présentés dans ce numéro illustrent plusieurs dispositifs et méthodes contribuant à la vigilance par les pouvoirs publics et les opérateurs de la chaîne alimentaire vis-à-vis de contaminants microbiologiques ou chimiques, au niveau national et européen.

L'édition de ce numéro spécial a en outre permis de constater que la mise en place de dispositifs de vigilance sur la chaîne alimentaire repose sur des fondements scientifiques et techniques plus ou moins développés. La perspective d'optimiser ces dispositifs illustre l'intérêt d'un espace de concertation dédié à l'épidémiologie dans le domaine de la sécurité sanitaire des aliments.

Le comité éditorial *ad hoc*

SOMMAIRE DÉTAILLÉ *TABLE OF CONTENTS*

Spécial vigilance sur la chaîne alimentaire

I. Contexte général : dispositifs nationaux et internationaux pour la vigilance vis-à-vis de la sécurité sanitaire des aliments	
3	Le dispositif de surveillance et de vigilance à l'égard des aliments destinés à l'alimentation humaine importés de pays tiers <i>Monitoring and vigilance of food imported from non-EU countries</i>
5	Brève. Stratégie européenne en matière de vigilance vis-à-vis de la sécurité microbiologique des aliments <i>Short item. European vigilance strategy for microbiological food safety</i>
6	Brève. Les plans de surveillance et les plans de contrôle au service de la vigilance sanitaire des aliments <i>Short item. Food safety surveillance and control programmes</i>
7	L'autorité européenne de sécurité des aliments initie une procédure systématique pour l'identification de risques chimiques émergents dans l'alimentation humaine et animale <i>The European food safety authority launches a systematic procedure for the identification of emerging chemical risks in food and feed</i>
9	La nutrivigilance <i>Nutrivigilance</i>
II. Illustrations relatives aux détections d'émergence de contaminants microbiologiques	
11	Surveillance de <i>Salmonella</i> dans la chaîne alimentaire pour la détection d'émergences en France <i>Surveillance of Salmonella in the agro-food chain for outbreak detection in France</i>
17	Questions et leçons clefs tirées de l'épidémie française de 2011 liée aux graines germées contaminées par <i>E. coli</i> O104:H4 <i>Feedback report on the 2011 outbreak due to sprouts contaminated by E. coli O104:H4</i>
21	<i>Vibrio</i> impliqués en pathologie humaine : une étude de leur répartition dans des produits de la mer consommés en France <i>Vibrio bacteria involved in human pathology: a study of their distribution in seafood consumed in France</i>
26	Évaluation du danger viral dans les matrices alimentaires <i>Viral hazard assessment in food matrices</i>
31	Vigilance, veille et surveillance des risques alimentaires phycotoxiques <i>Monitoring and surveillance of phycotoxin food risks</i>
III. Illustrations relatives aux détections d'émergence de contaminants chimiques	
35	Brève. Les plans de contrôles et de surveillance nationaux en filière bovine pour la recherche de résidus d'antibiotiques <i>Short item. National control and surveillance programmes in the bovine sector for detection of antimicrobial residues</i>
37	Exemple de gestion des risques liés à un contaminant émergent des denrées alimentaires: les ions perchlorate <i>Example of risk management for perchlorate, an emerging contaminant in foodstuffs</i>
39	Brève. Guide de gestion de l'impact environnemental et sanitaire en situation post-accidentelle <i>Short item. Guide to environmental and health effect management in post-accidental situations</i>
39	Brève. Comment la mise en commun des résultats d'analyse sanitaire permet d'exercer une vigilance nationale dans la filière céréalière ? <i>Short item. How does the pooling of analysis results support national vigilance in the grain sector?</i>
40	Surveillance des expositions alimentaires aux résidus de pesticides: des indicateurs de risque pour le suivi et l'orientation des programmes nationaux de surveillance et du plan Ecophyto <i>Monitoring of dietary exposures to pesticide residues: risk indicators for the monitoring and guidance of national monitoring programs and the Ecophyto action plan</i>
46	Les études de l'alimentation totale en France <i>Total Diet Studies in France</i>
IV. Outils analytiques au service de la vigilance	
48	La plateforme IdentityPath de l'Anses : une plateforme nationale d'identification et de typage des agents pathogènes basée sur le développement des approches de séquençage NGS, de qPCR haut et moyen débits <i>ANSES's IdentityPath: a French platform for the identification and typing of pathogens based on Next Generation Sequencing and high- and mid-throughput qPCR</i>
50	Brève. Détection statistique d'événements inhabituels à partir d'un système de surveillance <i>Short item. Statistical detection of unusual events from a surveillance system</i>
52	Attribution de source des zoonoses alimentaires: quantifier la contribution de sources multiples aux infections humaines <i>Source attribution of foodborne zoonoses: quantifying the contribution of several sources to the human burden</i>
55	Vers des stratégies analytiques globales et non ciblées de recherche de résidus de substances interdites en élevage <i>Towards global and untargeted analytical strategies to screen for banned substance residues in livestock</i>

Le dispositif de surveillance et de vigilance à l'égard des aliments destinés à l'alimentation humaine importés de pays tiers

Matthieu Vicaire (1) (matthieu.vicaire@agriculture.gouv.fr), Claire Servoz (2)

(1) Direction générale de l'alimentation, Service d'inspection vétérinaire et phytosanitaire aux frontières (SIVEP), Paris, France

(2) Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Bureau B2, Paris, France

Résumé

Le dispositif de surveillance et de vigilance à l'égard des aliments importés de pays tiers dépend du type de produit. Pour les denrées d'origine animale, des prélèvements aléatoires sont effectués sur 3 % des lots, afin de vérifier que les produits respectent bien la législation européenne. Ces analyses concernent des contaminants environnementaux, chimiques ou microbiologiques. Certains établissements étrangers font eux l'objet de contrôles renforcés. Suite à une non-conformité, tous les lots similaires provenant de cet établissement sont analysés. Enfin, les clauses de sauvegarde impliquant non pas un établissement, mais un pays tiers dans son ensemble, entraînent une fréquence de prélèvements sur une catégorie de produits plus élevée (allant jusqu'à 100 %) que dans le cadre des contrôles aléatoires. Dans les deux derniers cas, le lot est bloqué sous douane en attente du résultat d'analyse, et ne peut être mis sur le marché uniquement que si le résultat est favorable.

Pour les denrées d'origine non animale, le dispositif est lui aussi décliné en trois types de prélèvements. On retrouve le principe des contrôles aléatoires, des contrôles renforcés et des clauses de sauvegarde. Les contrôles renforcés s'appliquent à un pays donné, pour un produit et un contaminant donnés. Les clauses de sauvegarde, au même titre que celles concernant les produits d'origine animale, amènent des analyses à une fréquence plus élevée que les contrôles aléatoires (jusqu'à 100 %). Là encore, dans ces deux derniers cas, le lot est bloqué sous douane en attente du résultat de l'analyse.

Mots-clés

Aliments, importation, surveillance, contrôles

Abstract

Monitoring and vigilance of food imported from non-EU countries

The method used for surveillance and monitoring of foods imported from non-EU countries depends on the product. For animal-based products, samples are taken on 3% of batches to check that these products comply with European regulations. Samples are taken on a random basis, in order to detect chemical, microbiological or environmental residues. Some foreign companies undergo reinforced checks. Following a case of non-compliance, each similar batch is sampled. In contrast, when a safeguard clause involving an entire non-EU country rather than a single company is applied, the sampling rate is higher than the rate used for random sampling (up to 100%). For the last two procedures, the batch is blocked (in a customs warehouse) until the analysis result is known. It is released only if there is a compliant outcome for the sample.

For non-animal-based products, three sampling methods are possible. Samples can be taken on a random basis, using the reinforced method, or based on the safeguard clause. Reinforced checks involve an entire country for a specific kind of product and a specific contaminant. As for animal-based products, safeguard measures imply an increase of the rate of sampling, which is higher than in random sampling (up to 100%). For both reinforced checks and safeguard measures, the batch is blocked at customs until the sampling result is known.

Keywords

Food, Import, Surveillance, Checks

Les aliments destinés à la consommation humaine provenant de pays tiers font l'objet de contrôles avant leur dédouanement. Ces contrôles peuvent comporter des prélèvements afin de rechercher divers contaminants. Il convient de distinguer les aliments d'origine animale, contrôlés par le ministère de l'Agriculture, de ceux d'origine non animale (végétaux), contrôlés par le ministère de l'Économie et des Finances.

Aliments d'origine animale (viandes, produits laitiers...)

Tous les pays tiers ne sont pas autorisés à exporter vers l'Union européenne (UE). En effet, ils doivent d'abord soumettre à l'UE un plan de contrôle des contaminants (cette dernière, après approbation du plan, effectue des audits de vérification). Les principales bases réglementaires régissant les contrôles à l'importation de ces denrées sont la directive 97/78/CE et le règlement CE 136/2004. Il existe cependant de nombreux autres textes.

Les produits autorisés font l'objet d'un contrôle systématique en poste d'inspection frontalier (PIF) lors de leur introduction sur le territoire de l'UE. Chaque lot donne lieu à un contrôle documentaire (contrôle du certificat sanitaire délivré par le pays expéditeur, décrivant notamment

la marchandise, l'établissement d'origine...) et d'identité (vérification de la conformité entre le lot et le certificat sanitaire). Le cas échéant, un contrôle physique (par ex. prise de température) est réalisé.

Certains lots font l'objet de prélèvements pour analyse, selon trois modalités distinctes : des contrôles aléatoires, des contrôles renforcés et l'application de clauses de sauvegarde.

Les analyses réalisées consistent à rechercher des contaminants environnementaux (métaux lourds...), microbiologiques (*Listeria monocytogenes*...), ou relevant des pratiques d'élevage (résidus d'antibiotiques...).

Contrôles aléatoires

Ils sont réalisés sur 3 % des lots importés (objectif européen auquel doivent s'astreindre tous les États membres), et visent à vérifier que les lots sont bien conformes à la législation européenne. Ils s'inscrivent dans un système plus large consistant à s'assurer de la conformité des produits (approbation des plans des contaminants et audits mentionnés en introduction).

Ces lots sont dédouanés avant que les résultats d'analyses soient connus. En cas de résultat non conforme, le lot est rappelé pour être détruit. Une notification est alors réalisée sur le Réseau d'alerte rapide

européen (RASFF), afin d'informer les autres États membres, mais aussi le pays exportateur. L'établissement d'origine du lot est alors placé en contrôle renforcé. En France, lors de l'année 2013, 3,4 % des lots importés ont été prélevés (soit 12 381 lots prélevés, avec en moyenne 3 analyses par lot), onze analyses se sont révélées être non conformes (soit 0,3 % des analyses). La majorité des non-conformités portait sur le taux de métaux lourds.

Contrôles renforcés

Suite à un résultat non conforme, un établissement d'un pays tiers voit chacun de ses lots similaires (produit, poids) faire l'objet de contrôles systématiques au niveau européen (recherche du résidu initialement détecté). Pour lever le contrôle renforcé, les produits provenant de cet établissement doivent faire l'objet de dix analyses conformes consécutives.

Au-delà de deux résultats non conformes, l'établissement est placé en contrôle imposé. Il y a alors un contrôle systématique de tous les lots provenant de cet établissement en attendant que le pays tiers fournisse des éléments suffisants quant aux mesures correctives apportées. Si la situation ne s'améliore pas, l'établissement peut être radié de la liste des établissements agréés (c'est-à-dire autorisés), et ne peut alors plus exporter vers l'UE.

Clauses de sauvegarde

Elles sont prises suite à des non-conformités répétées concernant des lots en provenance d'un pays donné, et sont décidées au niveau européen. Elles sont définies à l'article 22 de la directive 97/78/CE. Elles entraînent des prélèvements à des taux supérieurs à ceux réalisés dans le cadre des contrôles aléatoires pouvant aller jusqu'à des prélèvements systématiques. La clause de sauvegarde concerne un pays, pour un type de produit (recherches faites sur tous les lots provenant d'un même pays). Le pays concerné peut perdre son autorisation d'exporter vers l'UE en cas de non-conformités répétées.

Quatre clauses de sauvegarde sont en vigueur pour des trios produits/pays de provenance/types de résidus:

- produits de la pêche issus de l'aquaculture d'Inde (substances pharmacologiquement actives),
- viande équine en provenance du Mexique (substances à effet hormonal),
- crustacés du Bangladesh (substances pharmacologiquement actives),
- tout produit d'origine animale de Chine (chloramphénicol, nitrofuranes).

Seuls les analytes disposant d'un seuil légal (Limite maximale de référence ou LMR) peuvent faire l'objet de mesures lors d'un résultat non conforme. Certaines analyses peuvent néanmoins être effectuées à titre de recherche, d'étude de risque (toxoplasmose dans la viande équine...).

Aliments d'origine non-animale

Il s'agit des aliments d'origine végétale (fruits, légumes). Le dispositif est fondé sur le risque, et repose sur la mise en œuvre:

- du règlement CE 882/2004 relatif aux contrôles officiels et plus particulièrement de son article 15.5 prévoyant l'établissement d'une liste de denrées qui sur la base de risques connus ou nouveaux doivent être soumises à des contrôles renforcés au point d'entrée dans l'UE,
- de mesures d'urgence adoptées sur le fondement de l'article 53 du règlement (CE) n°178/2002.

Le règlement CE 882/2004 prévoit des contrôles aléatoires et des contrôles renforcés pour les denrées considérées comme étant à risque.

Contrôles aléatoires

Ce règlement prévoit que l'autorité compétente procède à des contrôles officiels réguliers de denrées d'origine non animale, en tenant compte des risques potentiels. Ces contrôles, aléatoires, peuvent avoir

lieu en tout point de la chaîne alimentaire. Le partage des résultats, notamment via l'exploitation des alertes publiées par le RASFF, permet de déterminer les denrées qui doivent faire l'objet d'une surveillance particulière à l'importation.

Contrôles renforcés pour les denrées « à risque »

Le règlement CE 669/2009 pris pour application de l'article 15.5 du règlement CE 882/2004 fixe la liste des trios denrée/dangers/pays d'origine soumis à des contrôles renforcés à l'importation.

Ces produits font l'objet d'un contrôle systématique dans des points d'entrée désignés lors de leur introduction sur le territoire de l'UE. Chaque lot donne lieu à un contrôle documentaire et, selon une fréquence définie par le règlement comprise entre 5 % et 50 %, à un contrôle d'identité et un contrôle physique consistant en un échantillonnage et une analyse officiels.

Les contrôles sont libératoires. En cas de prélèvement, la marchandise est retenue pendant le temps nécessaire à l'analyse. En cas de non-conformité, les lots sont en général détruits ou réexpédiés vers le pays d'origine. Une notification de rejet aux frontières est alors adressée à la Commission qui la transmet aux autres États membres via le RASFF.

En 2013, 7 975 lots ont été contrôlés dans ce cadre (augmentation de 60 % par rapport à 2012): 82 (soit environ 1 %) ont fait l'objet de mesures de rejet en raison de leur non-conformité (résidus de pesticides, aflatoxines principalement).

Cette liste est révisée chaque trimestre sur la base du résultat des contrôles et de toute information utile, notamment du résultat des inspections de l'Office alimentaire et vétérinaire de l'UE. La révision conduit à augmenter ou diminuer la fréquence des contrôles, lister de nouvelles denrées ou au contraire à en dé-lister certaines.

Le dé-listage intervient lorsque le risque est circonscrit (pas de résultats défavorable; on revient à un système de contrôle aléatoire) ou lorsque la non-conformité perdure. Dans ce dernier cas, une mesure d'urgence est adoptée en application de l'article 53 du règlement CE 178/2002. Elle exige que les lots destinés à l'UE soient accompagnés d'une attestation sanitaire et aient fait l'objet d'une analyse.

Mesures d'urgence

Les mesures d'urgence peuvent être adoptées de façon immédiate, sans inscription préalable des denrées dans le dispositif de contrôles renforcés. Elles sont décidées suite à des non-conformités répétées relevées sur lots en provenance de pays tiers donnés. Il y a actuellement six mesures d'urgence définies pour des trios denrée/pays/types de résidus:

- denrées originaires de certains pays tiers, repris en annexe du règlement CE 884/2014, annexe remise à jour plusieurs fois par an (risque lié aux aflatoxines),
- gombos et feuilles de curry d'Inde (résidus de pesticides),
- gomme de guar d'Inde (pentachlorophénol, dioxines),
- produits à base de riz de Chine (OGM non autorisés),
- denrées du Japon (radioactivité) listées dans le règlement CE 322/2014,
- feuilles de bétel du Bangladesh (suspension d'importation du fait de la présence de salmonelles).

Les contrôles réalisés dans ce cadre sont des contrôles libératoires (modalités très proches de celles décrites plus haut). La fréquence des contrôles physiques peut atteindre 100 % des lots.

Les mesures d'urgence peuvent être adoptées de façon immédiate, sans inscription préalable des denrées dans le dispositif de contrôles renforcés.

Martial Plantady (martial.plantady@ec.europa.eu)

DG SANTÉ, Commission européenne, Bruxelles, Belgique

Mots-clés: Europe, aliments, vigilance, risques microbiologiques/Keywords: Europe, Food, Monitoring, Microbiological risks

Au cours des dernières années, la quantité d'informations disponibles liées à des dangers détectés dans des denrées alimentaires mises sur le marché de l'Union européenne (UE) n'a cessé de s'accroître. Ceci s'explique bien sûr par l'augmentation des échanges de marchandises, mais également par la qualité croissante des méthodes analytiques et par l'accroissement des obligations réglementaires de surveillance incombant aux États membres (EM) de l'UE, qu'elles soient communautaires ou nationales.

Le traitement de ces informations constitue une tâche complexe pour les autorités compétentes des EM qui doivent être capables de détecter précocement l'émergence de phénomènes susceptibles de représenter un danger pour la santé publique. Cette capacité est cruciale, car elle est l'une des conditions nécessaires à une réactivité optimale en cas de survenue d'incident sanitaire.

Bien que la législation de l'UE mette déjà à la disposition des EM des outils permettant d'échanger des informations liées à des dangers détectés dans des denrées alimentaires ou des aliments pour animaux mis sur le marché (système RASFF⁽¹⁾ – Rapid Alert System for Food and Feed) ou à l'apparition de maladies transmissibles chez l'Homme susceptibles d'avoir un impact important dans

l'UE (système EWRS⁽²⁾ – Early Warning and Response System), les informations délivrées par ces systèmes basés sur une surveillance « événementielle » sont parfois difficiles à exploiter pour une détection précoce de phénomènes émergents.

La Direction générale santé et sécurité alimentaire (DG SANTÉ⁽³⁾) de la Commission européenne souhaite donc promouvoir, dans les années à venir, une collecte d'informations plus spécifique se fondant sur des résultats faisant appel aux techniques analytiques les plus modernes, notamment celles de typage moléculaire. Ces informations devraient permettre d'établir un lien plus sûr entre les données issues du secteur vétérinaire et celles provenant du secteur humain et contribuer à améliorer l'efficacité des enquêtes épidémiologiques concernant les sources d'infections possibles lors de l'apparition de foyers humains transfrontaliers liés à des agents infectieux d'origine alimentaire. L'ensemble des initiatives communautaires dans ce domaine sont décrites dans le document stratégique publié par la Commission en 2012: « Vision paper on the development of data bases for molecular testing of foodborne pathogens in view of outbreak preparedness »⁽⁴⁾.

(1) http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm

(2) http://ec.europa.eu/health/communicable_diseases/early_warning/index_en.htm

(3) http://ec.europa.eu/dgs/health_food-safety/index_fr.htm

(4) http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/vision-paper_en.pdf

Brève. Les plans de surveillance et les plans de contrôle au service de la vigilance sanitaire des aliments

Short item. Food safety surveillance and control programmes

Marion Bordier (1) (marion.bordier@agriculture.gouv.fr)

Direction générale de l'alimentation, Bureau du management par la qualité et de la coordination des contrôles, Paris, France

Mots-clés : plan de surveillance, plan de contrôle, surveillance, alimentation/**Keywords :** Surveillance programme, Control programme, Surveillance, Food

Chaque année, la Direction générale de l'alimentation (DGAL) du ministère chargé de l'Agriculture élabore et met en œuvre des plans de surveillance et des plans de contrôle (PS/PC). Ce dispositif de surveillance programmée assure le suivi des contaminations (de nature chimique, biologique et physique), des denrées alimentaires et des aliments pour animaux, d'origine animale et végétale, produits sur le territoire ou importés de pays tiers.

La différence entre plans de surveillance (PS) et plans de contrôle (PC) réside dans la stratégie d'échantillonnage : dans le cas des PS, l'échantillon est représentatif de la production totale, alors que dans le cas des PC, les prélèvements sont ciblés sur une partie de la production présentant un risque accru de contamination (définie sur la base de critères de ciblage génériques dans le cas des PC orientés ou sur la base du caractère suspect avéré d'un produit dans le cas des PC renforcés) (DGAL, 2013).

L'objectif premier des PS/PC est de surveiller les niveaux de contamination des productions ou de détecter des mésusages de substances actives (médicaments vétérinaires, produits phytosanitaires, etc.), afin de définir des mesures de gestion appropriées au regard du risque alimentaire identifié, dans le respect des exigences de la réglementation européenne. Les PS/PC sont généralement reconduits d'une année sur l'autre, avec ou sans modification du plan d'échantillonnage, pour permettre la collecte régulière de données qui seront exploitées pour l'évaluation des risques au niveau national et européen. C'est le cas des plans de contrôle des résidus chimiques à la production, qui représentent la majorité des prélèvements réalisés annuellement.

Le dispositif contribue aussi à la vigilance de la chaîne alimentaire, en permettant la détection d'évolutions dans les niveaux de contamination ou de nouveaux contaminants, ou encore l'amélioration de la connaissance scientifique vis-à-vis de dangers émergents (denrées alimentaires contaminées, niveaux de contamination, facteurs de risque de contamination des matrices). Ainsi, dans un contexte de surveillance continue, on peut citer le programme de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques dans les productions animales mis en place depuis 2009. Les données collectées permettent de suivre les évolutions des taux de résistance dans le temps et de mettre en évidence des profils émergents de résistance chez les bactéries (DGAL, 2014). De plus, et en parallèle, existent aussi des plans exploratoires, qui sont élaborés en collaboration étroite avec les agences nationales ou européennes d'évaluation des risques. Ils sont mis en œuvre ponctuellement afin de recueillir les données nécessaires pour estimer le risque et en

proposer une gestion appropriée, ou développer de nouvelles méthodes analytiques. Par exemple, le plan de surveillance conduit en 2011 sur la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc a contribué à l'évaluation des risques présentés par la consommation de ces produits (Anses, 2013a). De même en 2015, sera mis en œuvre un plan de surveillance de la contamination par le bisphénol A des denrées alimentaires d'origine animale non conditionnées en conserve, afin d'actualiser les connaissances sur les niveaux de contamination (Anses, 2013b).

Le dispositif PS/PC mobilise l'administration centrale et ses services déconcentrés, et nécessite des interactions étroites avec les autres acteurs de la sécurité sanitaire des aliments (Anses, InVS, DGCCRF, DGS, LNR). Grâce à un réseau efficient, ce dispositif permet de réaliser environ 65 000 prélèvements par an, produisant plus de 800 000 résultats analytiques, qui sont exploités au niveau national et européen, pour l'évaluation et la gestion des risques alimentaires.

Cependant, une évaluation plus intégrée des risques alimentaires permettrait d'améliorer la priorisation des couples analyte/produit, ainsi que le stade de la chaîne alimentaire à surveiller. La révision du règlement européen sur les contrôles officiels, qui devrait aboutir à plus de subsidiarité des États membres, offre un contexte favorable à une meilleure exploitation de l'évaluation des risques nationale lors de l'élaboration des programmes de surveillance des denrées et aliments pour animaux.

Références bibliographiques

DGAL, 2013. Sécurité sanitaire : Les plans de surveillance et de contrôle. <http://alimentation.gouv.fr/securite-sanitaire-surveillance-controle>.

DGAL, 2014. Bilan de la surveillance de la résistance aux antimicrobiens. Bilan 2013 des plans de surveillance et de contrôle de la DGAL. 99-110. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Bilan_PSPC_2013_cle0e1631.pdf

Anses, 2013a. Avis relatif à la "demande d'évaluation du risque lié à la contamination des produits de charcuterie à base de foie de porc cru par le virus de l'hépatite E (VHE)". Février 2013. www.anses.fr/fr/documents/BIORISK2012sa0012.pdf.

Anses, 2013b. Avis relatif à l'évaluation des risques du bisphénol A (BPA) pour la santé humaine. Mars 2013 <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/CHIM2009sa0331Ra-0.pdf>.

L'Autorité européenne de sécurité des aliments initie une **procédure systématique pour l'identification de risques chimiques émergents** dans l'alimentation humaine et animale

Frédéric Bertrand (1) (frederic.bertrand@agriculture.gouv.fr), Laurine Bouteiller (1), Madeleine Lesage (2)

(1) Direction générale de l'alimentation, Bureau de la coordination en matière de contaminants chimiques et physiques, Paris, France

(2) Ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt. Bureau de la prospective, de la stratégie et de l'intelligence économique. Centre d'études et de prospectives, Paris, France

Résumé

L'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) fournit des avis et une assistance scientifiques et techniques dans tous les domaines ayant un impact sur la sécurité sanitaire des aliments. Identifier les risques émergents fait partie de ses missions. L'initiative en décembre 2013 de mise en place d'une procédure ambitieuse visant à identifier les risques chimiques émergents présents dans l'environnement et susceptibles d'être retrouvés dans la chaîne alimentaire humaine ou animale répond à cet objectif. Cet article constitue une information sur ce dispositif.

Mots-clés

Environnement, contaminants chimiques, risque, alimentation humaine, alimentation animale, santé

Abstract

The European food safety authority launches a systematic procedure for the identification of emerging chemical risks in food and feed

The European food safety authority (EFSA) provides scientific advice and scientific and technical support in all areas impacting on food and feed safety. Identifying emerging risks is one of its purposes. The initiative on december 2013 to set up an ambitious procedure of identification of emerging chemical risks occurring in the food and feed chain meets this objective. This article is an information on this device.

Keywords

Environment, Chemical contaminants, Risk, Food, Feed, Health

Après une réflexion de plusieurs années au cours desquelles ont été menées des consultations d'experts, l'EFSA a publié dans un rapport du 18 décembre 2013⁽¹⁾ une procédure d'identification des risques émergents dans l'alimentation humaine et animale.

L'objectif de cette procédure est d'établir une liste de produits chimiques potentiellement toxiques et susceptibles de s'accumuler dans l'environnement, qui ne sont pas réglementés ou autorisés pour une utilisation dans l'alimentation humaine et animale, et qui n'ont encore été évalués par aucun organisme d'évaluation des risques.

Le principe

Dans le cas présent, il s'agit d'identifier des substances non encore répertoriées et susceptibles d'être retrouvées dans l'alimentation humaine ou animale, et d'avoir un impact direct ou indirect, sur la santé humaine, animale ou végétale (Figure 1).

Pour l'application de cette procédure la disponibilité des données est essentielle. L'EFSA puisera ses informations de plusieurs bases de données ou registres, qui répertorient la présence de substances chimiques industrielles et de contaminants chimiques environnementaux dans l'UE.

Deux types de sources de données seront principalement utilisées: d'une part la liste des substances industrielles enregistrées dans le cadre du règlement REACH⁽²⁾, d'autre part le répertoire des substances d'origine naturelle ou non présentes dans l'environnement, pour lesquelles plusieurs bases de données existent, parmi lesquels le réseau e-chemPortal⁽³⁾, réseau intergouvernemental piloté par l'OCDE autour des risques chimiques environnementaux et le réseau Norman⁽⁴⁾, qui offre une vue d'ensemble de l'occurrence des substances émergentes en Europe.

Les Figures 2 et 3 présentent les deux points d'entrée possibles.

Le principe est d'appliquer des critères de sélection à différentes étapes. Parmi les critères il y aura le volume de production, la persistance dans l'environnement, la bioaccumulation et les usages.

Pour les deux dernières étapes des deux schémas, il s'agit de déterminer une sélection de substances chimiques considérées comme constituant un risque émergent, car étant présentes en quantités importantes dans l'alimentation et non encore évaluées.

Cette procédure est actuellement en phase de test.

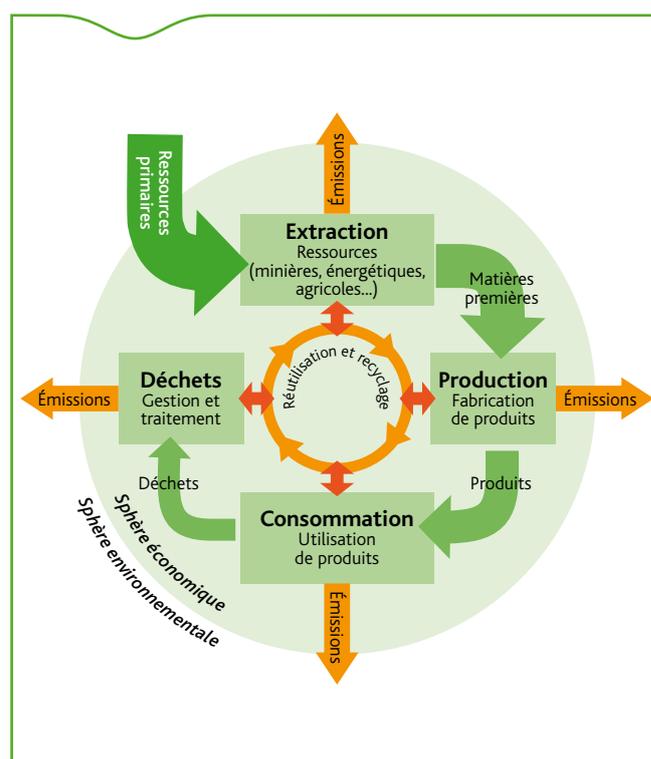


Figure 1. Cycle de vie des produits chimiques

Source: rapport EFSA; ce schéma ne prend pas en compte les toxiques produits de manière non intentionnelle au cours des procédés de fabrication.

(1) <http://www.efsa.europa.eu/fr/supporting/doc/547e.pdf>

(2) REACH: Registered Substances information of industrial chemical produced or imported in the UE. http://europa.eu/legislation_summaries/internal_market/single_market_for_goods/chemical_products/l21282_fr.htm

(3) http://ec.europa.eu/enterprise/sectors/chemicals/reach/index_fr.htm

(4) www.echemportal.org

(4) <http://www.norman-network.net/>

Figure 2. Substances pour lesquelles le point d'entrée est l'enregistrement dans le cadre du règlement REACH



Figure 3. Substances pour lesquelles le point d'entrée est la présence à l'état naturel ou non dans l'environnement

Il peut s'agir par exemple de substances issues d'émissions volcaniques ou de toxines.



La nutrivigilance

Aymeric Dopter (aymeric.dopter@anses.fr)

Anses, Direction de l'évaluation des risques, Unité d'évaluation des risques liés à la nutrition, Mission Nutrivigilance, Maisons-Alfort, France

Résumé

Le dispositif de nutrivigilance est un système de veille sanitaire, géré par l'Anses, dont l'objectif est d'améliorer la sécurité du consommateur en identifiant rapidement d'éventuels effets indésirables liés, notamment, à la consommation de compléments alimentaires ou de nouveaux aliments. Mis en place en 2009, il a permis à l'Anses de rendre plusieurs avis sur différents risques encourus par les consommateurs.

Mots-clés

Nutrivigilance, compléments alimentaires, effets indésirables

Nutrivigilance

The nutritional vigilance scheme is a health monitoring system administered by ANSES which aims at improving consumer safety by rapidly identifying potential adverse effects associated with, primarily, the consumption of food supplements or novel foods. Launched in 2009, it has enabled Anses to issue several opinions on various consumer risks.

Keywords

Nutrivigilance, Food supplement, Dietary supplement, Side effects

Depuis plusieurs années, la consommation de compléments alimentaires, d'aliments ou de boissons enrichis en substances à but nutritionnel ou physiologique (vitamines, minéraux, acides aminés, extraits de plantes...), mais aussi de nouveaux ingrédients et aliments, et de produits destinés à l'alimentation de populations particulières (patients ayant des troubles métaboliques, nourrissons...) a connu une forte augmentation. Ces produits, souvent considérés comme anodins par les consommateurs, peuvent parfois les exposer à des risques.

C'est dans ce contexte que la loi « Hôpital, Patients, Santé et Territoires » (HPST) a confié à l'Anses la mise en place en juillet 2009 d'un dispositif de nutrivigilance visant à surveiller la sécurité de ces produits dans leurs conditions réelles d'utilisation.

Pour cela, la nutrivigilance recense et analyse les éventuels effets indésirables pouvant être liés à la consommation de ces produits alimentaires. Ceci permet d'alerter si besoin les pouvoirs publics afin qu'ils mettent en place des mesures de gestion adaptées. Ce dispositif contribue ainsi à renforcer la sécurité du consommateur.

Rappelons ici qu'il ne s'agit pas de repérer des lots de denrées avariées du fait d'un défaut de maîtrise de la qualité, mais d'identifier des risques induits par des produits alimentaires conformes aux spécifications définies par leur fabricant.

Le dispositif de nutrivigilance fonctionne grâce aux professionnels de santé. Ceux-ci sont invités à signaler à l'Anses, grâce au formulaire de déclaration mis à disposition sur le site internet de l'Agence, tout effet indésirable qu'ils suspecteraient d'être lié, directement ou non, à la consommation de produits alimentaires concernés par la nutrivigilance.

Une fois le signalement transmis à l'Anses, il est analysé afin d'identifier si celui-ci est complet et entre effectivement dans le champ de la nutrivigilance (phase de recevabilité). Le cas échéant, des compléments d'information sont demandés au déclarant. Un cas est jugé recevable lorsqu'il concerne un produit tombant dans le périmètre de la nutrivigilance, ce qui exclut les cas concernant des médicaments, des dispositifs médicaux, des cosmétiques, etc.

Comme indiqué précédemment les défauts de qualité (par ex. lait maternisé contaminé par une bactérie ou un champignon) sont également exclus du champ d'application, tout comme les cas pour lesquels il n'y a pas eu d'effet indésirable (par ex. en cas de manque d'efficacité, d'erreur d'étiquetage...) ou lorsque l'effet indésirable n'est pas lié au complément alimentaire mais à une confusion entre le nom du complément alimentaire et celui d'une spécialité pharmaceutique. Enfin, lorsque le signalement est imprécis (nom incomplet du produit, chronologie des événements trop approximative, effet indésirable mal identifié, patient d'âge inconnu...), le cas est considéré comme incomplet et donc non recevable.

Lorsque le cas est jugé recevable, son imputabilité (c'est-à-dire la probabilité que la survenue de l'effet indésirable déclaré soit liée à la consommation de la denrée suspectée), la sévérité de l'effet et la récurrence de ce type de signalement sont évaluées.

Dans certains cas, lorsque l'imputabilité est élevée et que le pronostic vital du consommateur est (ou a été) engagé, une alerte est aussitôt déclenchée auprès de la DGS (Direction générale de la santé) et de la DGCCRF (Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes) parallèlement à la mobilisation en urgence d'experts de l'Anses, afin de confirmer le niveau d'imputabilité. Dans les autres cas, les dossiers sont transmis à des experts médecins afin d'obtenir un avis médical sur le niveau d'imputabilité. Ces derniers rendent chacun leur rapport qui est ensuite examiné collégalement par un groupe de travail pluridisciplinaire de nutrivigilance (composé essentiellement de médecins et de pharmaciens) rattaché au Comité d'experts spécialisé (CES) en nutrition humaine de l'Anses. Ce groupe de travail se prononce sur les cas et leurs conclusions sont ensuite envoyées aux ministères concernés, aux déclarants et aux fabricants dont les produits sont impliqués.

La mise en place du dispositif en 2009 a commencé par une phase pilote visant à tester la faisabilité d'un tel dispositif; celui-ci est véritablement devenu fonctionnel en 2010.

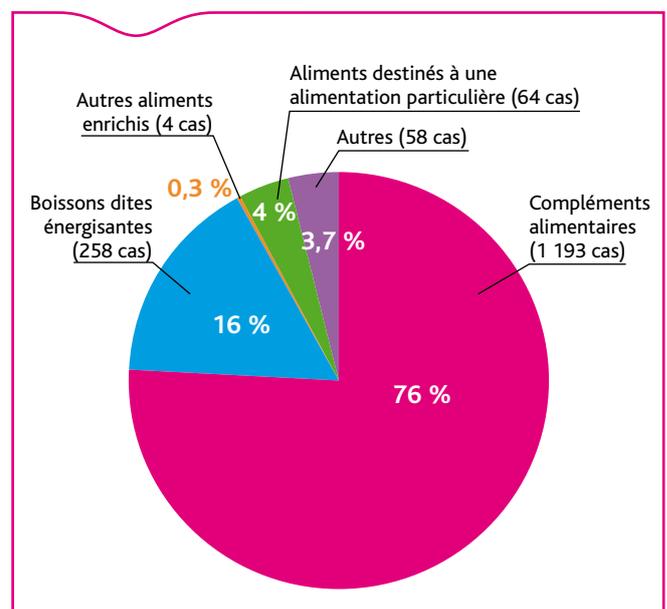


Figure 1. Distribution des types de produits alimentaires ayant fait l'objet d'au moins une déclaration de nutrivigilance

Entre 2010 et fin juin 2014, la nutrivigilance a reçu 1 565 cas concernant très majoritairement des compléments alimentaires (76 %) et dans une moindre proportion des aliments enrichis, tels que les boissons dites « énergisantes » (16 %) (Figure 1). Les denrées destinées à des alimentations particulières ne représentent que 4 % des déclarations reçues, soit environ autant que des produits ne relevant pas de la nutrivigilance. On notera qu'aucune déclaration ne concernait un nouvel aliment.

Les effets indésirables signalés sont principalement d'ordre hépatique (19,9 %) suivis de près par les effets gastro-entériques (18,4 %) et les allergies (16 %). On rencontre également des effets neurologiques ou psychiatriques (12,1 %) et des effets cardiovasculaires (9,9 %). Les autres types d'effets ne dépassent pas 8 % individuellement.

Si tous les signalements sont analysés individuellement, l'ensemble des cas reçus oriente quant à lui le choix de l'expertise, qui se traduira par la production d'un avis.

À ce jour, l'Anses a émis des avis sur les risques liés à la consommation de compléments alimentaires contenant de l'igname, de la lutéine et/ou de la zéaxantine, du thé vert, des extraits de citrus, ou encore de la levure de riz rouge. Elle a par ailleurs expertisé les risques liés à la consommation de substituts de lait et également de boissons énergisantes.

Les prochains avis à paraître dans le courant de l'année 2015 concerneront les risques liés à la consommation de compléments alimentaires destinés aux sportifs, visant le développement de la masse musculaire et/ou la diminution de la masse grasse, mais aussi les risques liés à la consommation par les femmes enceintes de vitamines et de minéraux, et les risques liés à la présence de spiruline dans les compléments alimentaires, suite à la parution d'un premier avis il y a seulement quelques semaines signalant un cas d'allergie grave très vraisemblablement lié à la consommation de spiruline.

Même si globalement, le bilan est satisfaisant du fait de la déclaration régulière de signalement d'effets indésirables, il existe toutefois des axes d'amélioration. Le premier d'entre eux concerne la mobilisation des professionnels de santé. En effet, la nutrivigilance sera d'autant plus performante que les données transmises seront nombreuses et précises. C'est pourquoi l'implication des professionnels de santé est indispensable afin que le dispositif reste dynamique et efficace. L'Anses les invite à rester vigilants et à déclarer le maximum d'effets indésirables qu'ils observent.

De plus, l'Anses a récemment créé un réseau de nutrivigilance européen permettant le partage d'informations avec les différents États membres. Celui-ci devrait permettre une meilleure coopération internationale face à ces préoccupations largement partagées par nos voisins.

Surveillance de *Salmonella* dans la chaîne alimentaire pour la détection d'émergences en France

Renaud Lailler (1) (renaud.lailler@anses.fr), Frédérique Moury (1), Vincent Leclerc (1), Marylène Bohnert (2), Sabrina Cadel-Six (1), Anne Brisabois (1)
(1) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Unité *Listeria Salmonella E.coli*, Maisons-Alfort, France
(2) Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Hygiène et qualité des produits avicoles et porcins, Ploufragan, France

Résumé

Les salmonelles représentent la deuxième cause d'infection humaine d'origine alimentaire en Europe. La réglementation en vigueur s'applique principalement à la filière avicole, de l'élevage à la production d'œufs de consommation et de viandes fraîches. Les récentes épidémies de salmonellose, d'ampleur nationale voire européenne, survenues en lien avec la consommation d'aliments issus de filières réglementées ou non, soulignent l'importance de maintenir une surveillance des salmonelles tout au long de la chaîne alimentaire. Le réseau *Salmonella* tient une place importante dans le dispositif français. Il permet de mener une surveillance événementielle et multisectorielle, et complète la surveillance programmée correspondant notamment à la réalisation des plans de surveillance et de contrôle. Depuis de nombreuses années, ce réseau permet de détecter l'émergence de souches de salmonelles d'origine non humaine, présentant des caractéristiques de virulence ou de résistance aux antibiotiques potentiellement problématiques pour la santé publique.

L'amélioration continue du fonctionnement de ce réseau et la mise en œuvre de méthodes modernes de caractérisation et d'outils épidémiologiques sont engagées en lien étroit avec les responsables de la surveillance des salmonelles isolées chez l'homme. Un niveau satisfaisant de vigilance nécessite des moyens modernes et efficaces pour collecter et partager l'information et pour l'analyser rapidement notamment en situation d'alerte sanitaire. Les outils épidémiologiques appliqués à ces nombreuses données soulignent le besoin d'études plus approfondies pour expliquer des phénomènes inhabituels observés pour certains sérovars et ainsi préserver au mieux la santé des consommateurs.

Mots-clés

Salmonella, surveillance, zoonose, sérovar, émergence

Abstract

Surveillance of *Salmonella* in the agro-food chain for outbreak detection in France

Salmonella is the second cause of human foodborne infection in Europe. Regulations are mainly applied to the poultry sector, from livestock production to the consumption of fresh meat and eggs. Recent outbreaks of salmonellosis in France and elsewhere in Europe have been linked to food consumption in both regulated and unregulated sectors. This observation highlights the need to maintain monitoring of Salmonella throughout the food chain. The Salmonella network plays an important role in the French surveillance system and facilitates event-based multi-sector surveillance while supplementing regulated monitoring based on official analyses. For many years, the network has made it possible to detect emerging non-human Salmonella strains whose virulence or antimicrobial resistance profiles can pose problems for public health.

In close collaboration with those in charge of human Salmonella isolate surveillance, the network strives to constantly improve its performance and to apply innovative typing methods and epidemiological tools. A satisfactory level of vigilance requires modern and efficient methods of information collection, sharing and rapid analysis, especially during health alerts. The epidemiological tools applied to these numerous data highlight the need for more detailed studies to explain the unusual phenomena observed for specific serovars in order to help preserve the health of consumers.

Keywords

Salmonella, Surveillance, Zoonosis, Serovar, Emergence

Salmonella est une bactérie présente dans l'environnement ainsi que chez un grand nombre d'animaux qui, le plus souvent, l'hébergent de manière asymptomatique. Cette bactérie peut survivre dans l'environnement pendant de longues périodes, contribuant ainsi au maintien de la bactérie au sein du réservoir animal.

Les salmonelles non typhiques sont à l'origine d'infections alimentaires. Celles-ci peuvent entraîner des cas isolés ou être responsables de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Leur impact est important en termes de santé publique, mais elles peuvent également avoir des répercussions économiques conséquentes lorsqu'une filière ou une catégorie de produit est identifiée comme vecteur de l'infection. Les aliments impliqués dans les TIAC sont le plus souvent les œufs et les produits à base d'œufs crus ou ayant subi un traitement thermique insuffisant, les produits laitiers (lait cru ou faiblement thermisé), ainsi que les produits carnés (bovins, porcs et volailles) (Anses, 2011).

Cette diversité de sources de contamination justifie de mettre en place une surveillance élargie des salmonelles tout au long de la chaîne alimentaire, chez l'animal et dans l'environnement, en relation avec la détection de cas humains de salmonelloses.

Selon le rapport publié par l'EFSA et l'ECDC en janvier 2015 et relatif aux données de prévalence rapportées par les différents États membres pour l'année 2013 (EFSA et ECDC, 2015), *Salmonella* demeure après *Campylobacter* la principale cause d'infection humaine d'origine alimentaire au regard du nombre de cas confirmés. Le nombre de cas humains de salmonellose rapporté en Europe a diminué de façon

continue entre 2008 (n=134 580) et 2013 (n=82 694). L'hypothèse la plus probable avancée pour expliquer cette diminution, réside dans le succès des programmes européens de lutte contre *Salmonella* pour réduire la prévalence de la bactérie dans les populations de volailles, en particulier chez les poules pondeuses⁽¹⁾.

La vigilance appliquée aux salmonelles doit être maintenue pour détecter l'émergence de nouvelles souches présentant un danger en santé publique et identifier les tendances évolutives des différents sérovars isolés de la chaîne alimentaire. Pour cela, des données de qualité doivent être collectées et enregistrées au sein d'une base de données, dans un pas de temps permettant l'analyse et la prise de décision pour réduire les risques.

Le dispositif de surveillance nationale des salmonelles dans la chaîne alimentaire

Le dispositif français de surveillance des salmonelles, en place depuis la fin des années 1990, a évolué sous l'effet combiné de la réglementation européenne et des niveaux de prévalence observés dans les différentes sources (Figure 1). Les réglementations européennes et nationales constituent un socle majeur pour harmoniser et collecter des données

(1) Règlement CE 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.

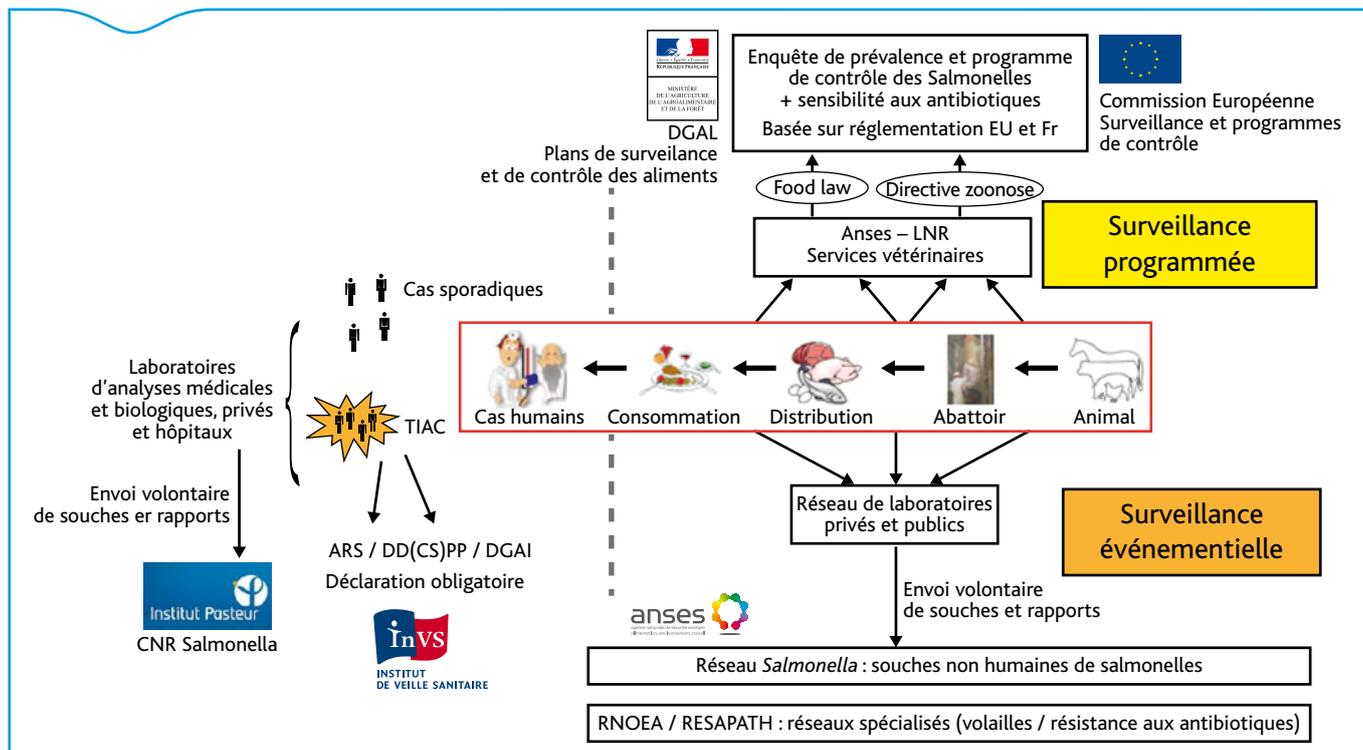


Figure 1. Organisation du système de surveillance des salmonelles en France en 2015, adapté de David *et al.* (2011)

tout au long de la chaîne alimentaire. L'existence concomitante de réseaux de surveillance complémentaires dans les domaines vétérinaires et agro-alimentaires permet d'obtenir des informations précieuses sur des secteurs ou sur des points de collecte de données non couverts par la réglementation.

En France, un réseau d'épidémiologie piloté par le laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses, le réseau *Salmonella*, a été créé en 1997 pour suivre les tendances évolutives d'isolement des sérovars provenant des différents secteurs (santé animale, alimentation, environnement). Cette surveillance repose en première intention sur l'identification de la bactérie et la détermination de sa formule antigénique (2600 sérovars sont référencés actuellement) (Grimont et Weill, 2007). Ces résultats analytiques et la collecte des renseignements épidémiologiques associés sont très utiles pour suivre les tendances évolutives, la détection d'émergences d'événements inhabituels ou de nouveaux agents pathogènes.

La diversité des acteurs de cette surveillance, l'organisation mise en place pour garantir la qualité et la représentativité des données, ainsi que les atouts et spécificités de chaque élément de ce dispositif national font de ce dernier un système efficace pour répondre aux attentes des gestionnaires et des évaluateurs de risques, notamment en situation d'alerte sanitaire (David *et al.*, 2011).

Surveillance par le réseau *Salmonella*

Ce réseau poursuit deux objectifs: 1) apporter aux laboratoires d'analyses alimentaires et vétérinaires une expertise technique pour le sérotypage des isolats de *Salmonella*, 2) développer une activité de vigilance dans la surveillance des *Salmonella* isolées de la chaîne agro-alimentaire. Près de 140 laboratoires repartis sur l'ensemble du territoire national adhérent au réseau et réalisent les analyses de première intention. Ces laboratoires transmettent, de manière volontaire, des souches à sérotyper au laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses et/ou des résultats de sérotypage, ainsi que des renseignements épidémiologiques associés (contexte, date, lieu et type du prélèvement, etc.). Ces informations collectées sont issues de trois secteurs: i) santé et production animales (animaux malades, porteurs sains ou environnement d'élevage), ii) alimentation (produits destinés à la consommation humaine ou animale, environnement des abattoirs, ateliers de découpe et/ou de transformation), iii) écosystème naturel.

La réglementation européenne sur les zoonoses cible certaines filières d'élevage et certains sérovars⁽²⁾, ce qui peut avoir un impact sur la remontée des informations. Cependant, la relative stabilité du nombre et de la distribution des données du réseau et les similitudes observées dans le passé concernant l'évolution des principaux sérovars isolés à la fois chez l'Homme et dans les aliments, soulignent l'intérêt du réseau dans le dispositif national de surveillance des *Salmonella* (Lailler *et al.*, 2012).

Jusqu'en 2013, toutes les informations épidémiologiques et les résultats d'analyse collectés par le réseau étaient centralisés dans une base de données de type MSAccess. Une nouvelle application interfacée-Web sur serveur Oracle® (ACTEOLab-*Salmonella*), permet aujourd'hui la centralisation des données dédiées à une épidémiologie plus opérationnelle. Des outils d'épidémiologie, précédemment et nouvellement développés, seront utilisés sur les données de cette nouvelle application pour permettre d'améliorer la pertinence et la réactivité du dispositif de surveillance des souches de *Salmonella* d'origine non-humaine en France (Lailler *et al.*, 2014).

Une fois ces données enregistrées, des requêtes spécifiques permettent d'identifier précisément les isolats appartenant aux différents sérovars, en leur associant l'ensemble des informations épidémiologiques disponibles. Ce type de requête est régulièrement mis en œuvre en situation d'investigation de cas humains groupés, détectés suite à l'analyse des données du CNR *Salmonella*.

Les données de surveillance, tendances évolutives

Analyses des données brutes

Le nombre de résultats de sérotypage collectés par le réseau *Salmonella* a augmenté de 45 % entre 2007 et 2012 (Tableau 1). Cette augmentation résulte d'une collecte plus importante de souches dans le secteur de la santé et production animales (14 567 souches en 2012 *versus* 8 605 souches sérotypées en 2007), du fait du dépistage obligatoire avant abattage des salmonelles dans les troupeaux de poulets de chair. L'augmentation constante de la transmission de

(2) Règlement CE 2160/2003 du Parlement européen et du Conseil du 17 novembre 2003 sur le contrôle des salmonelles et d'autres agents zoonotiques spécifiques présents dans la chaîne alimentaire.

Tableau 1. Nombre de souches collectées chaque année par le réseau *Salmonella* entre 2007 et 2012, pour les principaux sérovars, toutes origines confondues

Années	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Senftenberg	1827	2 151	2 796	2 362	3 756	4 290
%	13,1	16,1	18,8	14,0	20,0	21,1
Typhimurium	2 003	1 513	1 480	2 449	2 349	1 987
%	14,3	11,3	10,0	14,5	12,5	9,8
Indiana	1 409	1 139	1 123	1 281	1 375	1 915
%	10,1	8,5	7,6	7,6	7,3	9,4
Mbandaka	328	483	860	800	1 141	1 540
%	2,3	3,6	5,8	4,7	6,1	7,6
Montevideo	750	970	1 054	1 038	1 213	1 273
%	5,4	7,3	7,1	6,2	6,4	6,3
Derby	1 524	887	918	976	906	724
%	10,9	6,6	6,2	5,8	4,8	3,6
S. 1,4,[5],12:i:-	84	100	188	315	513	646
%	0,6	0,7	1,3	1,9	2,7	3,2
Saintpaul	236	177	131	181	412	632
%	1,7	1,3	0,9	1,1	2,2	3,1
Enteritidis	884	832	661	570	530	533
%	6,3	6,2	4,5	3,4	2,8	2,6
Kottbus	855	504	364	520	703	367
%	6,1	3,8	2,5	3,1	3,7	1,8
Dublin	194	332	551	618	496	347
%	1,4	2,5	3,7	3,7	2,6	1,7
Infantis	247	185	208	203	169	267
%	1,8	1,4	1,4	1,2	0,9	1,3
Hadar	264	120	219	119	70	95
%	1,9	0,9	1,5	0,7	0,4	0,5
Virchow	78	36	67	128	67	65
%	0,6	0,3	0,5	0,8	0,4	0,3
Autres sérovars	3 220	3 848	4 146	5 222	5 036	5 561
%	23,0	28,8	27,9	31,0	26,8	27,4
Total	13 979	13 347	14 837	16 850	18 808	20 314

% : proportion relative du nombre de souches du sérovar concerné, au regard de l'ensemble des souches collectées durant l'année

données des sérotypages réalisés par les laboratoires partenaires, en nombre absolu et en part relative, entre 2007 (n=7815/13979 soit 55,9 %) et 2012 (n=15050/19901 soit 75,6 %), explique également cette augmentation. Les principaux sérovars isolés durant cette période ont été, toutes origines confondues, Senftenberg et Typhimurium (incluant les variants de ce sérovar). Le Tableau 1 présente l'évolution du nombre de souches collectées dans le cadre du réseau *Salmonella*, quelle que soit l'origine du prélèvement, pour les sérovars les plus fréquents, ceux qui sont réglementés et pour ceux marqués par une évolution significative entre 2007 et 2012.

Les sérovars retenus comme dangers sanitaires de première catégorie par la réglementation française⁽³⁾ sont Enteritidis, Typhimurium, Hadar, Virchow et Infantis. Ces sérovars sont recherchés, d'une part sur les volailles de l'espèce *Gallus gallus* (production d'œufs destinés à la consommation humaine et de carcasses et viandes découpées de poulets de chair) et d'autre part, sur les volailles de l'espèce *Meleagris gallopavo* (production de carcasses et de viandes découpées de dindes). Sous l'hypothèse d'une stabilité de fonctionnement du réseau, une décroissance de fréquence d'isolement de *S. Enteritidis* est observée dans la base de données du réseau *Salmonella*, en santé et production animales. La part relative des souches *S. Enteritidis* a diminué chaque année entre 2007 (6,3 %) et 2012 (2,6 %). Ce constat est en cohérence avec le bilan dressé au niveau européen (EFSA, 2015). Les données du

réseau montrent une certaine stabilité du nombre et de la part relative (<2 %) des souches appartenant aux sérovars réglementés Infantis, Virchow et Hadar. Ces deux derniers sérovars n'apparaissent plus depuis plusieurs années parmi les sérovars les plus fréquemment isolés, à la fois chez l'Homme (Jourdan-Da Silva et Le Hello, 2012a; Le Hello S., communication à la 18^e journée annuelle du réseau *Salmonella*) et tout au long de la chaîne alimentaire.

L'évolution du nombre de souches de *S. Senftenberg* (Tableau 1) résulte d'une plus forte transmission des résultats de sérotypage par les partenaires dans les sous-filières avicoles réglementées. La contamination régulière des prélèvements d'environnement reflète la présence importante de ce sérovar dans les bâtiments de production (couvoirs), voire l'émergence de ce sérovar du fait de l'évolution génétique de certaines souches appartenant à ce sérovar (Boumart et al., 2012). Pour autant, ce sérovar n'est pas retrouvé parmi les principaux sérovars identifiés par le dispositif de surveillance des salmonelles d'origine humaine. Cette observation peut s'expliquer par la faible capacité de ce sérovar à persister et coloniser l'intestin de ces volailles (Boumart et al., 2012).

Les données collectées au cours de cette période soulignent également une augmentation quasi-constante de l'importance relative des souches du sérovar *S. Mbandaka* entre 2007 (2,4 %, 328/13979) et 2012 (7,6 %, 1540/20314) (Tableau 2). Cette évolution s'observe dans les secteurs santé et production animales et hygiène des aliments destinés à l'Homme et dans les filières bovine et avicole (principalement dindes et *Gallus gallus* et secondairement, canard et caille). Néanmoins, ce sérotype n'est pas retrouvé dans les vingt premiers sérovars isolés chez l'Homme.

L'augmentation du nombre de souches *S. 1,4,[5],12:i:-* (Tableau 1) traduit l'émergence au niveau national des souches correspondant aux variants monophasiques de Typhimurium, rapportée depuis environ une décennie en Europe (Anses, 2013; EFSA et ECDC, 2015). La note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 du 4 mars 2010⁽⁴⁾ a facilité la centralisation de ces souches par le réseau dès 2011. Une première étude de caractérisation de ces variants a été menée et a confirmé que ces souches dérivent quasi-exclusivement (99,8 %) du sérovar Typhimurium (Anses, 2013). La description détaillée des effectifs annuels, comptabilisés depuis 2007 pour ces souches monophasiques montre une grande dispersion de ces variants dans les filières animales et les catégories d'aliments recensés. Dès 2007, ces variants étaient déjà plus largement isolés d'élevages de volailles et d'aliments issus de la filière porcine (viandes de porc et produits de charcuterie). La survenue de plusieurs foyers de TIAC en France en 2010 et 2011 a également renforcé cette collecte de souches isolées d'aliments (Anses, 2013; Bone et al., 2010; Gossner et al., 2012; Raguenaud et al., 2010).

Les données collectées au cours de cette période soulignent également une évolution quasi-constante entre 2007 et 2012 du nombre de souches du sérovar *S. Mbandaka* (Tableau 2). Cette évolution s'observe dans les deux secteurs (santé et production animales et hygiène des aliments destinés à l'Homme), dans les filières bovine et avicole (principalement dindes et *Gallus gallus* et secondairement, canard et caille).

Analyses des données en relation avec les investigations de cas humains de salmonelloses

Au-delà du suivi des tendances évolutives des sérovars, la surveillance assurée par le réseau *Salmonella* apporte de précieuses informations pour identifier d'éventuelles sources alimentaires de contamination et étayer les investigations épidémiologiques menées par l'Institut de veille sanitaire (InVS), suite à la survenue d'une TIAC. Ce fut le cas, par exemple, à l'occasion des investigations menées lors de cas groupés de salmonelloses à *S. 4,12:i:-*, liés à la consommation de saucisson sec en 2010 (Jourdan-Da Silva et Le Hello, 2012b). Un

(4) Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8029 du 4 mars 2010, modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 relative à la mise en œuvre des arrêtés relatifs à la lutte contre les salmonelles dans les troupeaux de volailles – mesures relatives aux laboratoires.

(3) Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales.

Tableau 2. Nombre de souches du sérovar Mbandaka, collectées entre 2007 et 2012 par le réseau *Salmonella*, selon le secteur d'origine, la filière animale ou la catégorie d'aliment

Secteur / dont filière	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Alimentation humaine	60	45	62	76	71	135
dont fromage	7	9	4	7	9	15
dont lait cru	20	10	13	13	17	43
dont poulet	4	7	3	0	1	15
dont œuf	2	7	4	8	1	7
Santé et production animales	181	321	675	632	1014	1219
dont filière bovine	79	81	62	97	136	186
dont filière avicole	102	234	610	532	866	1022
Autres secteurs	87	117	123	92	56	186
Total	328	483	860	800	1 141	1 540

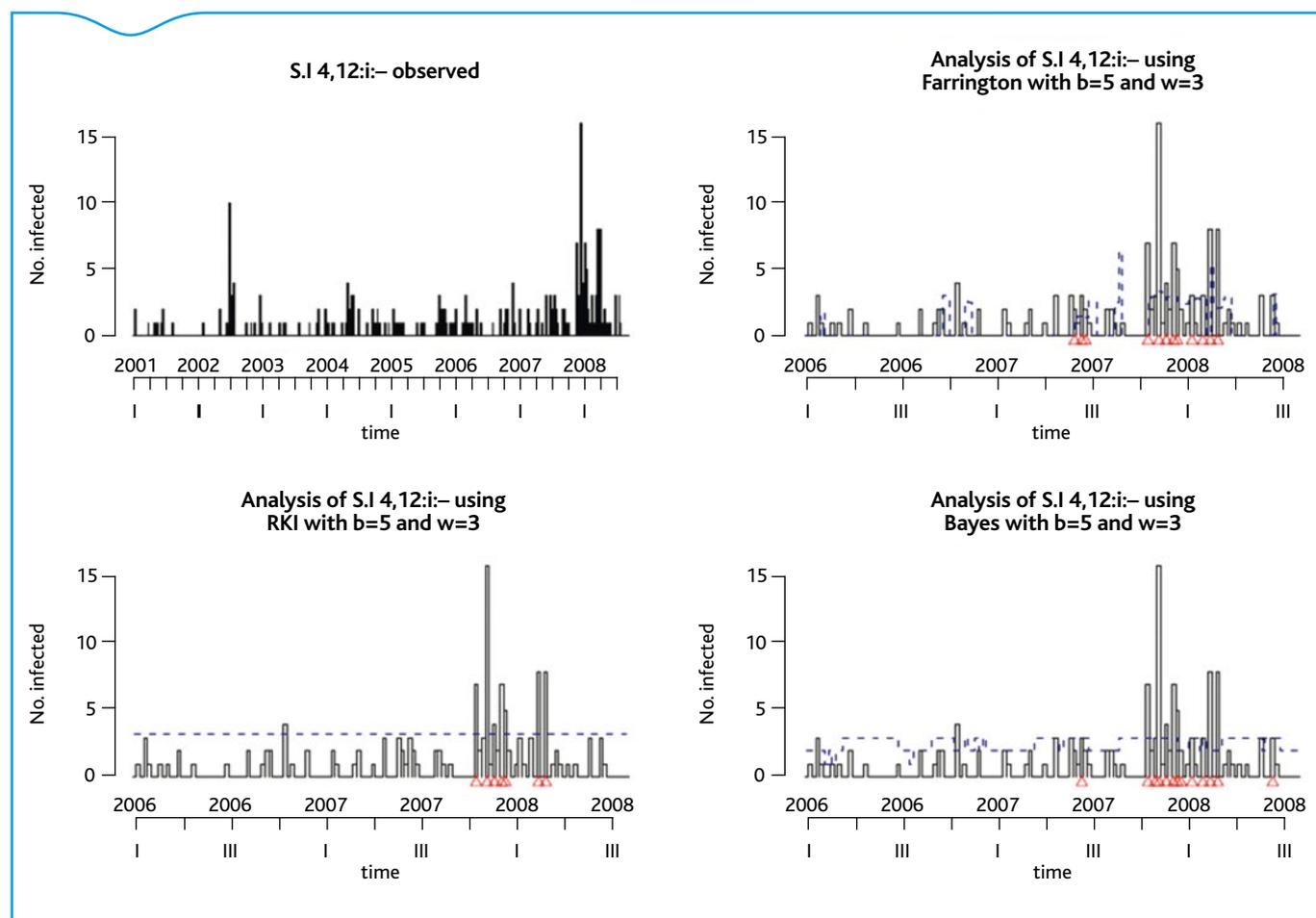


Figure 2. Distribution des alarmes produites par trois méthodes statistiques (Farrington, RKI et Bayes), au cours de la période 2006-2008, pour les souches *S. 1,4,[5],12:i:-*

Chaque graphique présente le nombre de souches collectées par le réseau *Salmonella* (en ordonnées) en fonction du temps (en abscisse). Chaque alarme statistique est signalée par un triangle rouge. Les pointillés bleus indiquent l'effectif attendu, calculé par chaque méthode statistique.

autre exemple est l'épisode épidémique qui a impliqué deux souches de *Salmonella*: *S. Typhimurium* et *S. 4,12:i:-*, entre décembre 2012 et janvier 2013. Les investigations épidémiologiques et microbiologiques étaient concordantes et ont montré que cette épidémie était liée à la consommation de produits achetés chez un traiteur (Bassi *et al.*, 2013).

Plus récemment, le réseau *Salmonella* a caractérisé en lien avec le CNR deux souches de *S. Enteritidis*, isolées d'œufs de consommation. Ces analyses ont été réalisées dans le cadre d'une alerte d'ampleur européenne à *S. Enteritidis* survenue durant l'été 2014, en lien avec la consommation d'œufs produits en Allemagne (ECDC et EFSA, 2014). À travers cet exemple, l'InVS a rappelé le potentiel épidémique de ce sérovar, malgré la baisse constante du nombre de cas rapportés en Europe ces dernières années (18^e journée annuelle du réseau *Salmonella*).

Les investigations menées suite à la survenue de cas humains dans des contextes variés (cas sporadiques ou groupés) mettent parfois en évidence des sérovares plus rares. Une revue de la littérature réalisée par Colomb-Cotinat *et al.* (2014), sur une période de vingt ans (1993-2013) a souligné l'importance de nouveaux animaux de compagnie (des reptiles, et particulièrement des tortues) comme source potentielle de contamination humaine par *Salmonella* chez les plus jeunes. La transmission des salmonelles aux jeunes enfants peut survenir de manière directe mais également indirecte, *via* les mains des parents ou l'environnement du foyer. Les sérovares isolés chez l'Homme dans ce contexte, appartiennent majoritairement à la sous-espèce *S. Enterica* subsp. *enterica* (Colomb-Cotinat *et al.*, 2014).

La détection d'événements inhabituels

La détection d'événements inhabituels repose sur un algorithme défini pour chacun des sérovars identifiés dans la base du réseau *Salmonella*. Le système utilise trois méthodes statistiques déjà en place dans certains centres nationaux de référence: la méthode de Farrington, une méthode reposant sur un algorithme bayésien et une méthode utilisée par l'Institut Robert Koch. Ces algorithmes programmés sous logiciel R se basent, pour chacune des trois méthodes, sur le calcul d'une valeur attendue de l'évènement pour la semaine en cours, en tenant compte des valeurs observées pour la même semaine au cours des cinq années précédentes. Une alarme statistique est produite si la valeur attendue est significativement différente de la valeur observée. La réalité épidémiologique de cette alarme est validée sur la base des données épidémiologiques transmises, après élimination des éventuels doublons ou autres faux signaux (envois groupés de résultats, par exemple).

Au cours de la période 2008-2009, différents signaux ont été identifiés à partir des données du réseau *Salmonella* (Danan *et al.*, 2011). À titre d'illustration, voici deux exemples de ces alarmes:

- le sérovar Hessarek, rare et non réglementé, a été détecté « en excès » par les trois méthodes statistiques durant le mois de septembre 2008. Ce sérovar était à l'origine d'une contamination localisée à tous les niveaux d'un élevage de canards. L'alarme a été notifiée aux partenaires impliqués dans la surveillance de la filière,
- des alarmes successives ont été émises depuis fin 2007, pour le variant monophasique du sérovar Typhimurium, de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- (Figure 2). Ces signaux successifs et fréquents suggéraient l'émergence massive de ce sérovar qui, aujourd'hui, est en tête des sérovars les plus fréquemment isolés chez l'Homme. L'émergence de ce variant a concerné l'ensemble des pays européens et américains pour lesquels les données de surveillance sont disponibles.

Ce système d'alarmes statistiques montre clairement sa puissance pour la détection de phénomènes rares, parmi les très nombreux sérovars et les données compilées au sein de la base de données du réseau *Salmonella*. Il est alors possible de mettre en place une surveillance accrue ou une vigilance ciblant spécifiquement ces sérovars d'intérêt. Des outils adaptés à la nouvelle application ACTEOLab sont en cours de développement pour répondre à ces attentes analytiques au sein du réseau *Salmonella* (Lailler *et al.*, 2014).

Discussion - Conclusion

Le réseau *Salmonella* a prouvé son utilité dans le dispositif national de surveillance et permet de mettre en place des actions renforcées de vigilance en cas de situation ou d'évolution inhabituelle. Il s'est révélé être un outil efficace pour la centralisation nationale des données de contaminations par *Salmonella* aux différentes étapes de la chaîne agro-alimentaire et la détection de clones ou sérovars émergents. Les actions d'amélioration des outils informatiques et épidémiologiques en cours faciliteront le partage d'information et l'analyse statistique automatique des données collectées. Dans ce contexte d'évolution des outils de surveillance, il est également nécessaire de consolider la représentativité des données collectées par le réseau. Pour cela, une meilleure estimation du nombre total d'analyses réalisées pour la recherche de *Salmonella* dans les différents secteurs d'activité et les différents types de prélèvements serait souhaitable. De plus, avoir une meilleure connaissance du nombre de prélèvements dans lesquels sont recherchées les salmonelles, permettrait d'estimer la fréquence de contamination des différentes matrices prélevées, pour chaque sérovar identifié.

Les tendances évolutives observées pour les principaux sérovars soulignent que le choix des deux sérovars (Virchow et Hadar) parmi les cinq sérovars réglementés en filière avicole s'avère de moins en moins pertinent. Une adaptation semble nécessaire et devrait prendre en compte les spécificités rencontrées actuellement dans les différentes

filiales: importance relative d'isolement des sérovars, prévalence accrue de contamination d'une catégorie d'aliment ou encore problématique particulière pour la santé publique, comme par exemple la résistance accrue aux antibiotiques.

Pour guider le gestionnaire du risque, le choix des sérovars réglementés pourra s'appuyer sur des travaux approfondis de caractérisation, basés sur le séquençage du génome bactérien. Ces études permettront d'affiner les connaissances liées à la circulation des clones majeurs de salmonelles, isolés dans la chaîne alimentaire et impliqué en santé publique. Elles faciliteront également les études d'attribution de source de contamination. Au final, la pression de contrôle exercée par les contrôles officiels pourra être davantage centrée sur les aliments ainsi définis comme étant les plus à risque et les recommandations destinées aux consommateurs pourront être d'autant plus ajustées.

Il est important de disposer d'une vision globale de la contamination et l'articulation entre les différents secteurs de la chaîne alimentaire (production primaire – aliment – Homme) doit être faite dans une démarche de type « One Health » (Calistri *et al.*, 2013). L'harmonisation des procédures de caractérisation et d'analyse des résultats doit être maintenue entre les différents acteurs de la chaîne de surveillance.

Les signaux d'alerte et de vigilance révélés par le dispositif de surveillance des salmonelles d'origine non humaine pourraient aboutir à la mise en place d'investigations approfondies sur le terrain. Ces études, programmées en concertation avec les responsables du dispositif de surveillance des salmonelles d'origine humaine, permettraient ainsi de mieux prévenir et maîtriser le danger que représentent les salmonelles. Les salmonelles ne connaissant aucune frontière entre les différents secteurs d'activité, le système de surveillance doit suivre la même logique.

Remerciements

Les auteurs remercient vivement tous les partenaires du réseau *Salmonella* ainsi que l'ensemble des membres de l'équipe d'animation de ce réseau, grâce à qui ce dispositif de surveillance peut exister et fonctionner.

Références bibliographiques

- Anses, 2011. Fiche de description de danger biologique transmissible par les aliments – *Salmonella* spp. Disponible en ligne, consulté le 19 janvier 2015: <http://www.anses.fr/Documents/MIC-Fi-Salmonellaspp.pdf>
- Anses, 2013. Avis de la saisine n°2012-SA-0214 relatif à l'identification de variants de *Salmonella* Typhimurium et la prise en compte de ces variants dans le programme officiel de lutte en élevage avicole. Disponible en ligne, consulté le 19 janvier 2015: <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/BIORISK2012sa0214Ra.pdf>
- Bassi, C., Merle, C., Fenières, A., Le Hello, S., Melik, N., Donguy, M.P., Lailler, R., Jourdan-Da Silva, N., 2013. Investigation d'un épisode de cas groupés de salmonellose à Paris 7e. Novembre 2012 à février 2013. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 40 pp.
- Bone, A., Noel, H., Le Hello, S., Pihier, N., Danan, C., Raguenaud, M.E., Salah, S., Bellali, H., Vaillant, V., Weill, F.X., Jourdan-da Silva, N., 2010. Nationwide outbreak of *Salmonella enterica* serotype 4,12:i:- infections in France, linked to dried pork sausage, Euro Surveill. 15(24):pii=19592.
- Boumart, Z., Roche S.M., Lalande, F., Virlogeux-Payant, I., Hennequet-Antier, C., Menanteau, P., Gabriel, I., Weill, F.X., Velge, P., Chemaly, M., 2012. Heterogeneity of persistence of *Salmonella enterica* serotype Senftenberg strains could explain the emergence of this serotype in poultry flocks. PLoS One 7(4): e35782.
- Calistri, P., S. Iannetti, Danzetta, M. L., Narcisi, V., Cito, F., Sabatino, D. D., Bruno, R., Sauro, F., Atzeni, M., Carvelli, A., Giovannini, A., 2013. The components of 'One World - One Health' approach. Transbound Emerg Dis 60 Suppl 2: 4-13.
- Colomb-Cotinat, M., Le Hello, S., Rosières, X., Lailler, R., Weill, F.X., Jourdan-Da Silva N., 2014. Cas publiés de salmonelloses chez les jeunes enfants secondaires à une exposition aux reptiles: revue bibliographique 1993-2013. Bull Epidemiol Hebd. 1-2, 8-16.
- Danan, C., Baroukh, T., Moury, F., Jourdan-da Silva, N., Brisabois, A., Le Strat, Y., 2011. Automated early warning system for the surveillance of *Salmonella* isolated in the agro-food chain in France. Epidemiol Infect. 139(5):736-41.

- David, J.M., Danan, C., Chauvin, C., Chazel, M., Souillard, R., Brisabois, A., Weill, F.X., Jourdan-Da Silva, N., Picherot, M., Guillemot, D., Sanders P., 2011. Structure of the French farm-to-table surveillance system for *Salmonella*. *Revue Med. Vet.*, 162 (10), 489-500.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) and EFSA (European Food Safety Authority), 2014. Multi-country outbreak of *Salmonella* Enteritidis infections associated with consumption of eggs from Germany – 25 August 2014. Stockholm and Parma: ECDC/EFSA.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991, 162 pp.
- Gossner, CM., van Cauteren, D., Le Hello, S., Weill, F.X., Terrien, E., Tessier, S., Janin, C., Brisabois, A., Dusch, V., Vaillant, V., Jourdan-da Silva, N., 2012. Nationwide outbreak of *Salmonella* enterica serotype 4,[5],12:i:- infection associated with consumption of dried pork sausage, France, November to December 2011. *Euro Surveill.* 17(5).
- Grimont, PAD., Weill, F.X., 2007. Antigenic formulae of the *Salmonella* serovars, (ninth ed.) Paris: WHO Collaborating Center for Reference and Research on *Salmonella*, Institut Pasteur.
- Jourdan-Da Silva N., Le Hello S., 2012a. Salmonelloses en France, 2002-2010: tendances en épidémiologie humaine, émergence de la souche monophasique, principaux aliments impliqués dans les dernières épidémies. *BEH Hors-série / 9 mai 2012*, 25-28.
- Jourdan-Da Silva, N., Le Hello, S., 2012b. Épidémie nationale de salmonellose de sérotype 4,12:i:- liée à la consommation de saucisson sec, 2010. *BEH Hors-série 9 mai 2012*, 29.
- Lailier, R., Moury, F., Granier, S.A., Brisabois, A., 2012. The *Salmonella* Network, a tool for monitoring *Salmonella* "from farm to fork". *Euro Reference* 8, 9-13.
- Lailier, R., Berta-Vanrullen, I., Alexandre, Z.L., 2014. ACTEOLab-*Salmonella*: plus qu'une base de données du réseau *Salmonella* français, un outil au service de la surveillance des salmonelles d'origine non humaine. *Euro Reference* 12, 21-23.
- Raguenaud, M.E., Le Hello, S., Salah, S., Weill, F.X., Brisabois, A., Delmas, G., Germonneau, P., 2012. *Euro Surveill.* 17(40):20289.

Questions et leçons clefs tirées de l'épidémie française de 2011 liée aux graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4

Delphine Sergentet-Thevenot (1,2) (delphine.sergentet@vetagro-sup.fr), Patricia Mariani-Kurkdjian (3), Christine Mazuy-Cruchaudet (1,2), Sarah Ganet (1,2), Malika Gouali (4), Valérie Vallet-Goyard (5), Patrick Fach (6), Renaud Lailier (6), Lisa King (7), Nathalie Jourdan (7), Estelle Loukiadis (1,2), Aurélie Kuakivi (8), Anselme Agbessi (9), Marie Lehouck (10), Frédéric Vey (11), Hélène Callon (10), Nathalie Pihier (10)

(1) Université de Lyon, VetAgro Sup, LMAP-Laboratoire national de référence des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines, Marcy L'Etoile, France

(2) Université de Lyon, UM R5557 Ecologie microbienne, CNRS, VetAgro Sup, Equipe BPOE, Université de Lyon 1, France

(3) Centre national de référence associé *Escherichia coli*, Hôpital Robert-Debré, AP-HP, Paris, France

(4) Institut Pasteur, Centre national de référence des *Escherichia coli* et *Shigella*, Paris, France

(5) DGCCRF, Laboratoire service commun des laboratoires, Oullins, France

(6) Université Paris-Est, Anses, Maison-Alfort, France

(7) Institut de Veille Sanitaire, Département des maladies infectieuses, Saint Maurice, France

(8) Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Unité d'alerte, Paris, France

(9) Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Bureau 4B, Paris, France

(10) Direction générale de l'alimentation, Mission des urgences sanitaires, Paris, France

(11) Direction générale de l'alimentation, Bureau de la biovigilance, des biotechnologies et de la qualité des végétaux, Paris, France

Résumé

En Allemagne, une épidémie de grande ampleur a été rapportée suite à la consommation de graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4. Il s'agissait d'une souche pathogène émergente. Peu de temps après (en juin 2011), quinze cas de SHU ou de diarrhée sanglante ont été signalés en France. Les enquêtes épidémiologiques, microbiologiques et de traçabilité menées ont montré que des graines germées contaminées par la même souche de *E. coli* O104:H4 que celle isolée en Allemagne et de même provenance étaient à l'origine de la contamination.

L'une des principales leçons à tirer de cette épidémie est que la souche épidémique *E. coli* O104:H4 impliquée était une souche entero-agrégative. Il existe à ce jour très peu de données sur les souches de STEC dans les graines et les graines à germer, et les méthodes de détection disponibles doivent être optimisées. Enfin, cette épidémie a montré une mobilisation très rapide et coordonnée des institutions et des laboratoires, limitant ainsi la propagation de l'épidémie en France.

Mots-clés

E. coli O104:H4, graines germées, SHU

Abstract

Feedback report on the 2011 outbreak due to sprouts contaminated by *E. coli* O104:H4

In May and June 2011, a major outbreak involving shigatoxin producing Escherichia coli (STEC) O104:H4 occurred in Germany. More than 3,000 people were reported ill including 845 cases of hemolytic-uremic syndrome (HUS) and 54 deaths. The outbreak was attributed to the consumption of STEC-contaminated fenugreek sprouts. Shortly after this, in June 2011, 15 cases of HUS and bloody diarrhea were reported in France, caused by contamination by the same E. coli strain served in a meal at a children's day camp. The identified source of the outbreak was the same sprouts implicated in the German outbreak.

The strains which caused both outbreaks were genetically related. They belonged to the O104:H4 serotype and possessed the stx2 gene (variant stx2a) encoding the Stx2 toxin. It did not possess the eae gene (encoding intimine), but did harbour the aggR gene encoding a factor regulating the expression of fimbriae responsible for high adherence to the intestinal mucosa and enabling it to produce biofilms (like enteroaggregative E. coli (EAggEC)). These two outbreaks highlight a lack of studies on STEC associated with plant-based products in general and on E. coli O104:H4 in particular, as well as a need to improve control strategies.

Keywords

E. coli O104:H4, Sprouts, SHU

Les *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) sont des agents pathogènes majeurs en santé publique. Ils sont à l'origine de colites hémorragiques sévères, mais également de syndromes hémolytiques et Urémiques (SHU). Ces SHU sont à ce jour, la principale cause d'insuffisance rénale aigue chez l'enfant âgé de un mois à trois ans. L'Homme est principalement exposé suite à la consommation d'aliments contaminés, tels que les produits carnés et les végétaux consommés crus ou insuffisamment cuits et les produits laitiers à base de lait cru (Afssa, 2003).

En Allemagne, une épidémie de grande ampleur a été rapportée suite à la consommation de graines germées contaminées par *E. coli* O104:H4. Il s'agissait d'une souche pathogène émergente considérée comme non pathogène selon la définition de l'Anses. Peu de temps après (en juin 2011), quinze cas de SHU ou de diarrhée sanglante ont été signalés en France. Des graines germées contaminées par la même souche d'*E. coli* O104:H4 étaient à l'origine de la contamination.

L'objectif de cet article est de synthétiser les enseignements tirés de cette épidémie française. Il est articulé en deux parties destinées respectivement à décrire l'épidémie, puis à en tirer les questions et leçons.

Description de l'épidémie

Le 22 juin 2011, l'hôpital d'instruction des armées Robert Picqué à Bordeaux a signalé à l'Institut de veille sanitaire (InVS), l'admission de huit adultes présentant des diarrhées sanglantes et des SHU. Le 28 juin 2011, sept autres cas ont été identifiés et investigués. Au total, 24 cas épidémiques et deux cas secondaires ont été identifiés (dont 9 cas de SHU).

Investigations épidémiologiques

Les huit premiers cas ont été interrogés à l'aide d'un questionnaire standardisé et semi structuré recueillant les données liées à leurs consommations alimentaires, leurs voyages et leurs contacts avec d'autres personnes souffrant de diarrhée dans les sept jours précédant l'apparition des symptômes. En l'absence de résultats, un second questionnaire explorant en détail la consommation de légumes dans les deux semaines précédant la maladie a été élaboré. Ce questionnaire a mis en évidence une association forte et significative entre la consommation de graines germées de fenugrec lors d'un buffet servi le 8 juin 2011 lors de la journée portes ouvertes d'un centre de loisirs et la survenue de la maladie (King et al., 2011).

Investigations microbiologiques

Souches isolées de cas cliniques

Des analyses effectuées chez les malades ont confirmé une infection à *E. coli* O104:H4. En effet, l'infection a été confirmée chez douze cas (10 cas primaires et 2 cas secondaires) dont onze par un isolement de la souche EHEC O104:H4 et un par une sérologie positive à *E. coli* O104.

La souche épidémique appartenait au sérotype O104:H4 et possédait le gène *stx2* (variant *stx2a*) qui code la toxine Stx2. Elle ne possédait pas les gènes *eae* (codant l'intimine), *hlyA* (codant l'hémolysine A) et *astA* (codant la toxine EAST1) mais hébergeait le gène *aggR*, codant un facteur de régulation de l'expression de fimbriae responsables d'une très forte adhérence à la muqueuse intestinale et qui lui confèrent la capacité à former des biofilms (Safadi *et al.*, 2012). Par ailleurs, cette souche présentait un profil de multi-résistance aux antibiotiques (présence du gène *blaCTX-M-15* codant une bêta-lactamase à spectre étendu et celle du gène *blaTEM* codant une pénicillinase).

Les caractéristiques phénotypiques et génétiques de cette souche ainsi que son profil de résistance aux antibiotiques, ont montré que cette souche était liée à la souche responsable de l'épidémie déclarée en Allemagne. De plus, deux outils de biologie moléculaire, la Rep-PCR (Repetitive sequence based Polymerase Chain Reaction (Rep-PCR) et l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE)) employés pour comparer les souches isolées de patients français et allemands ont montré que ces souches étaient génétiquement liées et proches (Mariani-Kurkdjian *et al.*, 2011). Néanmoins, l'utilisation d'outils de biologie moléculaire plus fins (séquençage de l'ADN complet des souches) (Gay *et al.*, 2012) a montré que les souches françaises présentaient un nombre légèrement plus élevé de mutations ponctuelles que les souches allemandes (Grad *et al.*, 2012). Enfin, des souches d'*E. coli* O104:H4 isolées en Suède chez des patients ayant voyagé en Allemagne et ayant déclaré les premiers signes cliniques avant le pic épidémique allemand présentaient des mutations ponctuelles (SNPs) spécifiques des souches françaises et pour d'autres, spécifiques des souches allemandes. Cette observation suggère l'existence d'au moins deux géno-groupes au sein de ces souches, résultant d'une expansion clonale après distribution des lots de graine ou encore d'une répartition inégale des géno-groupes dans les lots de graines (Guy *et al.*, 2012).

Analyses des graines germées suspectes

Une méthode officielle et harmonisée pour la recherche de souches STEC O104:H4 dans les aliments a été diffusée par le Laboratoire de référence de l'Union européenne (LRUE) et appliquée au Laboratoire national de référence des STEC (LNR VetAgro Sup, Campus vétérinaire de Lyon). Il s'agit de la méthode classiquement employée pour la détection des STEC dans les aliments (CEN/ISO TS 13136S) qui a été adaptée et optimisée pour la détection de souches STEC dans les graines germées (prise d'essai de 50 g de graines à germer écrasées afin de libérer les bactéries éventuellement présentes dans les graines). Après enrichissement en bouillon nutritif, l'ADN des bactéries présentes a été extrait et une recherche des gènes *eae* et *stx* a été effectuée. En cas de résultat positif pour le gène *stx2* et négatif pour le gène *eae*, le gène associé au sérotype O104 (*wzxO104*) a été recherché dans l'échantillon.

Une étape de confirmation a été mise en œuvre pour les échantillons présentant des résultats de PCR positifs pour les gènes *stx2* et *wzxO104*. Ainsi, les bouillons d'enrichissement ont été ensemencés sur des géloses Mc Conkey, un milieu TBX ou tout autre milieu permettant l'isolement d'*E. coli*, ainsi que sur un deuxième milieu plus sélectif contenant un supplément d'antibiotique (ChromAgar STEC O104). Les colonies possédant le gène *stx2* ont été sélectionnées et testées pour rechercher la présence des gènes *wzxO104* et *flic H4*, qui codent respectivement pour les antigènes O104 et H4 selon une méthode PCR précédemment développée au Laboratoire de sécurité des aliments de l'Anses et utilisée par le LRUE dans le cadre de l'épidémie allemande (Bugarel *et al.*, 2010).

Une seconde méthode non officielle mise au point par le LNR allemand (Federal Institute for Risk Assessment, BfR) lors de l'épidémie allemande a été employée en parallèle par le LNR français pour l'analyse des

graines. Cette méthode, qui incluait la germination des graines mettant en œuvre des conditions d'hygrométrie et des températures favorables au développement bactérien avait pour objectif de favoriser une reprise de croissance des bactéries stressées présentes à la surface et à l'intérieur des graines.

Aucun résultat positif n'a été obtenu sur les échantillons analysés, et ce, quel que soit le protocole appliqué.

Mesures de contrôle

Les enquêtes épidémiologiques et de traçabilité menées dans les deux pays et au niveau communautaire ont permis d'établir une source commune de contamination pour les épidémies allemande et française, un lot de graines de fenugrec importé d'Égypte en 2009. La Commission européenne a pris le 6 juillet 2011 des mesures d'urgence (décision d'exécution 2011/402/UE) visant à retirer du marché, analyser et détruire les lots incriminés de graines de fenugrec importées d'Égypte en Europe entre 2009 et 2011 et à interdire la mise en libre pratique, au sein de l'Union, des graines en provenance d'Égypte listées en annexe de la décision susmentionnée.

Les autorités françaises ont, pour leur part, étendu les mesures d'urgence prises par la Commission européenne en ordonnant la suspension de la mise sur le marché de tous les lots de graines de fenugrec importés d'Égypte depuis 2009 et des lots de graines et fèves provenant d'Égypte, mentionnées dans l'annexe de la décision d'exécution 2011/402/CE, et mises en libre pratique sur le territoire de l'Union européenne avant la mise en place des mesures d'urgence. Le retrait et la destruction de tous les lots de graines de fenugrec germées ou destinées à la germination importés d'Égypte au cours de la période 2009-2011 et présents sur le territoire français ont également été ordonnés. Les mesures prises au niveau national s'appliquaient jusqu'au 31 octobre 2011.

Questions et leçons clés tirées de l'épidémie

Quelles données sont disponibles sur les STEC et les graines germées ?

Très peu de données sont disponibles sur la prévalence des STEC dans les graines et les graines germées. Néanmoins, des souches de STEC O157:H7 ont été à l'origine d'épidémies de grande ampleur associées à la consommation de graines germées de radis et de luzerne, respectivement au Japon et aux États-Unis (CDC, 1997; Watanabe *et al.*, 1999). Les origines et voies de contamination des graines ne sont pas documentées. Néanmoins, les graines étant des produits agricoles, les voies de contamination notamment fécales peuvent être diverses et variées (EFSA 2011). L'EFSA considère donc que les végétaux tels que les graines germées, les fruits et les jus de fruits non pasteurisés sont des véhicules de transmission importants des STEC (EFSA 2011).

E. coli O104:H4, une souche émergente ?

Les récentes épidémies allemande et française (juin et juillet 2011) épidémiologiquement reliées à la consommation de graines germées ont été associées à une souche EAggEC (*E. coli* entero-aggrégative). Cette souche avait acquis la capacité de produire des Shiga-toxines suite à un transfert horizontal de gènes par un bactériophage (Rasko *et al.*, 2011). L'origine de la souche épidémique et la voie de contamination des graines n'ont pas été identifiées. Néanmoins, le séquençage du génome complet de la souche épidémique allemande a montré qu'il s'agit d'une souche entero-aggrégative (EAggEC). Ces souches sont fréquemment isolées du tube digestif de l'Homme. Certains ont donc émis l'hypothèse que les graines aient pu être contaminées par l'Homme (Soon *et al.*, 2013).

Des méthodes de détection des STEC dans les graines à optimiser ?

À l'exception d'un prélèvement effectué sur le reste de graines germées présent dans un sachet récupéré chez un malade allemand,

la bactérie *E. coli* O104:H4 n'a pu être mise en évidence dans aucun des échantillons de graine germées ou à germer aussi bien en Allemagne qu'en France. Cette difficulté analytique est probablement liée à différents facteurs (Anses, 2011):

- les graines sont généralement contaminées à de très faibles niveaux (0,1 à 1,8 CFU/g Liao and Fett, 2003),
- les graines sont généralement sèches. Les bactéries présentes à leur surface sont donc probablement dans un état de stress ou dans un état viable mais non cultivable. La survie de *E. coli* sur des graines pendant de longues durées est peu documentée (Beuchat and Scouten, 2002),
- les éventuelles bactéries présentes peuvent se retrouver à la surface mais également à l'intérieur des graines. Des études ont montré que des fissures ou des blessures des graines peuvent favoriser la pénétration des bactéries au sein des graines. Par ailleurs, des travaux destinés à évaluer la localisation de *E. coli* O157:H7 dans les graines ont été menés. Après une contamination expérimentale par inoculation directe ou par transfert direct des contaminants de la plante mère aux graines, celles-ci ont été traitées avec d'importantes concentrations de désinfectants. Les résultats ont montré que les traitements permettent une réduction du taux de contamination de seulement quelques unités logarithmiques. Ces résultats suggèrent que les bactéries sont localisées, pour une partie au moins, dans des zones protégées de la graine, l'autre partie se trouvant à la surface des graines (EFSA, 2011).

Quelles mesures de prophylaxie sont à disposition des professionnels ?

Ces deux épidémies ont révélé qu'il existe peu d'études sur les STEC associées aux végétaux en général et sur la souche *E. coli* O104:H4 en particulier (EFSA, 2011), et que des stratégies de lutte (préventives ou curatives) sont à définir hors destruction de lots potentiellement contaminés. À ce jour, les mesures de prophylaxie reposent sur un ensemble de mesures destinées à prévenir l'apparition ou la réémergence et la propagation des infections à STEC.

Méthodes préventives

Les épidémies pointant du doigt les graines germées ont été et sont à l'origine de la rédaction de différents guides destinés aux producteurs, tels que le guide de bonnes pratiques agricoles, le guide de bonnes pratiques de fabrication et le guide de bonnes pratiques d'hygiène relatif aux végétaux crus prêts à l'emploi (rédaction par le Centre technique au service de la filière fruits et légumes) en concertation avec la DGCCRF et en cours d'évaluation par l'Anses. D'autre part, depuis ces épisodes, les professionnels de la filière mettent en place des plans HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) qui peuvent être appliqués au cours de la production de graines, mais également au cours de la production de graines germées.

Néanmoins, l'application de ces règles ne suffit pas toujours à prévenir la contamination de certaines graines par des bactéries pathogènes.

Méthodes curatives

Ces méthodes sont plus spécialement destinées à éliminer les bactéries pathogènes présentes dans les aliments ou à éviter que des aliments contaminés soient consommés:

- désinfection des graines: il existe de nombreux traitements qui permettent une réduction significative (> 5 log) du nombre de bactéries pathogènes. Cependant, en dépit de considérables efforts, il n'existe, à ce jour, pas de méthode de désinfection permettant d'obtenir des graines germées indemnes de toute contamination par des bactéries pathogènes. Des traitements alternatifs (chauffage seul ou en combinaison avec d'autres traitements) pourraient améliorer l'efficacité des étapes de décontamination (EFSA, 2011),
- détection des STEC pathogènes: depuis peu (le 11 mars 2013), un critère microbiologique relatif aux STEC O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 dans les graines germées a été publié dans le journal officiel de l'Union européenne (règlement 209/2013

ayant modifié le règlement 2073/2005). Le critère est « absence dans 25 g » de produit commercialisé pendant sa durée de vie. Le protocole de détection préconisé est la spécification technique XP CEN ISO/TS 13136. Cinq analyses doivent être mises en œuvre sur chaque lot commercialisé. Soulignons cependant que les plans d'échantillonnage et les prises d'essai de graines ou graines germées à analyser ne sont, à ce jour, pas définis. Il semble qu'il existe une forte hétérogénéité des bactéries pathogènes (niveau de contamination) dans les graines et les graines germées (EFSA, 2011).

Quelles mesures de surveillance ont été mises en œuvre ?

En 2011, un plan de contrôle de la qualité microbiologique des graines germées crues à consommer en l'état et des graines à germer, a été mis en place par la DGCCRF et la DGAL sur l'ensemble du territoire national. Depuis, chaque année, un plan de contrôle de la qualité microbiologique des végétaux, dont les graines germées, consommés en l'état est diligenté par les services de la DGCCRF afin d'évaluer la prévalence des STEC appartenant aux sérogroupes O157, O26, O111, O103, O145 et O104:H4 dans ces matrices.

Utilité des travaux de recherche ?

La capacité d'un réseau de laboratoires à fournir une réponse rapide et efficace en situation d'urgence dépend des travaux de recherche menés en amont de la crise. Il s'agit en particulier du partage de méthodes, de caractérisation fine de souches et de matériaux de référence, ainsi que de la participation à des études inter-laboratoires. Les activités des laboratoires de référence européens peuvent ainsi apporter une contribution importante en se préparant à affronter une crise alimentaire comme nous l'avons connue (Caprioli *et al.*, 2012).

Conclusion

Les enquêtes épidémiologiques et microbiologiques menées lors de cette épidémie française ont montré que des graines germées contaminées par la même souche de *E. coli* O104:H4 que celle isolée en Allemagne étaient à l'origine de la contamination. Les institutions, les laboratoires ont réagi très rapidement, limitant ainsi la propagation de l'épidémie. Néanmoins, différentes questions ont été soulevées. Les scientifiques notamment cherchent à présent à y répondre.

Références bibliographiques

- Afssa (2003). Bilan des connaissances relatives aux *Escherichia coli* producteurs de Shiga-Toxines (STEC). <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC-Ra-STECC.pdf>.
- Anses (2011). Avis relatif à l'état des connaissances scientifiques et aux informations disponibles permettant de formuler des recommandations, suite à la survenue de plusieurs cas de SHU observés en France en juin 2011, suspectés d'être liés à la consommation de graines germées. <https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/MIC2011sa0158.pdf>.
- Beuchat LR and Scouten AJ, 2002. Combined effects of water activity, temperature and chemical treatments on the survival of *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seeds. *J Appl Microbiol* 92, 382-395.
- Bugarel M, Beutin L, Martin A, Gill A, Fach P, 2010. Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *Int J Food Microbiol*. 2010 Sep 1;142(3):318-29.
- Caprioli A, Morabito S and De Smet K (2012). The role of European Union Reference Laboratories in food safety crisis: The experience of the EU-RL for *Escherichia coli* during the recent outbreak of *E. coli* O104:H4 infections, *EuroReference*, N°6.
- CDC, 1997. Outbreaks of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with eating alfalfa sprouts-Michigan and Virginia, June-July 1997 *MMWR*, 46, 741-744.
- EFSA 2011. Scientific Opinion on the risk posed by Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and other pathogenic bacteria in seeds and sprouted seeds, *EFSA Journal* 2011;9(11):2424.
- Grad YH, Lipsitch M, Feldgarden M, Arachchi HM, Cerqueira GC, Fitzgerald M, Godfrey P, Haas BJ, Murphy CI, Russ C, Sykes S, Walker BJ, Wortman JR, Young S, Zeng Q, Abouelleil A, Bochicchio J, Chauvin S, Desmet T, Gujja

- S, McCowan C, Montmayeur A, Steelman S, Frimodt-Møller J, Petersen AM, Struve C, Krogfelt KA, Bingen E, Weill FX, Lander ES, Nusbaum C, Birren BW, Hung DT, Hanage WP, 2011. Genomic epidemiology of the *Escherichia coli* O104:H4 outbreaks in Europe. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Feb 21;109(8):3065-70. doi: 10.1073/pnas.1121491109. Epub 2012 Feb 6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 3;109(14):5547.
- ISO/TS 13136. Microbiologie des aliments et aliments pour animaux — Méthode qualitative basée sur la Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR) en temps — Réel Méthode horizontale pour la détection des *Escherichia coli* producteurs de Shiga-toxines (STEC) appartenant aux sérogroupes O157, O111, O26, O103 et O145. http://www.iso.org/iso/fr/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=53328.
- King LA, Nogareda F, Weill FX, Mariani-Kurdjian P, Loukiadis E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Bingen E, Mace M, Thevenot D, Ong N, Castor C, Noël H, Van Cauteren D, Charron M, Vaillant V, Aldabe B, Goulet V, Delmas G, Couturier E, Le Strat Y, Combe C, Delmas Y, Terrier F, Vendredly B, Rolland P, de Valk H, 2012. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104:H4 associated with organic fenugreek sprouts, France. *Clin Infect Dis*. 2012 Jun;54(11):1588-94.
- Liao CH and Fett WF, 2003. Isolation of *Salmonella* from alfalfa seed and demonstration of impaired growth of heat-injured cells in homogenates. *Inter J Food Microbiol* 82, 245-253.
- Mariani-Kurdjian P, Bingen E, Gault G, Jourdan-Da Silva N, Weill FX, 2011. *Escherichia coli* O104:H4 south-west France, June 2011. *Lancet Infect Dis*. 2011 Oct;11(10):732-3. Erratum in: *Lancet Infect Dis*. 2011 Nov;11(11):807.
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra S, Chin CS, Ilopoulos D, Klammer A, Pemuso P, Lee L, Kisluk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyer SR, Frimodt-Moller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE and Waldor MK, 2011. Origins of the *E. coli* strain causing outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *New Engl J Med*, 365, 709-717.
- Safadi RA, Abu-Ali GS, Sloup RE, Rudrik JT, Waters CM, 2012. Correlation between *In Vivo* Biofilm Formation and Virulence Gene Expression in *Escherichia coli* O104:H4. *PLoS ONE* 7(7): e41628.
- Soon JM, Seaman P, Baines RN, 2013. *Escherichia coli* O104:H4 outbreak from sprouted seeds. *Inter J Hygi Envir Health* 216 (2013):346-354.
- Watanabe Y, Ozasa K, Mermin JH, Griffin PM, Masuda K, Imashuku S and Sawada T, 1999. Factory outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection in Japan. *Emerg Infect Dis*, 5, 424-428.

Vibrio impliqués en pathologie humaine : une étude de leur répartition dans des produits de la mer consommés en France

Stéphanie Copin (1) (stephanie.copin@anses.fr), Annick Robert-Pillot (1, 2), Mélanie Gay (1), Marie-Laure Quilici (2)

(1) Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Département des produits de la pêche et de l'aquaculture, Unité Bactériologie et parasitologie des produits de la pêche et de l'aquaculture, Boulogne-sur-Mer, France

(2) Institut Pasteur, Laboratoire des Bactéries pathogènes entériques, Centre national de référence des vibrions et du choléra, Paris, France

Résumé

Les *Vibrio* spp représentent une menace sérieuse et mondiale pour la santé humaine. Trois espèces, *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, sont plus particulièrement impliquées en pathologie humaine, à l'origine de gastro-entérites, de septicémies, plus rarement de toxi-infections alimentaires collectives, après ingestion ou manipulation d'aliments contaminés, fruits de mer crus ou insuffisamment cuits. Afin d'estimer le risque sanitaire associé à la consommation de produits de la mer en France, une étude exploratoire a porté sur 167 échantillons de crustacés, poissons et coquillages frais ou congelés importés ou produits localement. Parmi eux, 58 échantillons étaient positifs pour *Vibrio* (34,7 %). *V. parahaemolyticus* était le plus fréquent, dans 52 des échantillons, suivi par *V. vulnificus* dans 21 échantillons et *V. cholerae* dans un seul échantillon. *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* étaient présents simultanément dans seize échantillons. Les gènes de virulence (séquences *tdh* et *trh*) étaient présents dans treize des échantillons positifs pour *V. parahaemolyticus*. *V. cholerae* n'était pas toxigène. Ces premiers résultats révèlent que les produits de la mer peuvent présenter un danger potentiel pour la sécurité du consommateur en France et soulignent l'importance d'une surveillance de ces espèces.

Mots-clés

Vibrio pathogènes, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, produits de la mer

Abstract

Vibrio bacteria involved in human pathology: a study of their distribution in seafood consumed in France

Vibrio spp have emerged as a serious and global threat to human health. Of particular concern are *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* and *V. vulnificus*, linked to gastrointestinal infections and septicemia following the consumption of raw or undercooked seafood. The prevalence of these species was investigated in a total of 167 fresh or frozen crustacean, fish and shellfish samples locally produced or imported into France. These species were detected in 34.7% (n=58) of the samples (*V. parahaemolyticus* in 31.1%, *V. vulnificus* in 12.6% and *V. cholerae* in 0.6%). *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus* were simultaneously detected in 9.6% of the samples. Virulence genes (*tdh* and *trh* sequences) were present in 25% of the *V. parahaemolyticus*-positive samples. The *V. cholerae* strain was non-toxigenic. Our study highlights that seafood consumption might represent a risk for human health in France, and underlines the importance of surveillance of these species.

Keywords

Pathogenic *Vibrio*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus*, Seafood products

Bien que la France soit le quatrième producteur de produits de la mer et de l'aquaculture au sein de l'Union européenne (France Agrimer, 2014) la production nationale ne satisfait pas la demande intérieure. Les importations proviennent souvent des pays en voie de développement et des régions chaudes dans lesquels les produits de la mer sont exposés à des dangers particuliers inhérents au milieu ou consécutifs à des contaminations lors de leurs premières manipulations. Parmi ces dangers, les vibrions constituent un sujet de préoccupation par leur présence régulière dans les produits de la mer, et ces dix dernières années, par l'augmentation constante dans le monde du nombre d'infections qui leur sont liées (CDC, 2010). Cette progression pourrait être en relation directe avec le développement croissant de ces bactéries dans les eaux côtières et estuariennes, consécutif à l'anthropisation du littoral et au réchauffement planétaire. Mais, il est vraisemblable que la modification des habitudes alimentaires (augmentation de la consommation des produits crus), la mondialisation des échanges commerciaux, le développement de l'aquaculture intensive et l'augmentation de la proportion de sujets immunodéprimés, y contribuent de façon substantielle (Sims *et al*, 2011). Aussi, l'ensemble de ces éléments justifie pleinement de mettre en place une vigilance accrue sur ces pathogènes potentiellement émergents.

Ecologie et risque sanitaire

Les *Vibrio* sont des bactéries Gram négatif, hôtes naturels du milieu marin. Ils y sont présents soit à l'état libre, soit associés à différents supports, sédiments, particules en suspension, plancton. Ils sont

également retrouvés dans l'intestin et les tissus des poissons, des crustacés et des coquillages, et sont donc présents naturellement dans la matière première de produits alimentaires. Leur densité dans l'environnement marin évolue en fonction de divers facteurs climatiques et environnementaux, tels que la température de surface de l'eau, la salinité, la turbidité, le pH, la chlorophylle A. Le caractère saisonnier de l'augmentation de la densité des vibrions dans l'environnement marin, observée durant les mois les plus chauds de l'année, correspond au caractère saisonnier des infections chez l'Homme. Les *Vibrio* sont fréquemment isolés des produits de la mer à de faibles concentrations. Le risque sanitaire est alors essentiellement lié à leur capacité à se multiplier dans les aliments pendant leur stockage ou leur transformation, ces bactéries ayant une croissance rapide dans les produits de la mer, y compris les coquillages vivants. Un produit faiblement contaminé mais stocké dans de mauvaises conditions de température pourra rapidement atteindre une dose infectieuse pour l'Homme. Il est à noter que peu de données sont connues à ce jour concernant la dose réponse, quelles que soient l'espèce considérée et la voie de contamination.

Principales espèces pathogènes pour l'Homme

La reconnaissance du rôle des vibrions en pathologie humaine est surtout due à l'existence du « vibron cholérique », agent du choléra, appartenant aux sérogroupes O1 et O139 de l'espèce *V. cholerae*. Les souches de *V. cholerae* non-O1 et non-O139, et appartenant

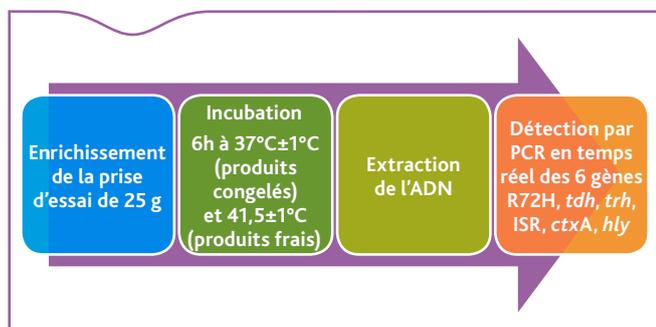


Figure 1. Principales étapes de la recherche des *Vibrio* potentiellement pathogènes pour l'Homme

à d'autres espèces de *Vibrio*, notamment *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus*, désignées par le terme de « vibrions non cholériques », sont responsables de toxi-infections alimentaires à l'origine de gastroentérites, ou d'infections extra-intestinales sévères dont des septicémies (Quilici et Robert-Pillot, 2011).

Une étude récente menée en Italie a montré que 3,4 % des cas hospitalisés pour gastroentérites aiguës après consommation de produits de la mer étaient dus à *V. cholerae* non-O1/non-O139 (Ottaviani *et al*, 2009). De nombreux facteurs de virulence sont associés aux infections à *V. cholerae* non-O1/non-O139, dont le pouvoir pathogène s'exprime par des mécanismes différents de ceux des vibrions cholériques. Dans de très rares cas, ces souches possèdent les gènes de la toxine cholérique.

V. parahaemolyticus est aujourd'hui reconnu comme la principale cause de gastroentérite associée à la consommation de produits de la mer aux États-Unis et au Japon. Le pouvoir pathogène de cette bactérie est lié à la présence de deux hémolysines, une hémolysine thermostable directe (thermostable direct hemolysin ou TDH) et une hémolysine apparentée à l'hémolysine thermostable directe (tdh-related hemolysin tdh-related

hemolysin ou TRH). Selon les données publiées, pratiquement tous les isolats de *V. parahaemolyticus* associés à une gastro-entérite produisent l'une et/ou l'autre des deux hémolysines.

La toxine cholérique de *V. cholerae* et les hémolysines TDH et TRH de *V. parahaemolyticus* ne sont pas préformées dans les aliments mais produites dans l'intestin suite à la colonisation par ces souches.

V. vulnificus est naturellement présent dans le milieu marin. Cette espèce produit un grand nombre de facteurs de virulence et est à l'origine d'un nombre croissant d'infections graves, essentiellement des septicémies primaires et des infections cutanées, dont l'évolution peut être extrêmement rapide et souvent mortelle, beaucoup plus rarement des infections gastro-intestinales.

Contexte réglementaire national

Les risques liés aux *Vibrio* dans les produits de la pêche dépendent des espèces et des souches susceptibles d'être détectées. Faute de réglementation au niveau européen, des modalités de gestion spécifiques, proportionnées et harmonisées des lots de produits de la mer ont été établies au niveau national par les autorités sanitaires. Quatre catégories principales de souches de *Vibrio* présentant un niveau de risque pour l'Homme par voie alimentaire sont répertoriées :

- *V. parahaemolyticus* possédant au moins l'un des gènes des hémolysines TDH ou TRH,
- *V. cholerae* appartenant aux sérogroupes O1 ou O139,
- *V. cholerae* non-O1 et non-O139 possédant les gènes de la toxine cholérique,
- *V. vulnificus* (uniquement pour des produits de la pêche et des coquillages importés des régions du monde où des cas humains dus à la consommation de produits contaminés par *V. vulnificus* ont été documentés).

Les lots contaminés par ces souches doivent être détruits.

Tableau 1. Échantillons analysés par type de produits et par origine géographique

Type de produit	Conservation	Matrice	Origine géographique
Poissons	Congelé (n=37)	Espadon (n=5)	Inconnue (n=5)
		Mahi-mahi (n=1)	Inconnue (n=1)
		Pangas (n=14)	Asie (n=14)
		Perche (n=3)	Ouganda (n=3)
		Plie (n=1)	Manche (n=1)
		Saumon (n=4)	Norvège (n=2), Pologne (n=2)
		Thon (n=9)	Inconnue (n=4) Équateur (n=5)
	Frais (n=27)	Bar (n=3)	Atlantique (n=3)
		Panga (n=2)	Asie (n=2)
		Plie (n=1)	Atlantique Nord Est (n=1)
		Saumon (n=10)	Norvège (n=7), Écosse (n=2), Atlantique Nord Est (n=1)
		Sandre (n=1)	Atlantique Nord Est (n=1)
		Sardine (n=5)	Atlantique Nord Est (n=3), France (n=2)
		Tilapia (n=1)	Équateur (n=1)
		Thon (n=1)	Équateur (n=1)
Truite (n=3)	France (n=3)		
Coquillages	Congelé (n=2)	Coquille Saint-Jacques (n=1)	Inconnue (n=1)
		Huître (n=1)	France (n=1)
	Frais (n=10)	Coquille Saint-Jacques (n=5)	Atlantique Nord Est (n=2), France (n=2), Danemark (n=1)
		Moule (n=5)	France (n=5)
Crustacés	Congelé (n=91)	Crabe (n=5)	Océan Indien (n=5)
		Crevette (n=82)	Asie (n=2), Bangladesh (n=5), Colombie (n=2), Équateur (n=11), Honduras (n=3), Inconnue (n=9), Inde (n=2), Madagascar (n=37), Nicaragua (n=1), Pérou (n=1), Océan indien (n=9)
		Gambas (n=4)	Argentine (n=1), Asie (n=2), Océan Indien (n=1)
Total	n=167		

Jusqu'en 2014, l'espèce *V. vulnificus* n'était pas prise en compte comme agent pathogène par voie alimentaire, car seuls les États-Unis et le Japon rapportaient des cas d'infection à *V. vulnificus* par voie digestive chez des groupes à risques (hôtes présentant essentiellement des pathologies hépatiques). De récentes données épidémiologiques ont fait évoluer cette position. En effet, en 2008, trois cas de chocs septiques dus à *V. vulnificus*, clairement liés à la consommation d'huîtres crues, et ayant entraîné trois décès en quelques heures, ont été signalés en Nouvelle-Calédonie (Cazorla *et al.*, 2009). C'est pourquoi les autorités compétentes ont décidé de prendre des mesures de destruction et de retrait du marché de tout lot contaminé par des souches de *V. vulnificus* lorsque celui-ci correspond à un des couples produits de la mer - région pour lesquels la contamination par *V. vulnificus* par voie digestive a été rapportée ou si les conditions épidémiologiques le justifient. Les facteurs de pathogénicité associés à *V. vulnificus* sont mal caractérisés et semblent être multiples. Les experts mondiaux considèrent donc toutes les souches comme potentiellement virulentes (FAO, 2005).

Étude de la distribution des *Vibrio* dans les produits de la mer

Compte tenu du contexte mentionné dans les paragraphes précédents et du potentiel de virulence de certaines souches, il est apparu nécessaire de développer des méthodes adaptées à la détection et à la caractérisation de ces agents pathogènes afin de mieux estimer la situation en Europe et le risque sanitaire associé à la consommation de produits de la mer. Ce risque a été étudié, particulièrement en Espagne, en Italie, en Suisse et en Allemagne (Canigral *et al.*, 2010; Ottaviani *et al.*, 2009; Schärer *et al.*, 2011; Huehn *et al.*, 2014), mais peu de données sont actuellement disponibles en France (Rosec *et al.*, 2012).

Dans ce contexte, une étude a été mise en œuvre en 2009 dans le cadre d'un projet visant à déterminer globalement la prévalence des *Vibrio* pathogènes pour l'Homme dans les produits de la mer, locaux ou importés, consommés en France et pour caractériser l'exposition des consommateurs au risque *Vibrio*. Un total de 167 échantillons

de produits de la mer (130 échantillons congelés et 37 échantillons frais) représentatifs du marché français ont été collectés avant leur commercialisation, de façon échelonnée dans le temps durant la période de 2009 à 2012 (Robert-Pillot *et al.*, 2010, 2014). Trois types de produits ont été étudiés : les crustacés, les poissons et les coquillages (Tableau 1) selon le protocole schématisé dans la Figure 1.

Parmi ces 167 échantillons, 58 (34,7 %) se sont révélés positifs pour au moins une des trois espèces de *Vibrio* recherchées (Tableau 2). L'espèce *V. parahaemolyticus* était prédominante et retrouvée dans 52 échantillons (31,1 %). *V. vulnificus* était présent dans 21 échantillons (12,6 %) et *V. cholerae* n'a été retrouvé que dans un seul échantillon (0,6 %). *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* étaient présents simultanément dans seize échantillons (9,6 %). L'analyse des résultats a montré que sept échantillons (18,9 %) des produits frais et 51 échantillons (30,5 %) des produits congelés étaient positifs pour au moins une des trois espèces de *Vibrio* étudiées.

Les échantillons les plus fréquemment contaminés étaient issus des crustacés congelés pour lesquels *V. parahaemolyticus* (porteurs ou non des gènes codant pour les hémolysines) et *V. vulnificus* étaient présents respectivement dans 46 échantillons (50,54 %) et quinze échantillons (16,48 %) (Figures 2 et 3). Des résultats comparables ont déjà été décrits dans la littérature et pourraient s'expliquer par la capacité des *Vibrio* à produire une chitinase et à adhérer et coloniser la carapace riche en chitine des crevettes et des crabes (Castro-Rosas and Escartin, 2002). D'autre part, le tube digestif des crevettes est étroitement associé au muscle caudal prélevé pour réaliser ces analyses, cette proximité induisant un fort risque de contamination. Le rôle de la matrice a également été mis en évidence dans une étude que nous avons menée sur des filets frais de saumons et de sardines dans lesquels peu de *Vibrio* potentiellement pathogènes ont été mis en évidence (Copin, communication personnelle). Le type de matrice (poissons, coquillages ou crustacés) pourrait avoir un impact important sur la présence des *Vibrio* dans les produits de la mer. Enfin, il semble que, quelle que soit la pratique de conservation (frais ou congelé), la présence de *Vibrio* peut être mise en évidence en cas de contamination,

Tableau 2. Détection des *Vibrio* totaux et pathogènes dans les produits de la mer

Matrice	Type de produit	Nombre d'échantillons	Congelé (C) ou Frais (F)	Présence (+) ou absence (-) par PCR en temps réel de				
				<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. vulnificus</i>	<i>V. cholerae</i>
				R72h ⁽¹⁾	<i>tdh</i> ⁽²⁾	<i>trh</i> ⁽²⁾	<i>hly</i> ⁽³⁾	ISR ⁽⁴⁾
Crustacés	Crevette	27	C	+	-	-	-	-
	Crevette	2	C	+	+	-	-	-
	Crevette	1	C	+	+	-	+	-
	Crevette	3	C	+	+	+	+	-
	Crevette	8	C	+	-	-	+	-
	Crevette	2	C	-	-	-	+	-
	Crabe	1	C	+	+	-	-	-
	Crabe	1	C	+	-	-	-	-
	Gambas	1	C	+	-	-	+	-
	Gambas	2	C	+	-	-	-	-
Poissons	Thon	1	C	-	-	-	+	-
	Panga	1	C	-	-	-	+	-
	Panga	1	C	-	-	-	-	+
	Truite	1	F	+	+	+	+	-
	Saumon	1	F	+	+	-	+	-
	Saumon	1	F	+	+	-	-	-
	Sardine	1	F	+	+	+	+	-
	Sardine	1	F	+	+	-	-	-
	Sardine	1	F	-	-	-	+	-
Coquillages	Coquille Saint-Jacques	1	F	+	+	+	-	-

(1) R72H : séquence spécifique de l'espèce *V. parahaemolyticus* ; (2) *tdh* et *trh* : gènes associés à la virulence de *V. parahaemolyticus* ; (3) *hly* : séquence codant pour l'hémolysine HLY de *V. vulnificus* ; (4) ISR : séquence spécifique de l'espèce *V. cholerae*

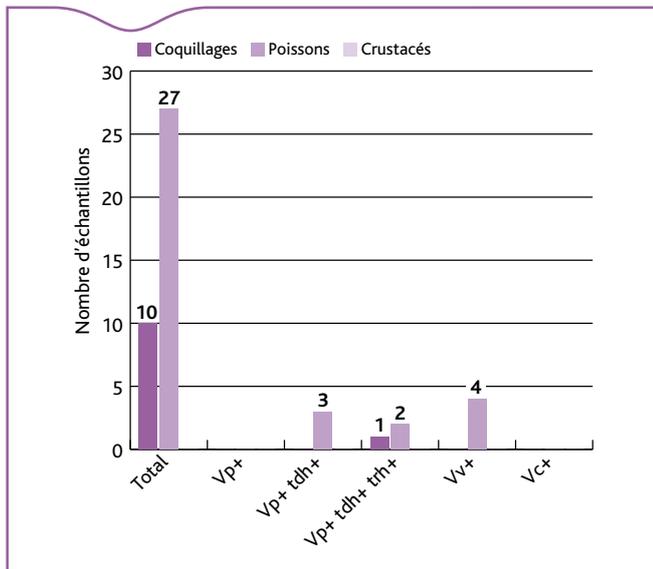


Figure 2. Nombre d'échantillons total analysés et positifs pour Vibrio par type de matrices dans les produits frais
 Vp : *Vibrio parahaemolyticus*, Vv : *Vibrio vulnificus*, Vc : *Vibrio cholerae*, tdh et trh : gènes des hémolysines TDH ou TRH

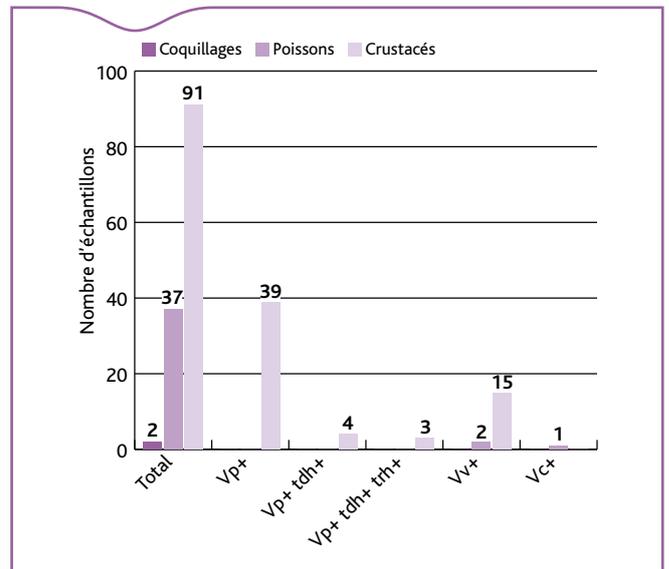


Figure 3. Nombre d'échantillons total analysés et positifs pour Vibrio par type de matrices dans les produits congelés
 Vp : *Vibrio parahaemolyticus*, Vv : *Vibrio vulnificus*, Vc : *Vibrio cholerae*, tdh et trh : gènes des hémolysines TDH ou TRH

notamment grâce à une étape d'enrichissement qui permet de revivifier les bactéries stressées, même dans les produits congelés.

Les gènes de virulence (séquences *tdh* et/ou *trh*) ont été détectés dans treize échantillons sur les 52 positifs pour *V. parahaemolyticus* (25 %), avec une proportion plus importante dans les produits frais que dans les produits congelés. En effet, les six échantillons de produits frais positifs pour *V. parahaemolyticus* étaient tous porteurs des gènes de virulence, alors que seulement sept des 46 échantillons de produits congelés positifs pour *V. parahaemolyticus* étaient porteurs des gènes codant pour les hémolysines. Ces résultats sont en accord avec ceux d'études antérieures dans lesquelles des variations de 1 % à 45 % ont été rapportées en fonction des zones géographiques étudiées, suggérant que certains secteurs de l'environnement peuvent constituer des écosystèmes particuliers dans lesquels les *Vibrio* seraient plus abondants (Robert-Pillot *et al.*, 2004; Cantet *et al.*, 2013). La grande variation observée dans la proportion de souches porteuses des gènes *tdh* et *trh* pourrait aussi s'expliquer par l'utilisation de méthodes de détection très différentes selon les études (hybridation sur colonies, PCR en temps réel basée sur l'utilisation d'agents intercalants type SYBR Green ou de sondes d'hydrolyse). *V. cholerae* détecté dans cette étude était non toxigène, mais pas forcément dénué de tout pouvoir pathogène. Le Centre national de référence des vibrions et du choléra identifie régulièrement des souches appartenant à cette espèce à l'origine d'infections humaines. À ce jour, aucun marqueur ne permettant de distinguer les souches virulentes de *V. vulnificus* des souches avirulentes, toutes ont été considérées comme ayant le même potentiel de pathogénicité. La proportion de *V. vulnificus* détectée dans cette étude (12,6 %) est plus élevée que celle décrite dans la littérature (Serracca *et al.*, 2011) mais peu de données sont disponibles actuellement, les études réalisées sur cette espèce restant rares.

Les résultats provenant de cette étude exploratoire doivent être interprétés avec précaution du fait du petit nombre d'échantillons prélevés dans chacune des trois grandes catégories de produits (crustacés, coquillages et poissons) analysés au cours des trois années d'étude. Les données obtenues en termes de types d'échantillon dans lesquels il a été possible d'isoler les trois espèces de *Vibrio* recherchées, doivent donc être analysées en tant que données qualitatives et peuvent difficilement permettre de calculer des valeurs de prévalence par type de produits avec une bonne précision. Néanmoins, il s'agit d'une première étude exploratoire qui permettra d'orienter les travaux complémentaires à mener, en particulier en termes de type de produits ou de mode de conservation.

De plus, au vu du nombre important de pays exportateurs, empêchant toute possibilité d'analyse statistique, il n'a pas été possible de corréliser la provenance des échantillons avec leur degré de contamination, ni d'identifier des sites écologiques particuliers.

Conclusion

Les résultats collectés au cours de cette étude donnent une indication intéressante sur la présence des espèces *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* dans les produits locaux ou importés mis en vente sur le marché français, et en particulier sur la présence de souches portant des gènes codant pour des facteurs de pathogénicité connus. Ceci souligne la nécessité d'une vigilance accrue et d'un contrôle régulier des produits régionaux ou importés, dont la mise en œuvre systématique pourrait évoluer à la faveur du développement récent de méthodes de détection et de quantification. Un renforcement de la surveillance des produits de la mer permettra de mieux anticiper la menace potentielle de ces pathogènes en santé humaine.

Remerciements

L'étude de prévalence a bénéficié d'un financement de FranceAgrimer (2010-1254).

Références bibliographiques

- Cañigral, I., Moreno, Y., Alonso, J.L., González, A., Ferrús, M.A., 2010. Detection of *Vibrio vulnificus* in seafood, seawater and wastewater samples from a Mediterranean coastal area. *Microbiol Res* 165(8):657-64.
- Cantet, F., Hervio-Heath, D., Caro, A., Le Menec, C., Monteil, C., Quéméré, C., Jolivet-Gougeon, A., Colwell, R.R., Monfort, P., 2013. Quantification of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* in French Mediterranean coastal lagoons. *Res Microbiol* 164, 867-874.
- Castro-Rosas, J., Escartin, E.F., 2002. Adhesion and colonisation of *Vibrio cholerae* O1 on shrimp and crab carapaces. *J Food Prot* 65, 492-498.
- Cazorla, C., Guigon, A., Mikulski, M., Scotet, J., Lacassin, F., 2009. O-01 Infection à *Vibrio Vulnificus* : à propos de 3 cas mortels. *Med Mal Infect* 39, S64-S64.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food – 10 States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2010; 59 (14): 418-22.
- Huehn, S., Eichhorn, C., Urmersbach, S., Breidenbach, J., Bechlers, S., Bier, N., Alter, T., Bartelt, E., Frank, C., Oberheitmann, B., Gunzer, F., Brennholt, N., Böer, S., Appel, B., Dieckmann, R., Strauch, E., Pathogenic vibrios in environmental, seafood and clinical sources in Germany. *Int J Med Microbiol*. 304(7):843-50.

- France Agrimer 2014. Les filières pêche et aquaculture en France, Edition avril 2014. 36 pp.
- Ottaviani, D., Leoni, F., Rocchegiani, E., Santarelli, S., Masini, L., Di Trani, V., Canonico, C., Pianetti, A., Tega, L., Carraturo, A., 2009. Prevalence and virulence properties of non-O1 non-O139 *Vibrio cholerae* strains from seafood and clinical samples collected in Italy. *Int J Med Microbiol* 132, 47-53.
- Quilici ML, Robert-Pillot A. 2011. Infections à vibrions non cholériques. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Maladies infectieuses, 8-026-F-15, 12pp.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Gay, M., Malle, P., Quilici, M.L., 2010. Total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp: Fast and reliable quantification by real-time PCR. *Int J Food Microbiol*, 143, 190-197.
- Robert-Pillot, A., Copin, S., Himber, C., Gay, M., Quilici, M.-L., 2014. Occurrence of the three major *Vibrio* species pathogenic for human in seafood products consumed in France using real-time PCR. *Int J Food Microbiol*, 189, 75-81.
- Robert-Pillot, A., Guérolé, A., Lesne, J., Delesmont, R., Fournier, J.M., Quilici, M.L., 2004. Occurrence of the tdh and trh genes in *Vibrio parahaemolyticus* isolates from waters and raw shellfish collected in two French coastal areas and from seafood imported into France. *Int J Food Microbiol* 91, 319-325.
- Rosec, J.-P., Causse, V., Cruz, B., Rauzier, J., Carnat, L., 2012. The international standard ISO/TS 21872-1 to study the occurrence of total and pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio cholerae* in seafood: ITS improvement by use of a chromogenic medium and PCR. *Int J Food Microbiol*, 157(2):189-94.
- Schärer, K., Savioz, S., Cernela, N., Saegesser, G., Stephan, R., 2011. Occurrence of *Vibrio* spp. in fish and shellfish collected from the Swiss market. *J Food Prot* 74, 1345-1347.
- Serracca, L., Battistini, R., Rossini, I., Prearo, M., Ottaviani, D., Leoni, F., Ercolini, C., 2011. *Vibrio* virulence genes in fishes collected from estuarine waters in Italy. *Letters Appl Microbiol*, 53(4):403-8.
- Sims, J.N., Isokpehi R.D., Cooper G.A., Bass M.P., Brown S.D., St. John A.L., Gulig P.A., Cohly H.H.P., 2011. Visual Analytics of Surveillance Data on Foodborne Vibriosis, United States, 1973–2010. *Environ Health Insights*, 5, 71-85.

Évaluation du danger viral dans les matrices alimentaires

Nicolas Boudaud (1) (n.boudaud@actalia.eu), Christophe Gantzer (2, 3)

(1) Actalia, Institut technique agro-industriel, Département sécurité des aliments, Villers-Bocage, France

(2) Université de Lorraine, Laboratoire de chimie physique et microbiologie pour l'environnement (LCPME), UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

(3) CNRS, LCPME, UMR 7564, Faculté de Pharmacie, Nancy, France

Résumé

Les norovirus et le virus de l'hépatite A sont fréquemment incriminés dans les épidémies alimentaires. Actuellement, le Comité européen de normalisation travaille à la mise en place de la norme ISO 15216 permettant de rechercher du génome de ces virus dans les aliments à risque. Les méthodes proposées par cette norme sont incontournables et parfaitement adaptées pour la recherche de l'origine alimentaire d'une épidémie virale. En revanche, le niveau de connaissance actuel ne permet pas encore de proposer une approche pertinente sur des aspects plus prospectifs d'estimation d'un danger viral, surtout dans le cas d'une réponse positive (par ex. en cas de génome viral détecté). En effet, en l'absence d'information sur le caractère infectieux de ces virus, l'application routinière de cette norme risque de surestimer le danger viral dans les aliments en entraînant le retrait potentiellement injustifié des lots du marché.

Cette surestimation est réelle car de fortes prévalences dans certaines matrices sont rapportées dans la littérature. Il convient donc dans les années à venir de préciser l'interprétation de ce type d'analyses ou de les compléter avec des outils permettant d'évaluer le caractère infectieux.

Mots-clés

Virus entériques, aliments, infectivité virale, génome viral, détection

Abstract

Viral hazard assessment in food matrices

Noroviruses and Hepatitis A virus are commonly implicated in foodborne disease outbreaks. The European Committee for Standardization is currently drafting the ISO 15216 standard enabling the detection of the genome of these viruses in vulnerable foodstuffs. The methods proposed by the standard are indispensable and perfectly adapted to detection of the dietary origin of a viral outbreak. However, based on the current state of knowledge, no relevant approach exists regarding prospective assessment of viral hazards, especially in cases with a positive response (e.g. when a viral genome is detected). Despite the lack of information regarding the infectivity of these viruses, the routine application of the ISO 15216 standard could lead to an overestimation of the dietary viral hazard and potentially cause unjustified foodstuff lot withdrawals from the market.

This overestimation is a reality, since high prevalences in certain matrices have been reported in the literature. It is therefore necessary in the coming years to specify the interpretation of such analyses or supplement them with tools for evaluating viral infectivity.

Keywords

Enteric viruses, Food, Viral infectivity, Viral genome, Detection

Depuis une dizaine d'années, les norovirus et le virus de l'hépatite A (VHA) sont les virus entériques les plus fréquemment incriminés dans les épidémies alimentaires. En 2013, la proportion d'épidémies causées en Europe par ces virus entériques a légèrement augmenté par rapport à l'année précédente, passant de 14 % à 18 % (EFSA, 2015). C'est ainsi que le risque viral dans les aliments ou l'eau n'est plus considéré comme un risque émergent, mais plutôt comme un risque avéré au regard des données de surveillance épidémiologiques et des alertes sanitaires diffusées par l'Institut national de veille sanitaire (InVS), le réseau européen *Rapid Alert System for Food and Feed* (RASFF) ou la revue Eurosurveillance. Par exemple, il est désormais bien établi que les toxi-infections liées à la consommation de coquillages sont majoritairement d'origine virale (par ex. norovirus). Entre 1996 et 2010, le nombre de foyers où les virus entériques étaient impliqués dans les toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) à coquillages s'élevait à 251 en France, représentant près de 54 % du total de ces TIAC (Vaillant *et al.*, 2012b). Pour les végétaux, des toxi-infections d'origine virale liées à la consommation de fruits rouges ou de salades sont aussi rapportées. Par exemple en Allemagne, une large épidémie alimentaire à norovirus a eu lieu en 2012 dans des cantines scolaires. Pas moins de 10 950 personnes contaminées, dont 38 cas d'hospitalisation, ont été enregistrées suite à la consommation de fraises congelées importées de Chine (Mäde *et al.*, 2013). Aux États-Unis, 67,7 % des épidémies alimentaires ont été imputées aux norovirus entre 2009 et 2010 (Hall *et al.*, 2013).

Ces virus sont des virus nus, constitués d'une capsid protéique de vingt à trente nanomètres et d'un génome à acide ribonucléique (ARN) simple brin de polarité positive (environ 7 500 nucléotides). Comme tous les virus entériques humains, ils pénètrent chez l'Homme par voie orale. La réplication des virus s'effectue alors soit au niveau des cellules intestinales (norovirus, VHA), soit au niveau des cellules hépatiques (VHA). La capsid virale reconnaît spécifiquement un récepteur de la cellule permissive et le génome, une fois libéré dans le

cytoplasme, permet à lui seul de synthétiser de nouvelles particules virales. C'est ainsi que le cycle infectieux peut être à l'origine chez l'hôte des symptômes de gastro-entérite ou d'hépatite. Les virus néoformés sont rejetés dans l'environnement par l'intermédiaire des selles et des vomissures. Comme pour tout virus, les virus entériques n'ont aucun moyen de se répliquer à l'extérieur de l'hôte. Pour que le pouvoir pathogène s'exprime au sein d'un nouvel hôte, il est indispensable que les virus ingérés possèdent à la fois une capsid et un génome viral intègres. Si tel est le cas, les virus sont considérés comme infectieux. Par analogie avec d'autres virus entériques (par ex. *rotavirus*, *enterovirus*), la dose infectieuse pour l'Homme évaluée avec un modèle *in vivo* devrait se situer entre un et cent virus infectieux (Afssa, 2007). Cette dose infectieuse n'a pas encore été quantifiée avec précision par culture cellulaire pour les norovirus, car les seuls systèmes *in vitro* potentiellement disponibles pour les cultiver n'ont été décrits que récemment (Jones *et al.*, 2014). En utilisant une approche moléculaire par Reverse Transcription – Polymerase Chain Reaction (RT-PCR), la dose infectieuse 50 % (ID_{50}) a été estimée à dix-huit particules pour les norovirus humains (Teunis *et al.*, 2008). Dans ce cas, la part de virus réellement et strictement infectieux demeurerait inconnue.

L'enjeu des traitements de désinfection (*i.e.* eau, aliments) a pour objectif d'inactiver les particules virales infectieuses en altérant la capsid et/ou le génome du virus pour empêcher le cycle viral et rendre ainsi le virus non infectieux. Pendant des décennies, la communauté scientifique a défini des conditions de traitement permettant d'inactiver des modèles de virus cultivables sans pour autant en préciser les mécanismes. Ce n'est que depuis quelques années que l'on commence à explorer les réels sites d'action de certains traitements au niveau de la capsid et/ou du génome.

La surveillance et la gestion du risque viral dans les aliments traités ou non sont une préoccupation de santé publique et représentent un enjeu

économique important pour les filières de production considérées comme à risque: coquillages (huîtres et moules essentiellement) et produits végétaux (fruits rouges et salades) en particulier.

L'objectif de cet article consiste à positionner, dans les contextes réglementaire et normatif actuels, l'interprétation du danger viral dans les aliments reposant sur la recherche du génome des virus dans les approches rétrospectives et prospectives. Il vise également à présenter les différentes voies de recherche destinées à préciser le caractère infectieux des virus dont le génome a été détecté dans l'aliment.

Contextes réglementaire et normatif

D'un point de vue réglementaire, aucun critère n'est établi à ce jour concernant les virus entériques. Cependant, les virus entériques entrent parfaitement dans le cadre réglementaire de l'article 14 du règlement CE 178/2002 du 28 janvier 2002, qui est à la base du Paquet hygiène en vigueur depuis 2006 au niveau européen.

Pour les filières conchylicoles et légumières, le danger viral n'est pris en compte que de manière indirecte à travers l'utilisation d'indicateurs bactériens de pollution fécale tel qu'*Escherichia coli*. Or, il est largement démontré dans la littérature que ce type de bactéries est moins résistant que les virus, aussi bien dans l'environnement que vis-à-vis des traitements de désinfection. Des épidémies liées aux fruits de mer ont d'ailleurs été décrites alors même que leur concentration en *E. coli* permettait de les classer dans la meilleure catégorie (catégorie A, < 230 Unités formant colonies (UFC) / 100 grammes de chair et liquide inter-valvaire (CLI)).

Afin d'établir des systèmes harmonisés de surveillance des virus entériques dans les aliments par les laboratoires de référence (laboratoires nationaux de référence (LNR), laboratoires de référence de l'Union européenne (LRUE)) et d'assurer une pression de contrôle sur

les productions nationales ou issues de pays tiers, le groupe de travail CEN / TC 275 / WG 6 / TAG 4 du Comité européen de normalisation (CEN) a élaboré des procédures consensuelles d'extraction, de détection et de quantification du génome des norovirus et du VHA par RT-PCR en temps réel dans des matrices alimentaires à risque. En 2013, la norme XP CEN ISO/TS 15216-(1-2) a été diffusée par le CEN (Organisation internationale de normalisation, 2013). Elle est encore sous le statut temporaire (TS) et expérimental (XP) car elle doit être validée selon un référentiel précis en termes de performances et de critères d'acceptabilité. La publication du document définitif est programmée pour 2016.

Le choix d'une détection du génome viral par RT-PCR est lié au fait qu'en l'absence de lignée cellulaire permissive *in vitro* utilisable à ce jour, seule cette approche permet de rechercher ces virus dans l'eau et les aliments. De plus, il s'agit de méthodes spécifiques et rapides. Néanmoins, le terme « *génome du virus détecté* » est imprécis puisque la détection ne concerne qu'une centaine de bases du génome viral (0,01 % du génome viral). Un résultat positif ne peut donc en aucun cas témoigner de l'intégrité structurale de la capsid, ni même de celle du génome, et ne témoigne donc pas du caractère infectieux du virus. Ainsi, l'interprétation de résultats positifs n'est pas du tout la même selon qu'il s'agisse d'une approche rétrospective ou prospective.

Estimation du danger viral dans les approches rétrospectives

Dans les approches rétrospectives, c'est-à-dire dans le cas des enquêtes épidémiologiques lors de TIAC, l'Agence régionale de santé (ARS) met en œuvre une investigation avec les structures compétentes dans le domaine de la santé humaine et alimentaire pour rechercher la source de contamination commune. Les enquêtes auprès des cas et des enquêtes

Tableau 1. Prévalence virale dans les coquillages et les végétaux pour des échantillonnages représentatifs entre 2007 et 2012 en Europe

Caractéristiques de l'échantillonnage					Virus entériques	Nombre d'échantillons		Prévalence (%)	Références
Aliment	Espèce / variété	Lieu de prélèvement	Origine	Date		Analysés	Positifs		
Coquillages	Huîtres	Marché, supermarché	France	2010-2011	Norovirus GI et GII	387	35	9,0	Schaeffer <i>et al.</i> , 2013
Coquillages	Moules	Zone de production, produits importés	Espagne, Grèce, Finlande	2010	Norovirus GI et GII, VHA	153	26	17,0	Diez-Valcarce <i>et al.</i> , 2012
Coquillages	Huîtres, moules, palourdes	Zone de production	Italie	2008-2012	Norovirus GI et GII	336	173	51,5	Suffredini <i>et al.</i> , 2014
Coquillages	Moules, palourdes, coques	Zone de production	Espagne	2011-2012	Norovirus GI et GII, VHA	168	93	55,4	Polo <i>et al.</i> , 2015
Coquillages	Huîtres, moules, couteaux, palourdes, amandes de mer	Zone de production, restauration, détaillant	Italie	2007-2010	Norovirus GI et GII	163	94	57,7	Pepe <i>et al.</i> , 2012
Coquillages	Huîtres	Zone de production	Grande-Bretagne	2007-2010	Norovirus GI et GII	873	625	71,6	Lowther <i>et al.</i> , 2012
Coquillages	Moules, palourdes, praires	Marché, supermarché	Espagne	2009-2010	VHA	329	28	8,5	Moreno Roldan <i>et al.</i> , 2013
Salades	Laitues (matières premières et produits de 4 ^e gamme)	Producteurs industriels	Espagne	2010-2012	Norovirus GI et GII	120	6	5,0	Perez-Rodriguez <i>et al.</i> , 2014
Salades	Laitues, chicorées, mâche (matières premières)	Producteurs industriels	Espagne, Italie, Belgique, France, Tunisie	2011	Norovirus GI et GII	210	26	12,4	Loutreul <i>et al.</i> , 2014
Salades	Laitues, roquette, radicchio	Supermarché	Canada	2009-2010	Norovirus GI et GII	641	181	28,2	Baert <i>et al.</i> , 2011
Fruits rouges	Framboises, fraises	Industries alimentaires	<i>Non précisé</i>	2009-2010	Norovirus GI et GII	150	10	6,7	Baert <i>et al.</i> , 2011
Fruits rouges	Framboises, fraises, mûres (produits congelés)	Producteurs industriels	Serbie, Chili, Bulgarie, Pologne, France, Espagne, Maroc, Turquie	2009-2010	Norovirus GI et GII	200	32	16,0	Loutreul <i>et al.</i> , 2014

cas-témoins permettent de suspecter certains aliments pouvant être à l'origine de l'épidémie. La recherche du génome des norovirus et/ou du VHA peut alors être effectuée dans les échantillons cliniques par les Centres nationaux de référence (CNR) d'une part et dans les aliments par les LNR, l'Anses ou les laboratoires départementaux d'autre part. La détection de génome viral dans l'un des aliments suspectés permet dans ce cas une interprétation assez aisée puisqu'un résultat positif a une forte probabilité de correspondre à des virus infectieux, ceux-ci ayant infectés leur hôte et provoqués l'épidémie. De plus, le séquençage des fragments de génome amplifiés par RT-PCR dans les selles des sujets infectés et dans l'aliment incriminé peut permettre ensuite d'établir un lien direct entre l'aliment et l'épidémie si la quantité extraite de génome viral est suffisante (Vaillant *et al.*, 2012a). Dans ces situations, les méthodes proposées par la norme XP CEN ISO/TS 15216 (2013) sont incontournables et parfaitement adaptées.

Estimation du danger viral dans les approches prospectives

Les données de prévalence en norovirus et VHA dans les matrices alimentaires à risque, basées sur la détection du génome viral, commencent à être documentées. Le **Tableau 1** regroupe un ensemble d'études d'occurrence virale réalisées à partir d'échantillonnages représentatifs ($n > 120$) entre 2007 et 2012. Même si les protocoles d'extraction et de détection du génome viral par RT-PCR en temps réel peuvent présenter certaines variations d'une étude à l'autre pour une matrice donnée, les stratégies développées sont en accord avec l'approche méthodologique décrite dans la norme XP CEN ISO/TS 15216 (2013) (Organisation internationale de normalisation, 2013). Les prévalences virales sont très hétérogènes au sein des trois catégories d'aliments présentées. Pour les coquillages, la prévalence en norovirus humains oscille entre 9,0 % et 71,6 %. Pour les salades et les fruits rouges, les proportions sont respectivement comprises entre 5,0 % et 28,2 % et entre 6,7 % et 16 %.

Dans ces situations, l'analyse des résultats négatifs est *a priori* relativement aisée si les critères d'acceptabilité de la méthode XP CEN ISO/TS 15216 (2013) sont valides et si la représentativité de l'échantillonnage est maîtrisée. En fait, l'absence de génome viral traduit l'absence de virus infectieux.

En revanche, la présence de génome viral est beaucoup plus délicate à interpréter en termes de danger viral, car aucune information sur le caractère infectieux des virus détectés n'est donnée. De très nombreuses données de la littérature démontrent que le génome viral persiste plus longtemps que le caractère infectieux (par ex. capsid et génome intègres) lorsque le virus est soumis à des facteurs d'inactivation environnementaux (par ex. UV, température) ou à des traitements de désinfection (par ex. dioxyde de chlore, chlore, peroxyde d'hydrogène). Cette différence peut être très importante puisque certaines études montrent par exemple que pour le poliovirus 1 à 35°C dans une eau souterraine, la diminution est de deux unités logarithmiques (Log_{10}) en 125 jours pour le génome alors que la même diminution est obtenue en 19 jours pour le caractère infectieux (Gassilloud *et al.*, 2003). Ces données ont été confirmées sur des virus modèles cultivables de la même famille que les norovirus (calicivirus félin) mais aussi sur des norovirus humains (Gassilloud *et al.*, 2003; Seitz *et al.*, 2011). Des résultats comparables ont aussi été largement publiés pour les traitements de désinfection, comme par exemple le dioxyde de chlore (ClO_2) ou même les ultraviolets (UV) qui ont une action directe sur le génome (Simonet and Gantzer, 2006a, 2006b).

Au vu de ces résultats, certaines études suggèrent d'utiliser un critère quantitatif plutôt que qualitatif pour la gestion du risque viral (Lowther *et al.*, 2012). Ainsi des seuils de l'ordre de 10^2 à 10^3 copies de génome viral/gramme en dessous desquels le risque viral semble faible sont parfois proposés. Tout le paradoxe est alors d'accepter dans les aliments des quantités de génome viral supérieures aux doses minimales infectantes proposées pour les virus entériques infectieux (Afssa, 2007; Teunis *et al.*, 2008). Le rapport virus infectieux/génome viral dans

l'environnement ou les aliments varie non seulement dans le temps, mais aussi en fonction des types de facteurs d'inactivation auxquels le virus a été soumis. Il est donc clair qu'il existe un risque d'infection virale élevé si la totalité des 10^2 à 10^3 copies de génome viral/gramme correspondent à des virus infectieux, alors que le risque est faible s'il s'agit de virus inactivés naturellement (par ex. UV, température) ou par traitement (par ex. désinfection). L'utilisation de tels seuils ne peut donc être qu'empirique et spécifique à certaines situations.

Il semble donc que le logigramme proposé par l'Anses en 2007 (Afssa, 2007) est toujours valable dans le sens où la détection de génome viral doit impérativement être accompagnée d'autres informations microbiologiques, épidémiologiques ou environnementales pour être interprétée en termes de danger viral. Par exemple, le danger viral est avéré si la présence de génome viral est associée à la présence excessive d'indicateurs de pollution fécale, à la déclaration d'une épidémie alimentaire ou à un défaut de traitement appliqué à l'aliment.

C'est ainsi qu'à la différence des approches rétrospectives, l'analyse du danger viral dans les approches prospectives laisse apparaître la nécessité d'intégrer notamment la notion de caractère infectieux dans les protocoles de surveillance et dans les démarches d'autocontrôles des aliments à risque.

La **Figure 1** représente schématiquement une synthèse de l'interprétation du risque viral dans les approches rétrospectives et prospectives.

Perspectives pour une meilleure caractérisation du danger viral

De manière à préciser le danger viral véhiculé par les aliments, il est nécessaire de compléter les résultats obtenus au moyen de la norme, par des informations sur le caractère infectieux. Les alternatives ne sont pas très nombreuses.

La première possibilité consiste à utiliser un traitement permettant d'éliminer le génome des virus non infectieux soit en les dégradant (par ex. RNases avec ou sans protéinase K), soit en empêchant leur amplification (par ex. agents intercalants de l'ARN), soit en sélectionnant les virus capables de reconnaître leur récepteur cellulaire (Histo-Blood Antigen Group pour les norovirus) avant la détection des génomes de virus infectieux (Dancho *et al.*, 2012; Escudero-Abarca *et al.*, 2014; Nuanalsuwan and Cliver, 2003). Ces approches donnent quelques bons résultats dans des situations particulières, mais la méconnaissance des mécanismes d'inactivation virale au niveau moléculaire empêche de préciser les conditions optimales d'utilisation. La deuxième possibilité, bien que controversée, serait d'utiliser un marqueur indirect de viabilité de nature virale comme les bactériophages fécaux dont le caractère infectieux est très facile à démontrer. C'est ainsi que la détection de génome viral, associée à la présence de bactériophages fécaux (phage ARN F-spécifiques, coliphages somatiques, phages de *Bacteroides fragilis*), pourrait être reliée à une probabilité forte de présence de virus entériques infectieux dont le génome seul a été détecté (logigramme Anses (Afssa, 2007)).

Il faut néanmoins rappeler que la présence d'indicateurs bactériens de pollution fécale est clairement associée à un risque viral puisque les virus entériques sont eux aussi d'origine fécale et sont considérés comme plus résistants que ces bactéries dans l'environnement. Il n'est alors pas nécessaire de faire des recherches virologiques coûteuses, mais plutôt de tenter d'abaisser le niveau de pollution fécale par des procédures adaptées. Ce n'est qu'en l'absence d'indicateurs bactériens que le danger viral devrait être précisé par une recherche de génome associée ou non à des bactériophages fécaux car les indicateurs bactériens peuvent sous-estimer la présence de virus entériques.

Il est incontestable que la nouvelle norme XP CEN ISO/TS 15216 (2013) est une avancée majeure pour identifier l'origine des TIAC et pour accumuler des données de surveillance harmonisées. Néanmoins, il est impératif de mieux comprendre les mécanismes moléculaires qui conduisent à l'inactivation des virus pour limiter la surestimation

dans les approches prospectives et proposer des protocoles de discrimination des virus infectieux et des virus non infectieux sur des bases scientifiques solides. Par ailleurs, les marqueurs indirects de pollution fécale et d'estimation du caractère infectieux ont un rôle important à jouer dans de nombreuses situations pour estimer un danger viral dans les aliments mais aussi pour évaluer l'efficacité virucide des traitements. Enfin, la possibilité récente de pouvoir cultiver *in vitro* les norovirus humains ouvre, elle aussi, des perspectives.

Remerciements

Les auteurs, partenaires dans le cadre de l'unité mixte technologique (UMT) VIROcontrol (2011-2016), remercient l'Association de coordination technique pour l'industrie agro-alimentaire (ACTIA).

Références bibliographiques

Afssa, Bultel, C., Grimault, L., 2007. Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, Maisons-Alfort.

Baert, L., Mattison, K., Loisy-Hamon, F., Harlow, J., Martyres, A., Lebeau, B., Stals, A., Van Coillie, E., Herman, L., Uyttendaele, M., 2011. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.* 151, 261–269. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.013.

Dancho, B.A., Chen, H., Kingsley, D.H., 2012. Discrimination between infectious and non-infectious human norovirus using porcine gastric mucin. *Int. J. Food Microbiol.* 155, 222–226. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.02.010.

Diez-Valcarce, M., Kokkinos, P., Söderberg, K., Bouwknecht, M., Willems, K., de Roda-Husman, A.M., von Bonsdorff, C.-H., Bellou, M., Hernández,

M., Maunula, L., Vantarakis, A., Rodríguez-Lázaro, D., 2012. Occurrence of human enteric viruses in commercial mussels at retail level in three European countries. *Food Environ Virol* 4, 73–80. doi:10.1007/s12560-012-9078-9.

Escudero-Abarca, B.I., Rawsthorne, H., Goulter, R.M., Suh, S.H., Jaykus, L.A., 2014. Molecular methods used to estimate thermal inactivation of a prototype human norovirus: More heat resistant than previously believed? *Food Microbiol.* 41, 91–95. doi:10.1016/j.fm.2014.01.009.

European Food Safety Authority, 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA J* 2015, 13(1): 3991.

Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3965–3969. doi:10.1128/AEM.69.7.3965-3969.2003.

Hall, A.J., Wikswo, M.E., Manikonda, K., Roberts, V.A., Yoder, J.S., Gould, L.H., 2013. Acute Gastroenteritis Surveillance through the National Outbreak Reporting System, United States. *Emerg. Inf. Dis.* 19, 1305–1309. doi:10.3201/eid1908.130482.

Jones, M.K., Watanabe, M., Zhu, S., Graves, C.L., Keyes, L.R., Grau, K.R., Gonzalez-Hernandez, M.B., Iovine, N.M., Wobus, C.E., Vinjé, J., Tibbetts, S.A., Wallet, S.M., Karst, S.M., 2014. Enteric bacteria promote human and mouse norovirus infection of B cells. *Science* 346, 755–759. doi:10.1126/science.1257147.

Loutreul, J., Cazeaux, C., Levert, D., Nicolas, A., Vautier, S., Le Sauvage, A.L., Perelle, S., Morin, T., 2014. Prevalence of human noroviruses in frozen marketed shellfish, red fruits and fresh vegetables. *Food Environ Virol* 6, 157–168. doi:10.1007/s12560-014-9150-8.

Lowther, J.A., Gustar, N.E., Hartnell, R.E., Lees, D.N., 2012. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. *J. Food Prot.* 75, 389–393. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-360.

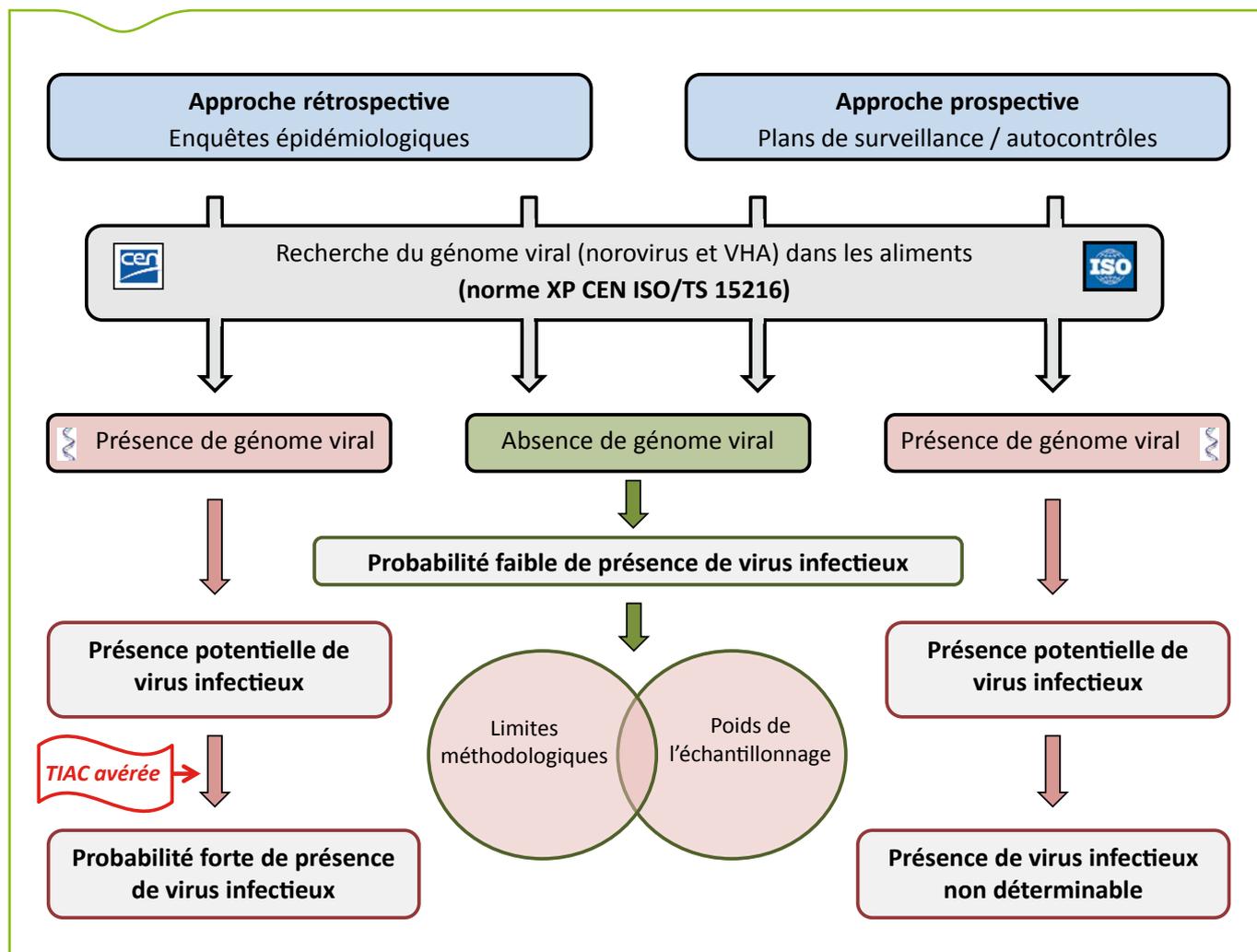


Figure 1. Analyse du risque viral dans les approches rétrospectives et prospectives

- Mäde, D., Trübner, K., Neubert, E., Höhne, M., Johne, R., 2013. Detection and Typing of Norovirus from Frozen Strawberries Involved in a Large-Scale Gastroenteritis Outbreak in Germany. *Food Environ Virol.* doi:10.1007/s12560-013-9118-0.
- Moreno Roldán, E., Espigares Rodríguez, E., Espigares García, M., Fernández-Crehuet Navajas, M., 2013. Prevalence of hepatitis A virus in bivalve molluscs sold in Granada (Spain) fish markets. *Foodborne Pathog. Dis.* 10, 528–532. doi:10.1089/fpd.2012.1376.
- Nuanalsuwan, S., Cliver, D.O., 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 350–357.
- Organisation Internationale de Normalisation, 2013. Norme internationale, 1^{re} édition. *Microbiologie des aliments - méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel. Partie 1: Méthode de quantification*, pp. 1-31 - partie 2: Méthode de détection qualitative, pp. 1-28, ISO-TS 15216-(1-2).
- Pepe, T., Ventrone, I., Suffredini, E., Ceruso, M., Croci, L., Anastasio, A., Cortesi, M.L., 2012. Norovirus monitoring in bivalve molluscs harvested and commercialized in southern Italy. *J. Food Prot.* 75, 976–981. doi:10.4315/0362-028X.JFP-11-424.
- Pérez-Rodríguez, F., González-García, P., Valero, A., Hernández, M., Rodríguez-Lázaro, D., 2014. Impact of the prevalence of different pathogens on the performance of sampling plans in lettuce products. *Int. J. Food Microbiol.* 184, 69–73. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.019.
- Polo, D., Varela, M.F., Romalde, J.L., 2015. Detection and quantification of hepatitis A virus and norovirus in Spanish authorized shellfish harvesting areas. *Int. J. Food Microbiol.* 193, 43–50. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.007.
- Schaeffer, J., Le Saux, J.-C., Lora, M., Atmar, R.L., Le Guyader, F.S., 2013. Norovirus contamination on French marketed oysters. *Int. J. Food Microbiol.* 166, 244–248. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.07.022.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., Moe, C.L., 2011. Norovirus Infectivity in Humans and Persistence in Water. *Appl Environ Microbiol* 77, 6884–6888. doi:10.1128/AEM.05806-11.
- Simonet, J., Gantzer, C., 2006a. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.* 100, 862–870. doi:10.1111/j.1365-2672.2005.02850.x.
- Simonet, J., Gantzer, C., 2006b. Inactivation of Poliovirus 1 and F-Specific RNA Phages and Degradation of Their Genomes by UV Irradiation at 254 Nanometers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7671–7677. doi:10.1128/AEM.01106-06.
- Suffredini, E., Lanni, L., Arcangeli, G., Pepe, T., Mazzette, R., Ciccaglioni, G., Croci, L., 2014. Qualitative and quantitative assessment of viral contamination in bivalve molluscs harvested in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* 184, 21–26. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.02.026.
- Teunis, P.F.M., Moe, C.L., Liu, P., Miller, S.E., Lindesmith, L., Baric, R.S., Le Pendu, J., Calderon, R.L., 2008. Norwalk virus: how infectious is it? *J. Med. Virol.* 80, 1468–1476. doi:10.1002/jmv.21237.
- Vaillant, V., De Valk, H., Saura, C., 2012a. Les systèmes de surveillance des maladies d'origine alimentaire : sources, méthodes, apports, limites. *BEH Hors Série*, 3–6.
- Vaillant, V., Jourdan-Da Silva, N., Quilici, M.-L., Couturier, E., Le Guyader, S., Delmas, G., Le Saux, J.-C., 2012b. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *BEH Hors Série*, 34–37.

Vigilance, veille et surveillance des **risques alimentaires phycotoxiques**

Charlotte Grastilleur (1) (charlotte.grastilleur@agriculture.gouv.fr), Nathalie Arnich (2), Catherine Belin (3)

(1) Ministère de l'agriculture de l'agroalimentaire et de la forêt, Bureau des produits de la mer et d'eau douce, Paris, France

(2) Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Direction de l'évaluation des risques, Maisons-Alfort, France

(3) Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer, Nantes, France

Résumé

La surveillance officielle des phycotoxines et de la flore productrice de celles-ci est régulièrement assurée en routine dans le milieu marin, grâce à des prélèvements d'eau pour lecture de flore comme par la réalisation d'analyses de coquillages. Ces dernières permettent le jugement de conformité par rapport aux teneurs maximales en phycotoxines réglementées fixées dans le règlement CE 853/2004. Ces actions relèvent du réseau officiel REPHY, animé par l'Ifremer.

Comme pour d'autres dangers des aliments, se pose la question d'une veille sanitaire complémentaire de la surveillance précitée, face aux dangers non réglementés ou émergents. L'Anses a été saisie de la question dans un contexte de révision du dispositif officiel de vigilance mis en place dans le cadre de la vérification de la pertinence des analyses chimiques des toxines lipophiles, suite au passage du bio-essai sur souris aux tests chimiques. La surveillance globale des flores par l'Ifremer doit permettre d'atteindre l'objectif de maîtrise des risques émergents.

Mots-clés

Phytoplancton, phycotoxines, biotoxines marines, *Alexandrium*, *Dinophysis*, *Pseudo-nitzschia*, ASP, DSP, PSP, surveillance des aliments, veille alimentaire, sécurité sanitaire des aliments, coquillages

Abstract

Monitoring and surveillance of phycotoxin food risks
Official routine monitoring of phycotoxins and toxin-producing algae is regularly implemented in the marine environment through phytoplankton identification in water samples, as well as by official analysis in shellfish in order to verify compliance with the maximum limits set in regulation (EC) no.853/2004.

These activities are conducted by the official REPHY network, coordinated by IFREMER (French Research Institute for Exploitation of the Sea).

As for other food safety hazards, the issue of emerging and non-regulated hazards needs to be fully addressed in addition to the ongoing above-mentioned surveillance efforts. This issue was submitted to ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety) in the surveillance framework set up to verify the relevance of chemical tests to replace the mouse bio-assays formerly used for lipophilic toxin detection. The global algae surveillance plan implemented by IFREMER should make it possible to reach the goal of controlling emerging risk.

Keywords

Phytoplankton, Phycotoxins, Marine biotoxins, Alexandrium, Dinophysis, Pseudo-nitzschia, ASP, DSP, PSP, Food monitoring, Food surveillance, Food safety, Shellfish

Une surveillance régulière des algues toxiques connues et réglementées

Les micro-algues toxiques constituent un danger récurrent pour les coquillages de nos côtes, métropolitaines comme ultramarines. Le développement de ces algues est tributaire de conditions environnementales favorisant : température, lumière, présence de nutriments (minéraux dissous...). Les principales algues à l'origine de syndromes chez l'Homme ou d'effets toxicologiques chez l'animal de laboratoire sont réglementées dans le règlement CE 853/2004 (Anonyme, 2004) qui fixe des teneurs maximales dans les coquillages résumées dans le [Tableau 1](#).

Les effets sur la santé liés à la consommation de coquillages contaminés par des phycotoxines peuvent être importants en termes de santé publique, voire sévères s'agissant de certains effets aigus : les tableaux cliniques peuvent aller jusqu'au décès pour les syndromes ASP (Amnesic Shellfish Poisoning) et PSP (Paralytic shellfish poisoning). Aucun décès n'est à déplorer en France, mais des cas de mortalités ont été recensés (pour revue : Frémy et Lassus, 2001) en Amérique du Nord, comme au Japon [2] ou encore en Amérique-du-Sud (Anonyme, 2007). Des effets chroniques plus difficiles à cerner sont documentés (saxitoxines, acide domoïque et toxines lipophiles réglementées) ou suspectés (Anonyme, 2010c) pour des phycotoxines non réglementées à ce jour, telles que les pinnatoxines.

La présence potentielle de ces micro-algues près des zones de production de coquillages implique la nécessité d'une surveillance et d'un contrôle officiel adaptés des coquillages de culture comme de

ceux issus de la pêche, à pied ou embarquée⁽¹⁾. De plus, en cas de contamination avérée, des mesures de gestion dédiées doivent être appliquées, qui vont de la restriction des usages de la zone à des fins de production alimentaire à la fermeture totale (règlement CE 854/2004, annexe II, chapitre II, C).

La surveillance officielle des toxines réglementées est encadrée, par le règlement CE 854/2004 (Anonyme, 2004). Elle doit intégrer l'ensemble des espèces de coquillages susceptibles d'accumuler les phycotoxines réglementées et l'ensemble des zones de production professionnelle de culture (huîtres, moules...) comme de pêche (palourdes, coquilles Saint-Jacques...) et de collecte (mollusques bivalves, échinodermes, tuniciers et gastéropodes).

C'est ainsi que le REPHY (Réseau d'observation et de surveillance du phytoplancton et des phycotoxines) piloté par l'Ifremer (Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer) assure depuis plus de trente ans une surveillance régulière des toxines dans les coquillages de l'ensemble des zones de production (à caractère professionnel et régies par les textes dits du Paquet hygiène sur la sécurité des aliments⁽²⁾) selon une stratégie décrite dans un document intitulé « Cahier de procédures REPHY » et revue annuellement. http://envlit.ifremer.fr/content/download/81386/558742/file/Cahier_REPHY_2012_version_finale_12_sep_%202012.pdf.

(1) En l'espèce les autorités compétentes de contrôle sont le MAAF/Direction générale de l'alimentation (DGAL) et les services déconcentrés de l'État, DDPP et DDTM (directions départementales chargées de la protection des populations d'une part et d'autre part chargées des territoires et de la mer).

(2) Il s'agit des règlements CE 178/2002, 852/2004, 853/2004, 882/2004 et 2073/2005, qui sont classiquement regroupés sous cette appellation. La pêche de loisir n'en relève pas et n'est pas l'objet du présent article.

Tableau 1. Récapitulatif des toxines réglementées (règlement (CE) n° 853/2004 modifié, annexe III, section VII, chapitre V)

Nom de la phycotoxine et substances d'intérêt	Symptomatologie- Syndrome associé chez l'Homme (ou effets toxicologiques chez l'animal de laboratoire)	Teneur maximale autorisée	Principales algues productrices en France métropolitaine
Phycotoxines à effet PSP (saxitoxines)	Syndrome paralysant (PSP)	800 µg/kg	<i>Alexandrium sp</i>
Phycotoxines à effet ASP (acide domoïque)	Syndrome amnésiant (ASP)	20 mg acide domoïque/kg	<i>Pseudo-nitzschia sp</i>
Phycotoxines dites lipophiles	Syndrome diarrhéique pour l'acide okadaïque et les dinophysistoxines (DSP ou « diarrheic shellfish poisoning »), pour les pectenotoxines, pas de syndrome rapporté chez l'Homme mais des effets documentés chez l'animal (hepatotoxicité)...	160 µg d'équivalent d'acide okadaïque/kg pour l'ensemble de l'acide okadaïque, des dinophysistoxines et des pectenotoxines	<i>Dinophysis sp</i> , <i>Prorocentrum lima</i>
Yessotoxines	Pas de syndrome rapporté chez l'Homme mais des effets documentés chez l'animal (cardiotoxicité)	3,75 mg d'équivalent yessotoxines/kg	<i>Protoceratium reticulatum</i> , <i>Gonyaulax spinifera</i> , <i>Lingulodinium polyedra</i>
	Syndrome diarrhéique pour les azaspiracides	160 µg d'équivalent azaspiracide/kg	<i>Azadinium spinosum</i>

PSP: paralytic shellfish poisoning
ASP: amnesic shellfish poisoning

Émergence et veille sanitaire : la vigilance est-elle suffisante ?

Au-delà de cette surveillance régulière, pour des phycotoxines déjà identifiées et réglementées, se pose la question de l'introduction de nouvelles micro-algues jusqu'ici absentes des eaux françaises, voire européennes, ainsi que de l'implication sanitaire éventuelle d'algues jamais identifiées ou de toxicité mal définie.

Il s'agit donc d'une question liée à l'émergence de nouveaux dangers et des risques associés, que ceux-ci soient exotiques et importés de pays endémiques vers la France, ou déjà présents en France ou en Europe mais peu ou non identifiés.

Cette émergence est plausible, comme en témoignent l'identification récente à Madère de *Gambierdiscus* producteur de ciguatoxines (phycotoxines responsables du syndrome nommé ciguatera ou gratte) (Otero *et al*, 2010 ; , Hossen *et al*, 2013), l'identification en 2011 de *Vulcanodinium rugosum* producteur de pinnatoxines dans l'étang d'Ingril (Hérault) ou encore la prolifération inhabituelle en rade de Brest (Chapelle *et al*, 2013) depuis 2012 d'*Alexandrium minutum* producteur de toxine PSP.

La mondialisation du trafic maritime et les flux qui en résultent, de même que la problématique du réchauffement climatique, ne font que renforcer le besoin de vigilance des pouvoirs publics sur ces questions : la question de la veille sanitaire phycotoxinique est donc posée, au sens de la terminologie généralement retenue par les évaluateurs de risques.

L'épisode durable de toxicité survenu à Arcachon en 2005 a conduit à revoir les techniques de détection de cette famille de phycotoxines (Tableau 1). Au bio-essai sur souris (BES : injection standardisée à l'animal et surveillance de survenue d'une symptomatologie) s'est substituée, à partir de 2010 (Anonyme-, 2005), une détection directe des molécules phycotoxiniques par analyse chimique (ou AC, méthode par chromatographie liquide couplée à la spectrographie de masse en tandem préconisée actuellement dans le règlement CE 2074/2005 modifié) des principales toxines exprimées en équivalent d'acide okadaïque. Cette méthode requiert de connaître *a priori* la liste des substances que l'on souhaite rechercher, à l'inverse du bio-essai sur souris qui est un outil de dépistage global.

Complémentairement, un réseau dit de « vigilance » a été mis en place en France en 2006, avec la mise en place de sept points de référence, puis dix points en 2008 (dispositif expertisé par l'Afssa en 2009 (Anonyme, 2009d) pour poursuivre une surveillance des phycotoxines dans ce contexte de passage du test des substances lipophiles sur souris à un test chimique (recherche spécifique des molécules réglementées). Cette « vigilance » est avant tout une comparaison des deux dispositifs analytiques, tests chimiques (AC) ou sur animal (BES).

Le but est de vérifier si, dans des échantillons de coquillages collectés dans quelques points de comparaison disséminés sur le territoire métropolitain, dits points de « vigilance », des molécules lipophiles

identifiables par test sur souris, sensible et peu spécifique, ne risquent pas d'être présentes mais non détectées par les recherches chimiques par LC-MS/MS, ciblées.

Nous ajoutons volontairement ici des guillemets à « vigilance », car cette terminologie est davantage celle appliquée à la surveillance des effets adverses, notamment pharmacologiques.

Le réseau de vigilance comprend les points énumérés dans le Tableau 2. Ces points de vigilance ont été sélectionnés parmi les points de surveillance REPHY et leur pertinence est revue annuellement. La carte d'origine est donc ajustée : elle doit encore l'être à la lueur de l'avis de l'Anses de 2014 (cf. infra). Aujourd'hui par exemple le point d'Antifer est désormais retiré (car non directement choisi pour représenter une zone de production de coquillages).

Chaque mois, ces points de vigilance font l'objet d'un double examen : un bio-essai sur souris sur la fraction lipophile et une analyse chimique (qui comprend les molécules réglementaires lipophiles). Les points de vigilance sont donc répertoriés actuellement en fonction de la survenue de phénomènes de discordance, c'est-à-dire de résultats non concordants entre le BES et l'AC.

En appui à ce réseau de vigilance a été mise en place dès 2010 une cellule de vigilance⁽³⁾ dont la mission est de fixer les actions à conduire pour compléter l'enquête sur les causes de discordance, selon un protocole qui évolue chaque année avec les connaissances et l'expérience acquise au fil du temps (diagramme de la Figure 1).

Le cas de discordance le plus fréquent est le BES+/AC-, qui signe la présence potentielle d'un danger que le « filtre » animal est capable de détecter, là où il n'est pas mis en évidence par les analyses chimiques classiques.

Dans ce cas et particulièrement lorsque cette discordance n'a jamais été observée au point considéré, des analyses supplémentaires peuvent être conduites.

Cette « vigilance » n'intègre pas, par construction (extraction et injection à l'animal de la fraction lipophile des échantillons), de toxines hydrophiles et ne permet donc qu'un criblage (« screening ») partiel, en vue de la détection d'une émergence ou d'une toxine non identifiée, non recherchée par les analyses chimiques spécifiques habituelles (toxines réglementées). Par ailleurs, comme le montre la carte des points (Tableau 2), elle correspond à un faible maillage du territoire.

La DGAL a donc souhaité revoir ce dispositif dans la perspective également d'améliorer la veille sanitaire sur le territoire national, au sens de l'exercice d'une capacité précoce de détection des dangers non réglementés, et non plus seulement d'un suivi d'inter-comparaison

(3) La cellule comprend les administrations, telles que la DGAL, la direction générale de la santé, la direction générale de la concurrence de la consommation et de la répression des fraudes, la direction des pêches maritimes et la direction de l'eau et de la biodiversité, l'Ifremer, l'Anses et l'Institut national de veille sanitaire, ainsi que, éventuellement, des experts invités.

Tableau 2. Liste des points de vigilance pour les phycotoxines lipophiles en 2009

Zone marine		Points de référence 2009		Suivi depuis	Coquillages		Commentaires	Échantillonnage
Code	Libellé	Mnémo	Libellé					
006	Baie de Somme-large	006-P-009	Pointe de St Quentin	2009	Moules	Bouchot	Zone non à risque, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	Aucun résultat disponible
010	Baie de Seine et Orne	010-P-002	Antifer ponton pêche	2008	Moules	structure spécifique	Zone à risque + maxima nationaux <i>Dinophysis</i>	Moules échantillonnées régulièrement depuis mars 2008
018	Cotentin Ouest	018-P-056	Pointe Agon Nord	2009	Moules Huîtres creuses	Bouchot Culture sur table	Zone à risque pour les coquillages côtiers, n'ayant jamais connu d'épisode toxique	Moules échantillonnées régulièrement depuis mars 2009
047	Baie de Concarneau	047-P-003	Le Scoré	2008	Moules Huîtres creuses	Filière Culture sur table	Zone à risque	Moules échantillonnées régulièrement depuis mai 2008
065	Estuaire de la Vilaine	065-P-001	Kervoyal	2008	Moules	Bouchot	Zone à risque + résultats de temps de survie courts avec symptômes neurologiques en 2006 et 2007	Moules échantillonnées régulièrement depuis mai 2008
068	Traits du Croisic	068-P-002	Le Grand Traict	2006	Moules Huîtres creuses Coques	Culture à plat Culture sur table Gisement naturel	Zone à risque + observation de résultats douteux à plusieurs reprises, dont certains avec symptômes neurologiques en 2006, 2007 et 2008	Moules (principalement) ou huîtres ou coques ou palourdes échantillonnées régulièrement depuis mai 2006
082	Pertuis de Maumusson	082-P-009	Ronce	2006	Huîtres creuses Coques	Culture sur table Gisement naturel	Zone non à risque mais observation de résultats douteux à plusieurs reprises avant 2007	Huîtres échantillonnées régulièrement depuis avril 2006
087	Arcachon aval	087-P-009	Banc Arguin Sud	2006	Moules Huîtres creuses Coques	Gisement naturel Culture sur table Gisement naturel	Plusieurs épisodes toxiques atypiques depuis 2005	Moules et huîtres échantillonnées régulièrement depuis janvier 2006
097	Étang de Salses-Leucate	097-P-002	Parc Leucate 2	2006	Moules Huîtres creuses	Filière ou corde Filière ou corde	Zone à risque sur une longue période + observation de résultats douteux à plusieurs reprises	Moules et huîtres échantillonnées régulièrement depuis janvier 2006
118	Étang de Diana	118-P-001	Diana centre	2008	Moules Huîtres creuses	Filière ou corde radeau	Zone à risque	Moules (principalement) ou huîtres échantillonnées régulièrement depuis janvier 2008

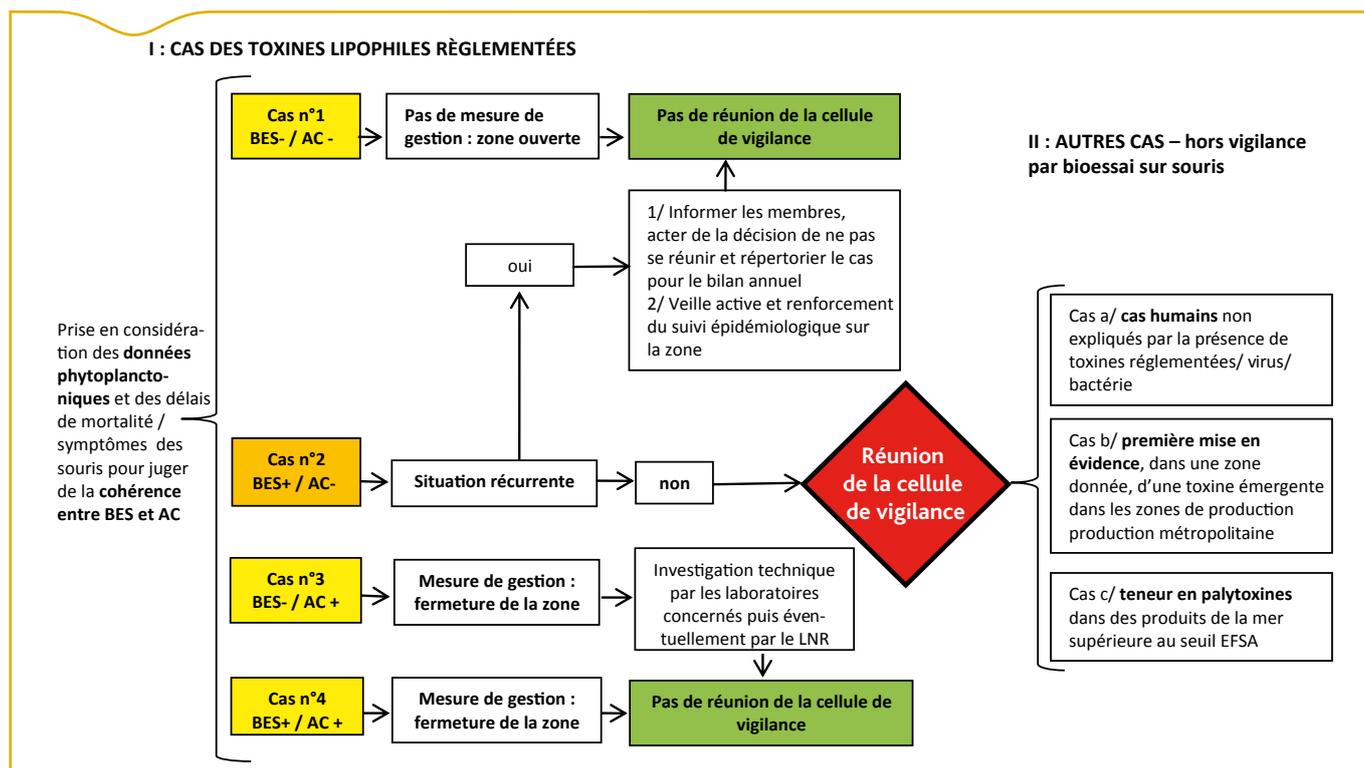


Figure 1. Protocole d'action sur les points de vigilance

entre le système de détection sur souris, dans le cadre du passage à un test analytique chimique plus ciblé.

C'est pourquoi l'Anses a été saisie par la DGAL pour analyser la pertinence de la poursuite de l'exercice de la vigilance dans son schéma actuel. L'avis de l'Agence (Anonyme, 2014) a été rendu le 29 juillet 2014.

L'Agence propose de maintenir le dispositif, tout en approfondissant les capacités de recherche sur les échantillons BES+/ AC- pour tenter de cerner l'origine de la toxicité en BES, ce qui n'est jamais facile. En effet, compte tenu du grand nombre de discordances observées chaque année depuis 2010 (7 en 2010, 20 en 2011, 16 et 2012 et 16 en 2013), il n'a pas été possible de conduire pour l'ensemble de ces cas les investigations approfondies nécessaires à l'identification de l'agent causal, qui est un travail de recherche long et complexe.

C'est pourquoi, l'Anses recommande que soit constituée une échantillothèque qui pourra être proposée en ce sens et mise à disposition de la communauté scientifique. Des projets scientifiques robustes seront les seuls à même d'approfondir la connaissance des phénomènes de discordance en présence, tant au plan de l'identification formelle des substances impliquées et des flores productrices de ces toxines que des effets toxicologiques de ces substances.

Les méthodes de « screening » non ciblées sont aussi une piste de réflexion importante pour l'identification des dangers en présence. C'est d'ailleurs un axe de travail fixé dans le programme 2015 du Laboratoire national de référence sur les bio-toxines marines (Anses Maisons-Alfort).

Avenir de la veille sur les coquillages

Au-delà du maintien de ces points de « vigilance » et du suivi, avec un maillage assez faible du territoire, des points décrits précédemment, il est nécessaire de penser globalement la détection précoce des flores phytoplanctoniques susceptibles de contaminer les coquillages.

L'Ifremer exerce à cet effet une surveillance globale du littoral. Le REPHY a en effet pour objectifs la connaissance du phytoplancton marin des eaux côtières, qui inclut entre autres le recensement des efflorescences exceptionnelles, le suivi des espèces phytoplanctoniques productrices de toxines susceptibles de s'accumuler dans les produits marins de consommation ou de contribuer à d'autres formes d'exposition dangereuse pour la santé humaine, et la recherche de ces toxines dans les mollusques bivalves présents dans les zones de production ou dans les gisements naturels.

Les observations du phytoplancton effectuées régulièrement sur plus d'une centaine de points de prélèvement répartis sur tout le littoral concernent, soit l'ensemble des espèces identifiables et dénombrables au microscope, soit une partie de ces espèces mais incluant obligatoirement les espèces toxiques connues ou soupçonnées de l'être, et les espèces proliférantes. Cette stratégie d'observation permet donc d'anticiper d'éventuels épisodes toxiques émergents, ou bien de revenir sur les observations historiques d'espèces rares si nécessaire, par exemple en cas de doute sur une éventuelle toxicité. De façon générale, la plupart des espèces toxiques sont dangereuses quand elles sont présentes à des concentrations importantes (la seule exception connue étant *Dinophysis*, producteur de toxines lipophiles). De ce fait, la prolifération inhabituelle d'une espèce toxique, que cette toxicité soit avérée ou seulement soupçonnée, est un signal important pour l'anticipation d'un éventuel épisode toxique.

C'est un rôle de veille majeur qui relève des pouvoirs publics. Celui-ci doit s'appuyer sur des connaissances fines des flores et sur des capacités entretenues (personnel suffisant et compétent) de lecture et d'identification taxonomique. Ces dernières sont essentiellement détenues par l'Ifremer qui bénéficie de plus de trente ans d'expérience dans le domaine des espèces marines. D'autres organismes de recherche tels que le Muséum national d'histoire naturelle ont également des compétences dans le domaine de l'identification taxonomique mais qui sont jusqu'ici plus tournées vers les espèces des eaux douces, en particulier les cyanobactéries.

Cela impose le maintien pérenne en France de ces compétences fondamentales pour la santé publique et la sécurité des aliments, avec une logique de diffusion et partage de ces compétences, et une adaptation constante des dispositifs de veille.

Références bibliographiques

Anonyme 2004. Règlement (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Anonyme 2005. Règlement (CE) n°2074/2005 (en particulier modifié par le règlement (CE) n°15/2011) de la Commission du 5 décembre 2005 établissant les mesures d'application relatives à certains produits régis par le règlement (CE) n°853/2004 du Parlement européen et du Conseil et à l'organisation des contrôles officiels prévus par les règlements (CE) n°854/2004 du Parlement européen et du Conseil et (CE) n°882/2004 du Parlement européen et du Conseil, portant dérogation au règlement (CE) n°852/2004 du Parlement européen et du Conseil et modifiant les règlements (CE) n°853/2004 et (CE) n°854/2004.

Anonyme 2007. Appui scientifique et technique de l'Afssa (saisine 2007-SA-0016) relatif au risque phycotoxinique dans les coquillages autres que les mollusques bivalves vivants (gastéropodes, échinodermes et tuniciers).

Anonyme 2010. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish- Cyclic imines (spirolides, gymnodimines, pinnatoxins and pteriatoxins). EFSA J. 8(6):1628.

Anonyme 2009a. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Domoic acid. EFSA J. 1181, 1-61.

Anonyme 2009b. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Saxitoxin group. EFSA J. 1019, 1-76.

Anonyme 2009c. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Pectenotoxin group. EFSA J. 1109, 1-47.

Anonyme 2009d. Scientific opinion on marine biotoxins in shellfish-Summary on regulated marine biotoxins. EFSA J. 1306, 1-23.

Anonyme 2009e. Avis de l'Afssa n°2009-SA-0205 relatif au dispositif de surveillance des phycotoxines lipophiles dans les zones conchylicoles concernant la détermination des périodes à risque et des points de référence.

Anonyme 2014. Avis de l'Anses (saisine n°2012-SA-0196) du 29 juillet 2014 relatif au dispositif de vigilance exercée vis-à-vis des phycotoxines lipophiles contaminant les coquillages dans le milieu marin.

Armitage, P., Berry, G., 1987. Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 94-100, 411-416.

Chapelle A., Le Bec C., Le Gac M., Labry C., Amzil Z., Guillou L., Dreanno C., Pineau-Guillou L. (2013). Étude sur la prolifération de la micro algue *Alexandrium minutum* en rade de Brest. Projet Daoulex. Rapport d'avancement n°1: Novembre 2013. <http://archimer.ifremer.fr/doc/00191/30230/>.

Frémy J.M. Lassus P. 2001. Toxines d'algues dans l'alimentation. Ifremer-Afssa-Ministère de l'environnement, 554 pp.

Hossen V., Velge P., Turquet J., Chinain M., Laurent D., Krysz S. 2013. La ciguatera: un état des lieux en France et dans l'Union européenne. Bull. Epid. Santé Anim. Alim. 56, 3-9.

Otero P. Pérez S., Alfonso A., Vale C., Rodríguez P., Gouveia N.N., Gouveia N., Delgado J., Vale P., Hiram M., Ishihara Y., Molgó J., Botana L.M., 2010. First toxin profile of ciguateric fish in Madeira Arquipelago (Europe). Annal. Chem.82(14): 6032-6039.

Brève. Les plans de contrôles et de surveillance nationaux en filière bovine pour la recherche de résidus d'antibiotiques

Short item. National control and surveillance programmes in the bovine sector for detection of antimicrobial residues

Isabelle Fournet (1) (isabelle.fournet@agriculture.gouv.fr), Brigitte Roudaut (2) (brigitte.roudaut@anses.fr)

(1) Direction générale de l'alimentation, Bureau des intrants et de la santé publique en élevage, Paris, France

(2) Anses, Laboratoire de Fougères, Laboratoire national de référence résidus de médicaments vétérinaires, Fougères, France

Mots-clés: plan de contrôle, plan de surveillance, bovin, viande, lait, antibiotiques/Keywords: Control plan, Surveillance plan, Beef, Meat, Milk, Antibiotics

Les résidus d'antibiotiques dans les denrées d'origine animale proviennent de l'administration d'un médicament vétérinaire antibiotique à un animal. En filière bovine, les plans de contrôle officiels visent à relever les traces éventuelles de ces substances antibiotiques, dans la viande et le lait, dont le risque en termes de santé publique a été préalablement évalué et a conduit à la définition des limites maximales de résidus (LMR) dans ces denrées pour les substances autorisées (règlement (UE) n° 37/2010). Les médicaments contenant les antibiotiques autorisés sont soumis à une évaluation en vue de la délivrance d'une autorisation de mise sur le marché (AMM) conduisant à la détermination des temps d'attente à respecter entre la dernière administration du médicament et la commercialisation des produits issus de l'animal (lait, viande, abats). Le respect des modalités d'utilisation (voie d'administration, posologie) et du temps d'attente permet de garantir avec une très forte probabilité des niveaux de résidus inférieurs aux LMR et une absence de risque toxicologique pour le consommateur.

Les méthodes d'analyse utilisées lors de ces contrôles officiels sont régulièrement révisées et validées par le Laboratoire national de référence (LNR) résidus de médicaments vétérinaires pour intégrer les nouvelles molécules mises sur le marché.

D'autres contrôles sur les résidus d'antibiotiques sont également effectués par les laboratoires interprofessionnels laitiers dans le cadre des critères sanitaires du lait cru et du paiement du lait en fonction de sa qualité. Les kits commerciaux utilisés pour cette recherche sont régulièrement revus pour étendre le dépistage aux nouvelles molécules et aux pratiques.

À côté de ces plans visant les antibiotiques autorisés ou non dans la filière bovine, d'autres plans de contrôle officiels ciblent les substances interdites telles que le chloramphénicol.

Des plans de contrôle ciblés pour détecter les mauvaises pratiques...

Depuis 1989, des plans de contrôle pour la recherche de résidus d'antibiotiques sont mis en place en production primaire bovine afin de répondre aux exigences européennes et en particulier de la directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits.

Ces plans doivent être ciblés, et ainsi en 2013, près de 3 900 prélèvements de viande ont été effectués en abattoir en utilisant des critères de ciblage allant de simples signes d'arthrite sur la carcasse jusqu'à des éléments d'information apportés pas l'ICA (document d'information sur la chaîne alimentaire); 560 prélèvements de lait cru ont été effectués dans les élevages ayant déjà présenté des résultats non conformes lors des autocontrôles effectués par

les laboratoires interprofessionnels laitiers ou vendant du lait cru en remise directe ou n'ayant jamais fait l'objet de prélèvement.

Ces prélèvements ont été répartis et analysés selon cinq stratégies analytiques combinant différentes méthodes d'analyses, trois dites en mono-résidus (recherche des résidus d'une seule famille d'antibiotiques) et deux en multi-résidus (recherche des résidus de plusieurs familles d'antibiotiques).

Pour les prélèvements de viande de bovin (Tableau 1), les résultats démontrent logiquement une plus grande capacité de détection des non-conformités à l'aide des stratégies multi-résidus, et notamment avec le dépistage par la méthode CL-SM/SM, par comparaison avec les approches basées sur des méthodes mono-résidus.

Les familles les plus fréquemment à l'origine des non-conformités sont les tétracyclines (42 %), les aminosides (28 %), les macrolides (23 %), les fluoroquinolones et les beta-lactamines. De nouvelles molécules de la famille des macrolides mises sur le marché récemment ont été détectées ces dernières années: tulathromycine, gamithromycine.

Les non-conformités concernent essentiellement les vaches laitières de réforme (44 %) puis les veaux et jeunes bovins (30 %) et enfin les vaches allaitantes (26 %). Dans le cas des vaches de réforme, pour 42 % des cas le critère de ciblage était un état visuel moyen de la carcasse; dans le cas des veaux et jeunes bovins, dans 50 % des cas le critère de ciblage concernait une infiltration du collier et enfin pour les vaches allaitantes dans 43 % des cas le critère de ciblage était une information fournie par l'ICA. Le reste des critères de ciblage utilisés étaient: myosite, pleurésie, lésions, arthrite, pneumonie, péritonite.

Le taux global de 0,7 % de non-conformité sur la viande de bovin peut être considéré comme très faible au regard des critères de ciblage utilisés (Bilan des plans de contrôle et de surveillance mis en œuvre par la DGAL en 2013).

Au cours des cinq dernières années, l'exposition globale des animaux aux antibiotiques a diminué de 15,7 % et en 2013, de 7,3 % par rapport à 2012. Pour les bovins, elle a diminué de 6,6 % entre 2012 et 2013 (Chevance et Moulin, 2014) même si globalement l'exposition aux antibiotiques a augmenté de 0,2 % au cours des cinq dernières années.

Les inspections en élevage ont permis de relever que le non-respect du temps d'attente est la cause la plus fréquente de non-conformité vis-à-vis de la présence de résidus dans les denrées d'origine animale (34 %); on retrouve également le non-respect de la prescription du vétérinaire (erreur sur les doses, erreur sur les animaux traités...) (16 %). Pour 50 % des non-conformités les causes n'ont pas pu être identifiées. Les inspections en élevage ont également permis de mettre en évidence d'autres non-conformités liées à des mauvaises pratiques d'élevage (absence de registre d'élevage, présence d'un registre

Tableau 1. Taux de non conformité par stratégie d'analyse en 2013

		Viande (prélèvement en abattoir)			Lait (prélèvement en élevage)		
		Nb de résultats recensés	Nb de résultats non conformes	Proportion de non conformes (%)	Nb de résultats recensés	Nb de résultats non conformes	Proportion de non conformes (%)
TOTAL		3 899	26	0,7	560	0	0
Recherche multi-résidus	4 boîtes + CL-SM/SM	1 891	17	0,9	300	0	0
	CL-SM/SM	293	5	1,7			
Recherche mono-résidus (par famille)	Sulfamides: HPTLC	736	0	0	260	0	0
	Tétracyclines: CLHP-UV	782	4	0,5			
	Quinolones: CLHP-fluorimétrie	197	0	0			

4 boîtes: méthode microbiologique de dépistage des inhibiteurs bactériens – CL-SM/SM: chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem – HPTLC: chromatographie planaire à haute performance – CLHP: chromatographie liquide couplée à la détection UV ou fluorimétrie.

d'élevage incomplet, mauvaise tenue de la pharmacie de l'élevage). Des avertissements et/ou rappels à la réglementation ont été effectués auprès des éleveurs concernés.

... associés à une surveillance pour ne pas passer à côté des nouvelles pratiques d'utilisation des antibiotiques

Dans le contexte actuel de promotion d'un usage prudent des antibiotiques pour réduire les risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire, l'accent est mis en élevage sur le bon usage de ces médicaments au niveau des différentes filières animales.

Un changement des pratiques d'utilisation de médicaments antibiotiques est donc à prévoir. La capacité de surveillance d'une gamme plus importante des résidus provenant de l'usage des différentes familles d'antibiotiques est donc fondamentale pour détecter des nouvelles pratiques.

C'est ainsi que pour 2014 puis pour 2015, il a été décidé d'accroître le nombre de prélèvements à analyser directement avec la méthode CL/SM-SM (chromatographie liquide couplée à un spectromètre de masse en tandem) en recherche multi-résidus. Pour 2015, la programmation des prélèvements pour la recherche de résidus d'antibiotiques en filière bovine prévoit plus de 2000 prélèvements de viande et 1 100 prélèvements de laits à analyser via cette stratégie analytique multi-résidus. En parallèle, le LNR a développé et validé, en incluant de nouvelles molécules, une nouvelle méthode permettant de dépister plus de 80 analytes.

Une autre approche dite « non ciblée » par l'utilisation d'appareil hybride à haute résolution en spectrométrie de masse est aussi abordée

par le LNR dans le cadre de ses activités de recherche. Des études complémentaires pourraient être envisagées dans l'alimentation pour mesurer l'exposition du consommateur aux résidus d'antibiotiques.

Références bibliographiques

Règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale.

Directive 96/23/CE du Conseil du 29 avril 1996 relative aux mesures de contrôle à mettre en œuvre à l'égard de certaines substances et de leurs résidus dans les animaux vivants et leurs produits et abrogeant les directives 85/538/CEE et 86/469/CEE et les décisions 89/187/CEE et 91/664/CEE.

Chevance A., Moulin G., 2014. Anses – ANMV Anses - Agence nationale du médicament vétérinaire. Suivi des ventes de médicaments vétérinaires contenant des antibiotiques en France en 2013.

<https://www.anses.fr/sites/default/files/documents/ANMV-Ra-Antibiotiques2013.pdf>.

Bilan des plans de contrôle et de surveillance mis en œuvre par la DGAL en 2013. http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/Bilan_PSPC_2013_cle0e1631.pdf.

Exemple de gestion des risques liés à un contaminant émergent des denrées alimentaires: les ions perchlorate

Patricia Dillmann (patricia.dillmann@dgccrf.finances.gouv.fr)

Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes, Bureau de la qualité et de la valorisation des denrées alimentaires, Paris, France

Résumé

Les ions perchlorate sont des contaminants environnementaux d'origine anthropique ou naturelle qui peuvent se retrouver dans les denrées alimentaires. Les risques liés à l'exposition à ces contaminants ont été évalués par le comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA), l'EFSA et l'Anses. Ces évaluations, qui sont basées sur la même étude, ont conduit à l'établissement de valeurs toxicologiques de référence différentes.

Les mesures de gestion des risques mises en place au niveau de l'Union européenne sont définies sur la base des conclusions de l'avis de l'EFSA, qui indique que l'exposition chronique aux ions perchlorate constitue une préoccupation sanitaire potentielle pour les forts consommateurs des catégories les plus jeunes de la population qui présentent une déficience en iode légère à modérée.

Des valeurs de référence ont été établies sur la base des données de contamination disponibles et une recommandation de la Commission européenne sera publiée en avril 2015 afin d'encourager le recueil de données de contamination. Des teneurs maximales réglementaires pourraient être fixées, le cas échéant, en 2016.

La présence de ce contaminant dans les denrées alimentaires fait l'objet d'une surveillance particulière de la part de la DGCCRF.

Mots-clés

Contaminant émergent, ions perchlorate, denrées alimentaires, risque sanitaire, surveillance, valeurs de référence

Abstract

Example of risk management for perchlorate, an emerging contaminant in foodstuffs

Perchlorate is a contaminant released into the environment from both anthropogenic and natural sources that can be found in foodstuffs. JECFA (joint FAO/WHO expert committee on food additives), EFSA and ANSES have assessed the risks related exposure to this contaminant. Their assessments, all based on a single study, led to the setting of different toxicological reference values.

The EU risk management measures are defined on the basis of the conclusions of EFSA's opinion, which indicate that chronic dietary exposure to perchlorate is of potential concern, in particular for the high consumers in the younger age groups of the population with mild to moderate iodine deficiency.

Reference values were defined in the light of the available contamination data and a Commission recommendation will be published in April 2015 to encourage the collection of additional data. Maximum regulatory levels could be established, where necessary, in 2016.

The presence of this contaminant in foodstuffs is subject to a special monitoring by the DGCCRF.

Keywords

Emerging contaminant, Perchlorate, Foodstuffs, Health risk, Monitoring, Reference values.

Les ions perchlorate sont des contaminants de l'environnement d'origine anthropique ou naturelle.

L'utilisation de certains fertilisants agricoles et/ou l'utilisation d'eau contaminée pour l'irrigation des végétaux et/ou au cours du procédé de lavage et de fabrication des denrées alimentaires peuvent être à l'origine de la contamination.

Les aliments qui contribuent principalement à l'exposition aux ions perchlorate sont les légumes et les produits à base de légumes, ainsi que le lait et les produits laitiers.

Evaluations des risques liés à l'exposition aux ions perchlorate

Les effets des ions perchlorate observés chez l'Homme sont essentiellement thyroïdiens: ce sont des inhibiteurs compétitifs du passage actif des ions iodure de la circulation sanguine dans les cellules des follicules thyroïdiens. L'incorporation des ions iodure dans la thyroïde est l'une des premières étapes de la synthèse des hormones thyroïdiennes. Un déficit de production d'hormones thyroïdiennes peut potentiellement conduire à des altérations du développement neurologique du fœtus et de l'enfant (Haddow *et al.* 1999).

Les risques liés à l'exposition aux ions perchlorate ont été évalués par le comité mixte FAO/OMS d'experts sur les additifs alimentaires (JECFA), l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et l'Anses. Les évaluations se sont toutes basées sur la même étude menée sur un groupe de 37 adultes volontaires sains pendant quatorze jours (Greer *et al.* 2002).

Les trois instances d'évaluation ont cependant établi des valeurs toxicologiques de référence différentes:

- en 2010, le JECFA a retenu une dose journalière tolérable provisoire de 10 µg/kg p.c./jour,
- en 2011, l'Anses a retenu une dose journalière tolérable de 0,7 µg/kg p.c./jour,
- en septembre 2014, l'EFSA a établi une dose journalière tolérable provisoire de 0,3 µg/kg p.c./jour.

Ces différences s'expliquent notamment par des divergences d'appréciation de l'impact sanitaire des niveaux d'inhibition de la fixation de l'iode par la thyroïde.

L'EFSA, dont l'avis sert de base à l'adoption des mesures de gestion décidées au niveau de l'Union européenne, indique que l'exposition chronique aux ions perchlorate constitue une préoccupation sanitaire potentielle pour les forts consommateurs des catégories les plus jeunes de la population présentant une déficience en iode légère à modérée. Par ailleurs, il est possible que l'exposition sur le court terme soit préoccupante pour les nourrissons allaités et les jeunes enfants dont les apports en iode sont faibles.

Pour limiter les incertitudes liées à son évaluation des risques, l'EFSA recommande le recueil de données d'occurrence complémentaires. Elle souligne également la nécessité de collecter des données de bio-monitoring (urine, lait maternel) associées au statut en iode de la population européenne, ainsi que des données complémentaires sur le niveau et la durée de l'inhibition de la fixation d'iode par la thyroïde ayant un impact sur les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez les groupes de la population les plus vulnérables.

Mesures de gestion des risques mises en place au niveau de l'Union européenne

Comme suite à la définition, dans certains États membres, de mesures de gestion des risques ayant conduit à des entraves aux échanges de fruits et de légumes et dans l'attente de disposer de l'avis de l'EFSA, la Commission européenne a défini, le 16 juillet 2013, en concertation avec les autorités compétentes des États membres, des valeurs de référence en deçà desquelles les produits pouvaient circuler librement sur le marché intra-communautaire.

L'avis de l'EFSA, adopté le 30 septembre 2014 a ensuite été examiné. Il a été jugé prématuré de fixer des teneurs maximales réglementaires en ions perchlorate, notamment en raison du nombre limité de données de contamination de certaines catégories de denrées alimentaires contributrices à l'exposition (légumes, aliments infantiles, laits et produits laitiers).

Une recommandation de la Commission relative au recueil de données complémentaires de la contamination des denrées alimentaires et à la mise en place d'enquêtes sur la recherche de la (des) source(s) de contamination, qui sera publiée en avril 2015, a par contre été validée.

Enfin, les valeurs de référence, établies en juillet 2013, ont été révisées à la baisse à la lumière des données de contamination recueillies après le 1^{er} septembre 2013 et sur la base des conclusions de l'EFSA. Les nouvelles valeurs, applicables depuis le 16 mars 2015, sont disponibles à l'adresse suivante: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/docs/statement_perchlorate_in_food_en.pdf

Plans de surveillance de la contamination des denrées alimentaires par les ions perchlorate mis en œuvre en France

En 2012

À la suite de l'étude préliminaire de l'exposition des enfants de zéro à six mois aux ions perchlorate menée par l'Anses en 2011, indiquant une préoccupation sanitaire potentielle pour cette catégorie de la population, un plan de surveillance de la contamination des préparations pour nourrissons, des préparations de suite et des aliments lactés destinés aux enfants en bas âge a été mis en œuvre par la DGCCRF. Au total, 69 échantillons ont été analysés. Les données recueillies ont été communiquées à l'Anses qui a rendu, le 8 avril 2014, un avis relatif à la présence d'ions perchlorate dans le lait infantile et dans l'eau destinée à la consommation humaine en France. L'Anses recommande de recueillir des informations complémentaires sur les sources de contamination des laits infantiles et des eaux par les ions perchlorate, afin de les réduire et d'informer la population desservie par une eau destinée à la consommation humaine présentant une teneur en ions perchlorate supérieure à 4 µg/l, pour qu'elle en limite la consommation chez les enfants âgés de moins de six mois. Par ailleurs,

le statut iodé étant un paramètre déterminant dans l'évaluation de l'impact sanitaire des ions perchlorate, l'Agence souligne la nécessité de produire des données sur le statut iodé des femmes enceintes et allaitantes et des enfants de moins de trois ans.

En 2014

Comme suite à la définition des niveaux de référence pour le commerce intra-communautaire, un plan de surveillance de la contamination des denrées alimentaires a été mis en place par la DGCCRF avec l'appui scientifique et technique de l'Anses. Au total, 211 échantillons (147 légumes, 33 fruits, 17 aliments infantiles à base de fruits ou de légumes et 14 laits) ont été analysés.

Le bilan de cette enquête sera publié avant la fin du premier semestre 2015. Un seul dépassement de la valeur de référence établie en 2013 a été constaté sur un échantillon d'épinards cultivés sous-abri. Ce résultat a été communiqué à la DGAL afin qu'une enquête complémentaire soit réalisée au stade de la production primaire pour rechercher et si possible réduire la source de la contamination.

Le plan de surveillance a été reconduit en 2015 sur les fruits et légumes et les aliments infantiles à base de fruits et de légumes.

Les données recueillies par les autorités compétentes des États membres et par les opérateurs dans le cadre de la recommandation de la Commission qui sera publiée en avril 2015 seront utilisées pour mieux caractériser l'exposition des consommateurs à ce contaminant. Des discussions sur l'opportunité de fixer des teneurs maximales réglementaires, qui pourront s'appuyer sur ces données, sont programmées en 2016.

Références bibliographiques

Anses, 2011 – Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à l'évaluation des risques sanitaires liés à la présence d'ions perchlorate dans les eaux destinées à la consommation humaine (saisine n°2011-SA-0024).

Anses, 2013 – Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à « la contamination des denrées alimentaires par les ions perchlorate » (saisine n°2013-SA-0120).

Anses, 2014 - Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à la présence d'ions perchlorate dans le lait infantile et dans l'eau destinée à la consommation humaine en France (saisines n°2011-SA-0208 et 2011-SA-0336).

EFSA, 2014 - Avis sur les risques pour la santé publique liés à la présence d'ions perchlorate dans les denrées alimentaires et en particulier dans les fruits et les légumes.

Greer, M.A., Goodman, G., Pleus, R.C., Greer S.E. (2002). Health effects assessment for perchlorate contamination: the dose response for inhibition of thyroidal radioiodine uptake in humans. *Environ Health Persp*, 110 (9), 927-937.

Haddow, J.E., Palomaki, G.E., Allan, W.C., Williams, J.R., Knight, G.J., Gagnon, J., O'Heir, C.E., Mitchell, M.L, Hermos, R.J., Waisbren, S.E., Faix, J.D., Klein, R.Z. (1999) Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child, *New Engl J Med*, 341 (8), 549-555.

Brève. Guide de gestion de l'impact environnemental et sanitaire en situation post-accidentelle

Short item. Guide to environmental and health effect management in post-accidental situations

Frédéric Bertrand (1) (frederic.bertrand@agriculture.gouv.fr), Xavier Strebelle (2)

(1) MAAF, Direction générale de l'alimentation, Bureau de la coordination en matière de contaminants chimiques et physiques, Paris, France
(2) MEDDE, Direction générale de la prévention des risques, Bureau de la prospective, de l'évaluation et des données, La Défense, France

Mots-clés: post-accidentel, environnement, industrie/Keywords: Post-accidental, Environment, Industry

La présence de contaminants chimiques dans la chaîne alimentaire peut être la conséquence d'activités industrielles qui rejettent des substances chimiques dans l'environnement, mais aussi de contaminations ponctuelles d'origine accidentelle. Dans le cas d'accidents industriels, l'impact sur l'environnement et par conséquent sur la chaîne alimentaire peut être fortement négatif.

Aussi, un cadre opérationnel de gestion des aspects post-accidentels dans les situations où l'origine de l'accident est une installation classée au titre de la protection de l'environnement, un transport de matières dangereuses ou une canalisation de transport a été défini via une circulaire interministérielle du 21 février 2012.

Cette circulaire introduit un guide de gestion⁽¹⁾ qui reprend l'esprit des dispositions Orsec⁽²⁾ et prévoit notamment la mise en place

d'une cellule post-accident, centre opérationnel sous l'égide du Préfet de département, qui coordonne l'action de l'État de la phase post-accidentelle jusqu'au retour à la normale. Cette cellule a pour objectif, d'une part d'évaluer, au niveau local, grâce à des échanges précoces d'informations entre les services (environnement, sécurité civile, agriculture, santé), les conséquences de l'accident sur l'environnement et la santé et, d'autre part, de gérer ces conséquences, notamment dans le domaine agricole.

Le guide de gestion définit en outre les modalités de mise en œuvre des premières actions de prélèvements, d'analyses et d'expertises et répertorie les ressources et appuis techniques à disposition des services.

Ainsi, ce guide permet, depuis 2012, une gestion facilitée sur le terrain des contaminations des productions agricoles via les retombées des émissions engendrées par les accidents technologiques (bouffées, explosion, incendie, etc.) et une anticipation des conséquences à long terme et des éventuels impacts supplémentaires dus à la gestion accidentelle (par exemple, liés aux eaux d'extinction d'incendie).

(1) Guide de gestion de l'impact environnemental et sanitaire en situation post-accidentelle – Cas des accidents d'origine technologique: méthode générale - http://www.developpement-durable.gouv.fr/IMG/pdf/12006_Guide-post-accident_Methode-generale_DEF_26-04-12_light.pdf.

(2) Organisation de la réponse de sécurité civile: système polyvalent de gestion de la crise organisant les secours et recensant les moyens publics et privés susceptibles d'être mis en œuvre en cas de catastrophe.

Brève. Comment la mise en commun des résultats d'analyse sanitaire permet d'exercer une vigilance nationale dans la filière céréalière ?

Short item. How does the pooling of analysis results support national vigilance in the grain sector?

Ludovic Chanut, (1) (l.chanut.irtac@wanadoo.fr), Diane Cuzzucoli, (2), Sandra Favret, (2)

(1) Irtac, Paris, France

(2) ENVA-Anses, Maisons-Alfort, France

Mots-clés: qualité sanitaire, autocontrôles, céréales/Keywords: Food safety, Self monitoring, Cereals

Mis en place et géré par l'Irtac⁽¹⁾ depuis 2000, le Plan de surveillance sanitaire des céréales (PSSC) permet aux opérateurs de la production, de la collecte, et de la première et seconde transformation de céréales de disposer d'une base de données élargie concernant les contaminants dans la filière céréalière (mycotoxines, produits phytosanitaires, éléments traces métalliques, etc.), aussi bien en alimentation humaine qu'animale.

Chaque opérateur peut ainsi affiner son analyse de risque et adapter son plan d'autocontrôles en fonction des résultats du PSSC.

Chaque année, une liste de contaminants prioritaires et à surveiller est établie par les experts réunis au sein de l'Irtac: ces listes sont basées sur la fréquence et les niveaux de contamination relevés et prennent également en compte le statut réglementaire du contaminant. Cette démarche collective permet de contribuer à la sécurité sanitaire des aliments et de ce fait de mettre en valeur les efforts de l'ensemble de la filière céréalière.

Le PSSC donne ainsi une meilleure visibilité sur la qualité des campagnes céréalières et permet d'évaluer l'évolution de la contamination par certaines substances au cours des années. Par ailleurs, il permet d'identifier des signaux faibles qui seraient beaucoup moins visibles sans cette mutualisation.

Les principaux résultats font l'objet d'une présentation annuelle à laquelle sont conviés les représentants des professionnels et des administrations concernées.

En outre, l'Irtac est partenaire de l'Anses dans le cadre du déploiement de la section sanitaire de l'Observatoire de l'alimentation, en transmettant les données issues du PSSC, mutualisées ensuite avec les données de surveillance publiques. Cette mise en commun de données permettra, à terme, d'objectiver le niveau sanitaire des aliments à différentes étapes de la chaîne et de caractériser les étapes clés pour la maîtrise sanitaire. De plus, en donnant une meilleure visibilité de la couverture et de la complémentarité des systèmes privés et publics de surveillance, ce dispositif facilitera l'identification d'étapes ou de couples jugés d'intérêt prioritaire actuellement peu ou non couverts par des plans de surveillance, et aidera ainsi à optimiser la vigilance nationale et la détection de l'émergence de nouveaux risques sur l'ensemble de la filière céréalière.

(1) Association loi 1901 créée en 1983, l'Irtac (Institut de recherches technologiques agroalimentaire des céréales) mène des actions collectives au sein de la filière céréalière.

Surveillance des expositions alimentaires aux résidus de pesticides: des indicateurs de risque pour le suivi et l'orientation des programmes nationaux de surveillance et du plan Ecophyto

Alexandre Nougadère (1) (alexandre.nougadere@anses.fr), Josselin Réty (1), Gaëlle Vial (2), Florence Gérard (3), Jean-Luc Volatier (1), Jean-Charles Leblanc (1), Mathilde Merlo (1)

(1) Anses, Direction de l'évaluation des risques, Maisons-Alfort, France

(2) Anses, Direction des produits réglementés, Maisons-Alfort, France

(3) Direction générale de l'alimentation, Sous-direction de la qualité et de la protection des végétaux, DRAAF/SRAL Pays de la Loire, Angers, France

Résumé

La surveillance nationale *a posteriori* des expositions alimentaires aux résidus de pesticides, pilotée par l'Anses, a pour objectif de caractériser et de hiérarchiser les risques pour les consommateurs. Elle permet d'identifier les substances actives (SA) et les denrées nécessitant un renforcement de la surveillance ou des mesures de gestion en complément de l'évaluation *a priori* conduite pour la délivrance des autorisations de mise sur le marché. La méthode d'évaluation des risques est basée sur quatre indicateurs de risque chroniques et aigus actualisés annuellement à partir des résultats des derniers plans de surveillance, des limites maximales de résidus (LMR) et de l'étude de consommation INCA 2. Elle intègre une échelle de priorités à six niveaux pour orienter les gestionnaires et les évaluateurs. En 2014, 443 SA (85 %) présentent des niveaux d'exposition inférieurs aux valeurs toxicologiques de référence (niveau 1). Pour 65 SA prioritaires (niveaux 2 à 5), l'Anses a recommandé une amélioration de la surveillance pour réduire l'incertitude. Pour les couples SA/denrée associés à un risque aigu (niveau 6), des contrôles renforcés ou un abaissement des LMR sont nécessaires. En complément, dans le cadre du suivi du plan Ecophyto, l'indicateur d'exposition alimentaire cumulé, calculé en 2009-2012, montre que les SA de post-récolte, et en particulier les insecticides de stockage des céréales, contribuent majoritairement à l'exposition alimentaire globale.

Mots-clés

Plans de surveillance, résidus de pesticides, exposition alimentaire, caractérisation des risques, indicateurs, population générale

Abstract

Monitoring of dietary exposures to pesticide residues: risk indicators for the monitoring and guidance of national monitoring programs and the Ecophyto action plan
The French system for reactive monitoring of dietary exposure to pesticide residues, coordinated by ANSES, aims to characterise and prioritise dietary risks to consumers. It identifies the active substances and commodities requiring increased monitoring or management measures, in order to complete the evaluation of plant protection products prior to authorisation. The risk assessment method is based on four chronic and acute indicators updated annually, based on the results of the latest monitoring plans, maximum residue levels (MRLs) and the INCA2 consumption survey. It includes a 6-level priority scale in order to guide risk managers and assessors. In 2014, 443 substances (85%) had exposure levels below the toxicological reference values (level 1). For 65 priority substances (levels 2 to 5), ANSES recommends improving monitoring programs in order to reduce uncertainty. For 21 pesticide/commodity combinations associated with an acute risk (level 6), enhanced controls or lowered MRLs are required in order to ensure consumer safety. In addition, as part of the French Ecophyto action plan, the cumulative dietary exposure indicator calculated in 2009-2012, showed that post-harvest substances, particularly grain storage insecticides, mainly contribute to overall dietary exposure.

Keywords

Monitoring programs, Pesticide residues, Dietary exposure, Risk characterization, Indicators, General population

Dans l'Union européenne, l'évaluation *a priori*, la mise sur le marché et la surveillance post-homologation (*a posteriori*) des produits phytopharmaceutiques et des résidus de pesticides dans les aliments sont harmonisées (règlement CE 396/2005; règlement CE 1107/2009). Ce cadre réglementaire permet aux organismes d'évaluation des risques et aux autorités de s'assurer que les teneurs résiduelles en substances actives (SA) mesurées dans les aliments ne présentent pas de risque pour les consommateurs (EFSA, 2014).

Le règlement CE 396/2005 concernant les limites maximales de résidus (LMR) de pesticides dans les denrées d'origine végétale et animale prévoit la réalisation d'un programme communautaire de surveillance coordonné (article 29) ainsi que de plans nationaux de surveillance (PS) fondés sur l'évaluation des risques (article 30). Ce règlement définit le terme de « résidus de pesticides » comme les reliquats, y compris les substances actives, les métabolites et/ou les produits issus de la dégradation ou de la réaction des substances actives utilisées actuellement ou par le passé dans les produits phytopharmaceutiques (tels que définis par la directive 91/414/CEE abrogée par le règlement CE 1107/2009), y compris notamment les résidus dont la présence peut être due à une utilisation des substances actives à des fins phytosanitaires (règlement 1107/2009), vétérinaires (règlement

CE 37/2010), ou en tant que biocides (directive CE 98/2008). En pratique, la majorité des résidus de pesticides recherchés dans le cadre des plans de surveillance sont des résidus de substances actives phytopharmaceutiques, pouvant également être des antiparasitaires vétérinaires et/ou des biocides.

Ces programmes de surveillance ont pour objectif d'une part de vérifier le respect de la réglementation, et d'autre part d'évaluer les risques pour les consommateurs. Les plans de surveillance et de contrôle nationaux réalisés au niveau de la commercialisation des denrées sont mis en œuvre par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) pour les fruits et légumes, les céréales et l'alimentation infantile, par la Direction générale de l'alimentation (DGAL) pour les denrées d'origine animale et par la Direction générale de la santé (DGS) pour l'eau destinée à la consommation humaine (directive 98/83/CE).

Au niveau de l'Union européenne, une synthèse et une évaluation *a posteriori* de l'exposition et des risques alimentaires est réalisée chaque année par l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA), à partir des résultats du programme coordonné transmis par chaque État membre. En complément, en France, une évaluation des risques

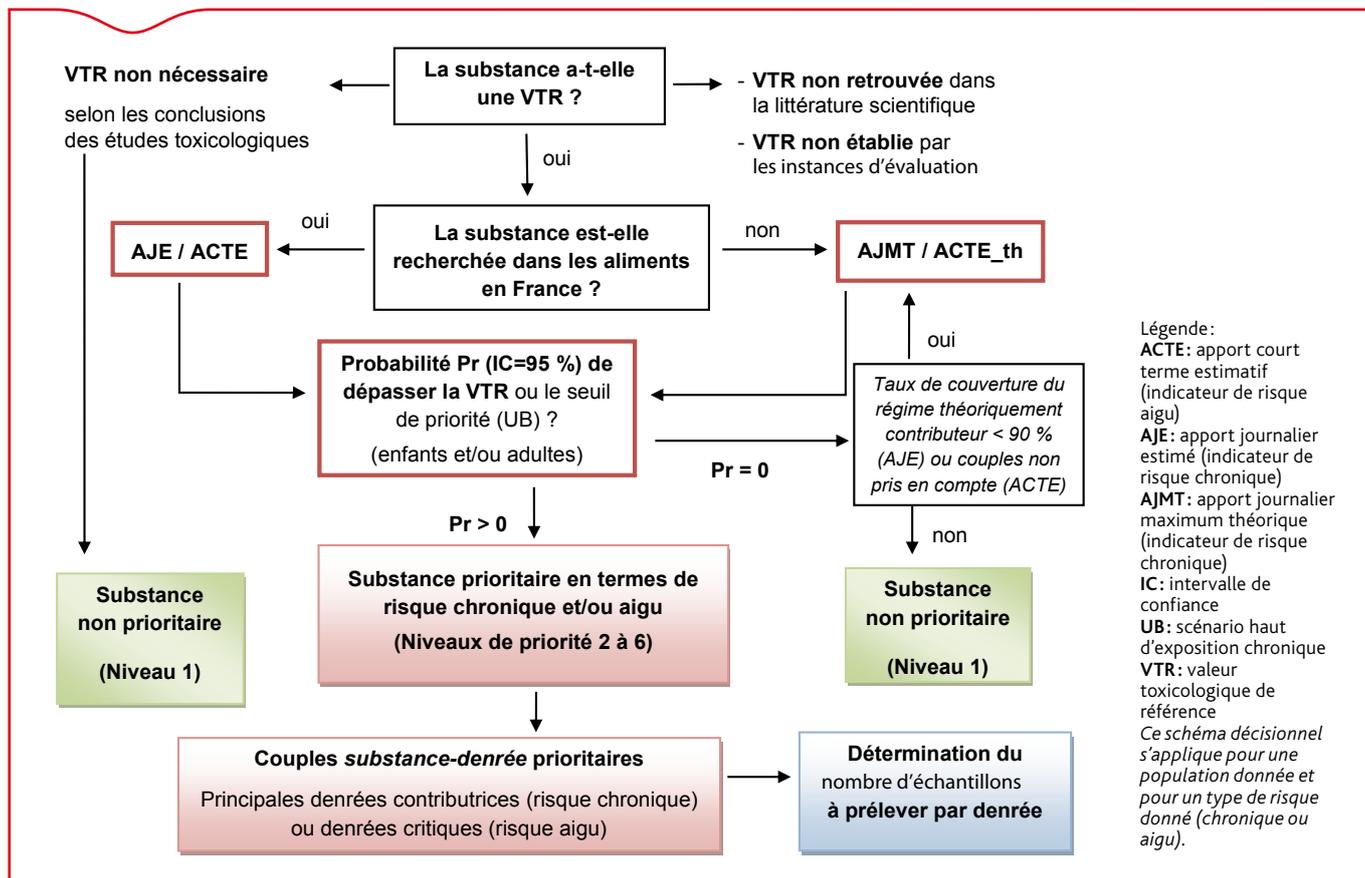


Figure 1. Méthode d'identification des couples *pesticide-dénrée* prioritaires dans le cadre de la surveillance des risques alimentaires (chroniques et aigus) (Anses, 2014)

a posteriori est conduite par l'Observatoire des résidus de pesticides (ORP) de la direction de l'évaluation des risques (DER) de l'Anses, en collaboration avec la direction des produits réglementés de l'Anses, à partir d'une méthode globale développée par l'ORP et basée sur des indicateurs de risque. Par rapport à la méthode de l'EFSA, cette évaluation présente l'avantage d'assurer une meilleure couverture du régime alimentaire et d'intégrer un spectre plus large de substances; elle est donc plus proche de la réalité des expositions des consommateurs français. Ces indicateurs sont actualisés et publiés régulièrement dans un avis de l'Anses et permettent de guider:

- d'une part les gestionnaires du risque dans le cadre de l'élaboration de leurs PS et de la mise en œuvre de mesures préventives et correctives,
- d'autre part les évaluateurs du risque dans l'orientation des travaux de recherche et d'expertise, notamment en métrologie, expologie et toxicologie.

Par ailleurs, pour le suivi du plan national d'actions Ecophyto piloté par le ministère de l'Agriculture et visant à réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques en France, un indicateur d'exposition alimentaire cumulée a été élaboré en 2013, afin d'apprécier dans le temps l'évolution de l'exposition globale des consommateurs. Les résultats de cet indicateur mis à jour par l'Anses sont publiés chaque année par le ministère de l'Agriculture (MAAF, 2014).

Deux volets sont abordés dans cet article:

- les résultats du dernier avis de l'Anses sur l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire et l'orientation des PS (Anses, 2014),
- les résultats 2009-2012 de l'indicateur d'exposition alimentaire Ecophyto (MAAF, 2014).

Méthode générale

Les données nécessaires au calcul sont recueillies et structurées chaque année par l'ORP à des fins de calcul d'exposition et de risque. Elles sont détaillées dans chaque avis (Anses, 2012, 2014).

Données de consommation et de contamination

La population étudiée est la population générale française métropolitaine âgée de plus de trois ans, dont les pratiques de consommation et les quantités consommées sont décrites dans l'étude individuelle et nationale INCA 2 réalisée de 2005 à 2007 auprès de 4079 personnes (Afssa, 2009; Dubuisson *et al.*, 2010; Lioret *et al.*, 2010). Les calculs portent sur les individus normo-évaluants, soit 1 719 adultes et 1 446 enfants de trois à dix-sept ans. Les 1 305 aliments décrits tels que consommés ont été décomposés en 181 dénrees brutes selon la nomenclature du règlement (CE) n°212/2013.

Les données de contamination des dénrees brutes sont les résultats des PS de la DGCCRF (2011), de la DGAL (2010) et de la DGS (2010-2011) détaillés dans le dernier avis de l'Anses (Anses, 2014). Dans le cadre d'Ecophyto, les résultats 2012 ont été utilisés. Ces données sont complétées par les LMR des règlements CE 396/2005 (tous résidus de pesticides) et 37/2010 (antiparasitaires vétérinaires).

Indicateurs de risque

À partir de l'estimation de l'exposition et de la caractérisation des risques, quatre indicateurs de risque sont calculés (Anses, 2014; Nougadère *et al.*, 2014). Pour l'exposition chronique, il s'agit de l'apport journalier estimé (AJE) et de l'apport journalier maximum théorique ajusté (AJMT). Pour l'exposition aiguë, de l'apport court terme estimé (ACTE) et de l'ACTE théorique (ACTA_th). L'AJE et l'ACTE sont calculés à partir des résultats des PS alors que l'AJMT et l'ACTE_th le sont à partir des LMR, en l'absence de résultats de PS ou lorsque le taux de couverture du régime est insuffisant (<90 %) (Figure 1). Standardisés au niveau international, ces indicateurs sont ajustés par l'Anses (WHO, 1997; Anses, 2014) et exprimés en pourcentage de la valeur toxicologique de référence (VTR) de la SA. Ils sont calculés pour chaque individu INCA 2 et pour plus de 500 SA recensées par l'ORP, en tenant compte du régime alimentaire total de chaque individu.

Gestion de la censure et couverture du régime alimentaire

Pour calculer l'AJE, les moyennes de contamination sont estimées entre deux bornes :

- une borne basse (LB) pour laquelle les résultats non quantifiés sont fixés à 0,
- une borne haute (UB) pour laquelle les résultats non quantifiés sont fixés à 0 si la SA n'a jamais été quantifiée dans la denrée et si elle n'y est pas attendue (LMR fixée par défaut). Sinon, ils sont fixés à la limite de quantification (LQ).

Sur cette base, deux AJE sont calculés : un AJE_LB et un AJE_UB. Le premier repose sur les contaminations réellement observées. Le second, plus conservateur, correspond à une approche plus protectrice pour les consommateurs nécessaire en évaluation des risques.

Afin d'estimer l'incertitude de l'évaluation, un niveau de couverture du régime potentiellement contributeur à l'exposition est associé au résultat obtenu et permet de calculer un seuil de priorité qui correspond à la VTR pondérée par le niveau de couverture (Anses, 2014).

Substances et couples substance/denrée prioritaires

La proportion d'individus dont l'exposition chronique et/ou aiguë dépasse la VTR est estimée. Les SA prioritaires en termes de surveillance sont celles dont la probabilité de dépasser la VTR ou le seuil de priorité n'est significativement pas nulle (IC=95 %). La moyenne et les percentiles les plus élevés d'exposition sont ensuite estimés pour les enfants (< 17 ans) et les adultes.

Les couples denrée/SA prioritaires en termes de surveillance sont ceux dont la contribution à l'AJE_UB est supérieure à 0,1 % de la dose journalière admissible (DJA) pour les 5 % d'individus les plus fortement exposés ou associés à un dépassement de la dose de référence aiguë (ARfD).

Les priorités identifiées précédemment par la DER sont complétées par celles de la DPR, à partir du modèle de prédiction du risque « PRIMo » (*Pesticide residue intake model*) basé sur les niveaux issus des essais « résidus » et les LMR, ainsi que sur les régimes alimentaires des États

membres. Il n'intègre pas les résultats des plans de surveillance, ni les données individuelles françaises de consommation alimentaire INCA 2 (EFSA, 2007; Anses, 2014).

Niveaux de priorité et orientation des plans de surveillance annuels

Afin de guider les gestionnaires et les évaluateurs du risque, une échelle de priorités a été élaborée pour hiérarchiser les SA (Anses, 2014; Nougadère *et al.*, 2014). Les niveaux de priorité (indices de risque) en termes d'évaluation ou de gestion du risque alimentaire et les critères de score sont décrits dans le **Tableau 1**. L'échelle inclut six niveaux. Les niveaux 2 à 6 concernent les SA identifiées précédemment comme prioritaires en termes de surveillance. Le niveau 2 correspond à un risque faible associé à une incertitude élevée, alors que le niveau 6 correspond à un risque chronique et/ou aigu confirmé et associé à un faible niveau d'incertitude. Le niveau 1 concerne les SA non prioritaires pour lesquelles les résultats des PS permettent d'écartier un dépassement de VTR.

Un niveau de priorité est attribué pour chaque SA pour le risque chronique. Un niveau de priorité par couple SA-denrée est attribué pour le risque aigu. Pour une SA donnée, le niveau de priorité global est le niveau maximal obtenu entre le niveau chronique et le niveau aigu.

Définition du plan d'échantillonnage

Pour chaque couple SA-denrée prioritaire, le nombre d'échantillons à prélever est déterminé en fonction des niveaux de contamination observés (Anses, 2014). L'effectif retenu pour chaque denrée correspond au nombre de prélèvements permettant de décrire avec une certaine précision les niveaux moyens de contamination associés à l'ensemble des SA prioritaires dans cette denrée. Les différences en termes d'effectifs obtenus reflètent la variabilité observée de contamination de ces couples SA/denrée.

Indicateur de suivi du plan Ecophyto

Le plan Ecophyto vise à réduire l'utilisation des produits phytopharmaceutiques en France. À ce titre, c'est l'AJE_LB (enfants)

Tableau 1. Niveaux de priorité en termes d'évaluation ou de gestion du risque (niveaux 2 à 6 pour les substances prioritaires pour la surveillance) (Anses, 2014)

Niveaux de priorité	Conclusions et recommandations en termes de gestion ou d'évaluation du risque	Indicateurs de risque pertinents et critères de score	
		Risque chronique	Risque aigu
6	Un risque est identifié (données suffisantes) Des actions de gestion sont nécessaires : (1) renforcement de la surveillance et des mesures préventives, (2) révision des LMR ou des usages autorisés pour les principales denrées contribuant à l'exposition chronique ou denrées critiques (risque aigu).	$Pr(AJE_LB > DJA) > 0$ (a) (b)	$Pr(ACTE > ARfD) > 0$ (a) (b)
5	Un risque ne peut pas être écarté (données insuffisantes) Réévaluation nécessaire pour confirmer le risque et les actions à engager (niveau 6) : besoin de réduire l'incertitude et d'affiner l'estimation par (1) une meilleure gestion des données censurées, (2) l'analyse de chaque aliment tel que consommé ou l'utilisation des facteurs de process (FP), puis (3) un abaissement des limites analytiques pour les principaux contributeurs.	$AJE_UB(p95) > DJA$ (b)	$Pr(ACTE > ARfD) > 0$ (b)
4	Un risque ne peut pas être écarté (données manquantes) Réévaluation nécessaire pour confirmer le risque et les actions à engager pour les pesticides déjà recherchés partiellement : nécessité d'améliorer le niveau de couverture de l'AJE en élargissant la surveillance à toutes les denrées potentiellement contributrices et/ou en ciblant mieux les denrées à analyser (par ex. : uniquement celles avec LMR spécifique)	$Pr(AJE_UB > \text{seuil de priorité}) > 0$ ou $AJMT \text{ moyen} > DJA$	$ACTE_th \text{ moyen} > ARfD$ (Evaluation <i>a posteriori</i>)
3	Les substances actuellement non recherchées devraient être intégrées au prochain plan de surveillance, en priorité dans les principales denrées contributrices aux expositions.	$AJMT(p95) > DJA$	$ACTE_th \text{ moyen} > ARfD$ (Evaluation <i>a priori</i> : plusieurs denrées)
2	Les substances actuellement non recherchées devraient être intégrées au prochain plan de surveillance, en priorité dans les principales denrées contributrices aux expositions.	$Pr(AJMT > DJA) > 0$	$ACTE_th \text{ moyen} > ARfD$ (Evaluation <i>a priori</i> : une seule denrée)
1	Aucune recommandation spécifique. Les programmes de surveillance actuels devraient être maintenus sans développements analytiques particuliers. En revanche, les méthodes mono-résidus mises en œuvre spécifiquement pour des substances classées au niveau 1 deviennent facultatives.	DJA non nécessaire ou $Pr(AJE_UB > DJA) = 0$ et $Pr(AJMT > DJA) = 0$	ARfD non nécessaire ou $Pr(ACTE > ARfD) = 0$ et $ACTE_th \text{ moyen} < ARfD$

(a) Critères supplémentaires pour les denrées analysées avec la peau non consommée (par ex. : bananes, avocats, agrumes...) : la présence du pesticide doit avoir été confirmée dans les aliments tels que consommés (jus, pulpe...) (Anses, 2011) ou le facteur de transformation si disponible (pulpe) doit être égal ou supérieur à 1 (BfR, 2011). Sinon, compte tenu de l'incertitude, le pesticide est classé au niveau de risque inférieur (niveau 5 : « données insuffisantes pour conclure »)

(b) Substances quantifiées au moins une fois dans les denrées brutes agricoles contributrices (risque chronique) ou critiques (risque aigu)
ACTE : apport court terme estimatif ; **ACTE_th :** ACTE théorique ; **AJE :** apport journalier estimé ; **AJMT :** apport journalier maximum théorique ; **IC :** intervalle de confiance ; **LB :** scénario bas (AJE_LB) ; **Pr :** probabilité (IC=95%) ; **UB :** scénario haut (AJE_UB)

qui a été retenu en 2013 comme indicateur d'exposition alimentaire aux résidus de produits phytopharmaceutiques pour le suivi du plan. Il est calculé en considérant d'une part le régime total (AJE « total ») et d'autre part uniquement les SA autorisées et les denrées végétales produites en France (AJE « national »). Cette approche permet d'estimer la contribution de la production nationale à la valeur de l'indice total. Il s'agit de l'AJE agrégé selon le principe de l'indice de danger (HI, *hazard index*): somme des quotients de danger (HQ, *hazard quotient*), c'est-à-dire des AJE (exposition sur DJA) de chaque SA détectée. La méthode d'agrégation a été construite par l'ORP, avec la contribution du groupe de travail « indicateurs de risque et d'impact » mis en place par la DGAL dans le cadre du plan. Les premiers résultats ont été publiés en 2013. Cet indicateur est actualisé chaque année par l'Anses et communiqué à la DGAL en charge de la publication des résultats conjointement aux autres indicateurs accompagnant le plan d'action (MAAF, 2014).

Quatre « niveaux d'agrégation » sont calculés (Tableau 2).

Pour une SA donnée (AJE 1 et 2), l'AJE est exprimé en pourcentage de la DJA. Pour plusieurs SA regroupées (AJE 3 et 4), l'AJE représente respectivement la somme des AJE 1 et des AJE 2. À ces niveaux d'agrégation 3 et 4, l'indice (indicateur sans unité) ne peut pas être interprété en termes de risque alimentaire. En revanche, les AJE 3 et 4 sont de bons indices de tendance d'exposition à l'ensemble des SA détectées dans les aliments.

Résultats

Mise à jour 2014 des indicateurs et des niveaux de risque

Au total, le nombre d'échantillons analysés varie peu d'une année à l'autre (près de 30 000 par an). Le nombre de SA recherchées est également stable (Anses, 2012, 2014). Parmi les 524 SA recherchées en 2010-2011, 226 étaient approuvées selon le règlement CE 1107/2009, 224 n'étaient plus autorisées, trois étaient toujours en cours d'évaluation (éthametsulfuron, métaflumizone et métobromuron) et 71 sont des métabolites ou autres SA considérées non pertinentes du point de vue toxicologique par les instances d'évaluation (Anses, 2014).

Les résultats d'analyse globaux présentent une forte stabilité entre 2010 et 2011:

- le taux de résultats d'analyse quantifiés était de 0,62 % en 2010 et de 0,59 % en 2011 (n=22 060),
- le taux d'échantillons avec résidu(s) quantifié(s) était de 39 % en 2010 et de 40 % en 2011 (n=12 330), et un tiers de ces échantillons quantifiés présentent plusieurs résidus par échantillon (n=4 062) ;
- le taux de SA quantifiées au moins une fois était de 54 % en 2010 comme en 2011 (n=282).

En 2014, l'AJE et l'ACTE ont été actualisés pour 524 SA à partir des résultats des PS 2011 (Anses, 2014). Ces indicateurs mettent en évidence des dépassements de VTR pour sept SA en exposition chronique⁽¹⁾ et pour dix-sept SA en exposition aiguë⁽²⁾, parmi 282 SA quantifiées. Au total, 85 denrées et eaux de boisson présentaient au moins un résidu quantifié.

(1) Diméthoate, dithiocarbamates, fipronil, imazalil, lindane (HCH-gamma), nicotine et carbofuran.

(2) Bifenthrine, bitertanol, carbaryl, carbendazime/thiophanate-méthyl, diméthoate, dithiocarbamates, endosulfan, folpel, imazalil, méthamidophos, méthidathion, méthomyl, nicotine, oxamyl, prochloraze, thiabendazole et thiaclopride.

Tableau 2. Niveaux d'agrégation de l'AJE

Niveaux	Signification	Description	Observations
AJE 1	AJE « détaillé » : couples substance/denrée	Niveaux permettant de conclure en termes de risque alimentaire (AJE exprimé en % de la DJA)	Niveaux calculés dans le cadre des avis annuels de l'Anses/ORP. Publiés sur www.anses.fr .
AJE 2	AJE « substance » : une substance/toutes denrées		
AJE 3	AJE « denrée » : plusieurs substances un groupe de denrées (ex. : fruits, légumes, céréales...)	Niveaux ne permettant pas de conclure en termes de risque alimentaire car ils considèrent simultanément des substances dont les DJA et modes d'action toxicologique peuvent être différents. (AJE agrégé: indice sans unité)	Niveaux calculés dans le cadre d'Ecophyto. Publiés sur www.agriculture.gouv.fr
AJE 4	AJE « global ou annuel » : plusieurs substances/toutes denrées		

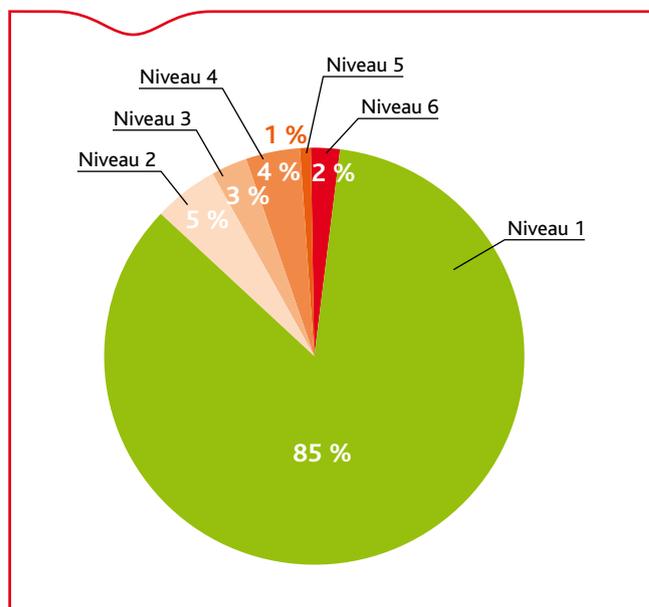


Figure 2. Répartition des pesticides évalués selon leur niveau de priorité global

À partir des valeurs des indicateurs et des incertitudes associées, des niveaux de priorité ont été affectés à chaque SA. La grande majorité (85 %) des SA sont classées en niveau 1 car les niveaux d'exposition sont inférieurs aux VTR quels que soient l'indicateur et le scénario considéré (Figure 2). Pour 76 autres SA (15 %) prioritaires (niveaux 2 à 6), l'Anses recommande:

- une pression de surveillance renforcée suivie d'une réévaluation pour 59 SA dont les niveaux d'exposition théoriques excèdent les VTR (niveaux 2 à 4). Ces SA sont actuellement non recherchées (n=26) ou leur recherche devrait être élargie à d'autres denrées potentiellement contributrices afin d'accroître la couverture du régime (n=33),
- une meilleure estimation des teneurs dans l'aliment tel que consommé afin de réduire l'incertitude pour six SA fréquemment quantifiées et dont les VTR sont dépassées (niveau 5),
- des mesures de gestion spécifiques et des contrôles renforcés pour onze SA de niveau de risque le plus élevé (niveau 6) en lien avec les couples SA/denrée suivants, associés à un risque aigu: bifenthrine (laitues), carbendazime (oranges, pommes), diméthoate (aubergines, cerises, laitues, raisins), dithiocarbamates (laitues, poires, raisins), endosulfan (concombres), folpel (poires), imazalil (agrumes, poires), méthomyl (concombres), oxamyl (concombres, haricots verts, tomates), thiabendazole (pommes, oranges) et thiaclopride (poires). Pour ces couples, deux types de mesures de gestion sont recommandés:
 - cas où des dépassements de LMR sont à l'origine du risque aigu identifié. Une intensification des contrôles est recommandée au niveau de la production agricole et de la distribution. Le cas échéant, l'identification de l'origine des non-conformités et la mise en place de mesures de gestion correctives ou suspensives sont recommandées, conformément aux règlements CE 396/2005 et 1107/2009. Concernant les denrées issues de pays tiers (la majorité des dépassements de LMR), un renforcement du contrôle à l'importation est recommandé. Au niveau national,

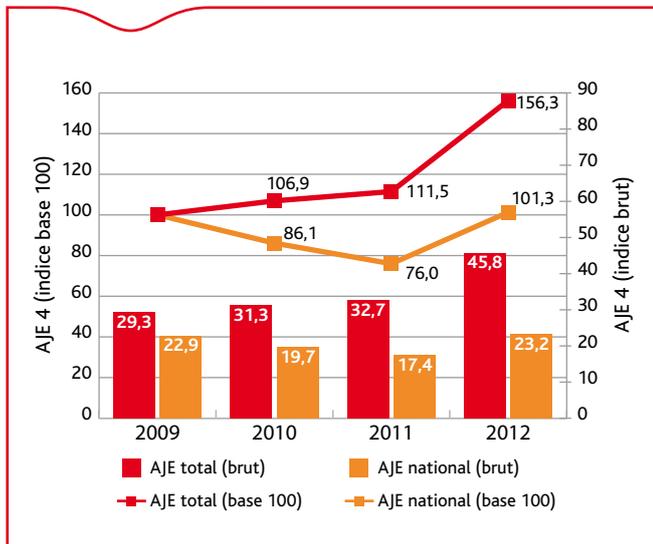


Figure 3. Évolution de l'AJE global (AJE 4) toutes origines et production nationale*

* De 2009 à 2012, respectivement 124, 137, 163 et 172 SA recherchées ont un AJE 2 national.

un encadrement renforcé de la production agricole pourrait être proposé pour certains fruits et légumes,

- cas où des teneurs quantifiées inférieures aux LMR sont à l'origine du risque aigu identifié. Il est recommandé une révision des LMR conformément au règlement CE 396/2005 ou dans le cadre des évaluations collectives européennes.

Évolution 2009-2012 de l'AJE dans le cadre d'Ecophyto

En 2012, l'AJE national (production nationale/SA autorisées) a augmenté de 33 % par rapport à 2011, retrouvant son niveau de 2009, année de référence pour le calcul de cet indicateur. Cette augmentation est liée notamment à une augmentation globale de l'AJE total de 40 % en 2012 par rapport à 2011. Cette augmentation doit être relativisée au regard de la sensibilité volontairement privilégiée pour cet indicateur.

L'écart entre l'AJE total et l'AJE national s'explique par la non prise en compte, en production nationale, des agrumes frais et des fruits tropicaux (excepté les bananes des DOM) et des SA non autorisées en France pouvant être quantifiées dans des denrées importées ou en raison de contaminations croisées (transport, stockage...). Les SA non autorisées et les polluants organiques persistants issus d'usages historiques sont pris en compte uniquement dans le calcul de l'AJE total.

Concernant l'AJE national, la contribution des céréales à la valeur globale de l'indice s'est accrue en 2012 par rapport aux années antérieures, alors que celle des fruits a diminué (MAAF, 2014). En termes de SA et de denrées contributrices, les mêmes tendances ont été observées en 2012 :

- les céréales (blé et riz principalement) contribuent majoritairement à l'exposition alimentaire globale (68 % de l'AJE global en 2012 contre 50 % en 2011), notamment en raison des insecticides de stockage des grains récoltés,
- les fruits, cultivés en France métropolitaine (pommes, raisins, cerises...) ou en zone tropicale (bananes des DOM notamment), contribuent ensemble à près de 16 % de l'AJE global (30 % en 2011) pour différents insecticides/acaricides ou fongicides,
- les légumes contribuent à près de 15 % de l'AJE global (20 % en 2011), et notamment les pommes de terre (près de 5 %) avec des SA anti-germinatives de post-récolte (chlorprophame),
- deux insecticides organophosphorés des grains de céréales récoltés et des locaux de stockage contribuent à près de 65 % de l'AJE global (pyrimiphos-méthyl et dans une moindre mesure chlorpyrifos-

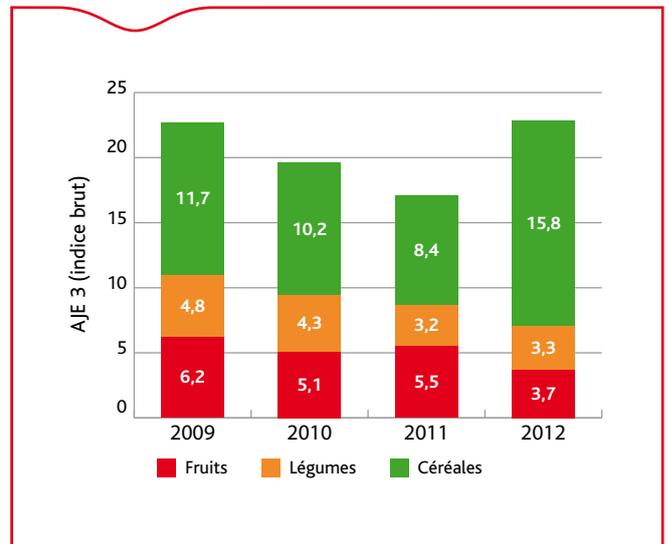


Figure 4. Évolution de l'AJE 3 (groupes de denrées) en production nationale

méthyl). Dix substances⁽³⁾ (correspondant à une vingtaine de couples substance/denrée) contribuent à 90 % de l'AJE global ;

- aucune DJA n'est dépassée pour l'AJE 2 atteignant au maximum 13 % de la DJA en 2012.

Conclusions

La surveillance nationale *a posteriori* des expositions alimentaires aux résidus de pesticides, développée et pilotée par l'Anses en partenariat avec les directions ministérielles concernées, a pour objectif principal de caractériser et de hiérarchiser les risques alimentaires liés à l'ensemble des résidus de SA phytopharmaceutiques auxquels la population générale française peut être exposée *via* son régime alimentaire global.

Il permet d'orienter les autorités en charge de la gestion du risque, dans la définition de leurs plans de surveillance et la mise en œuvre de mesures correctives adaptées à la population générale française. La méthode globale est en amélioration constante afin de prendre en compte un nombre croissant de SA (par ex. : antiparasitaires vétérinaires) et d'aliments, ainsi que les derniers développements méthodologiques pour l'évaluation du risque cumulé.

L'indicateur d'exposition alimentaire cumulé AJE, calculé pour le suivi du plan Ecophyto de 2009 à 2012, a mis en évidence que les principales SA quantifiées et contribuant à la valeur de l'AJE national sont des SA autorisées pour les traitements post-récolte des céréales et des pommes de terre. Cependant, pour ces SA, les niveaux d'exposition estimés (AJE 2) n'excèdent pas la DJA.

Analysé à un niveau plus fin, l'indicateur permet de mettre en évidence les principaux couples SA/denrée prioritaires et les problématiques agronomiques associées, en vue d'éclairer la réflexion prospective et de faire évoluer les pratiques agricoles.

Remerciements

Les auteurs remercient l'ensemble des collègues ayant contribué à la réalisation de cette étude et en particulier l'unité ORP de la Direction de l'évaluation des risques de l'Anses. Les auteurs remercient également la DGCCRF, la DGAL et la DGS pour leur collaboration. Ils remercient également les membres du groupe de travail « Indicateurs de risque et d'impact – sous-groupe Alimentation » du plan Ecophyto: Nathalie Verjux (Arvalis – Institut du végétal), Marie Luccioni (DGAL), Claudine Joly (France nature environnement) et Philippe Michel (Union des industries de la protection des plantes).

(3) Pyrimiphos-méthyl, diméthoate, dithiocarbamates, chlorpyrifos-méthyl, chlorprophame, imazalil, chlorpyrifos-éthyl, boscalide, thiabendazole et oxyfluorène (classement par ordre de contributions décroissantes).

Références bibliographiques

- Afssa, 2009. Étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires (INCA2) (2006-2007).
- Anses, 2011. Étude de l'alimentation totale française 2 (EAT2). Tome 2: Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques, Juin 2011. p. 362.
- Anses, 2012. Avis de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif au programme 2013 de surveillance des résidus de pesticides dans les aliments. Réponse à la saisine 2012-SA-0178., p. 26 + annexes.
- Anses, 2014. Avis de l'Anses relatif à l'actualisation des indicateurs de risque alimentaire relatifs aux résidus de pesticides dans les aliments. Réponse à la saisine n°2013-SA-0138., p. 26 + annexes.
- BfR, 2011. BfR compilation of processing factors for pesticide residues, BfR Opinion (database updated: 20/01/2011).
- Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.L. and Lafay, L., 2010. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: Results from the INCA surveys. *British Journal of Nutrition* 103, 1035-1048.
- EFSA, 2007. Reasoned opinion on the potential chronic and acute risk to consumers' health arising from the proposed temporary EU MRLs according to Regulation EC No 396/2005 on Maximum Residue Levels of Pesticides in Food and Feed of Plant and Animal Origin. *EFSA Journal*, 106.
- EFSA, 2014. The 2011 European Union Report on Pesticide Residues in Food. *EFSA Journal* 2014, p. 511.
- Lioret, S., Dubuisson, C., Dufour, A., Touvier, M., Calamassi-Tran, G., Maire, B., Volatier J.L. and Lafay, L., 2010. Trends in food intake in French children from 1999 to 2007: Results from the INCA (étude Individuelle Nationale des Consommations Alimentaires) dietary surveys. *British Journal of Nutrition* 103, 585-601.
- MAAF, 2014. Note de suivi 2014. Tendances du recours aux produits phytosanitaires de 2008 à 2013. Note de suivi du plan Ecophyto. Ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt (MAF/DGAL), p. 22
- Nougadère, A., Merlo, M., Héraud, F., Réty, J., Truchot, E., Vial, G., Cravedi, J.P. and Leblanc, J.C., 2014. How dietary risk assessment can guide risk management and food monitoring programmes: The approach and results of the French Observatory on Pesticide Residues (ANSES/ORP). *Food Control* 41, 32-48.
- Règlement (CE) n°396/2005 du Parlement européen et du Conseil du 23 février 2005, concernant les limites maximales applicables aux résidus de pesticides présents dans ou sur les denrées alimentaires et les aliments pour animaux d'origine végétale et animale et modifiant la directive 91/414/CEE du Conseil (JOCE du 16/03/2005) et règlements modifiant ses annexes II, III et IV relatives aux limites maximales applicables aux résidus des produits figurant à son annexe I (JO L 70 du 16.3.2005, p. 1).
- Règlement (CE) n°1107/2009 du Parlement européen et du Conseil du 21 octobre 2009 concernant la mise sur le marché des produits phytopharmaceutiques et abrogeant les directives 79/117/CEE et 91/414/CEE du Conseil
- Règlement (UE) n°37/2010 de la Commission du 22 décembre 2009 relatif aux substances pharmacologiquement actives et à leur classification en ce qui concerne les limites maximales de résidus dans les aliments d'origine animale (JO L 15 du 20.01.2010, 72 p.)
- WHO, 1997. Guidelines for predicting dietary intake of pesticides residues (revised). Prepared by the Global Environment Monitoring System - Food Contamination Monitoring and Assessment Programme (GEMS/Food) in collaboration with the Codex Committee on Pesticide Residues., WHO Publications. WHO/FSF/FOS/97.7, p. 31.

Les études de l'alimentation totale en France

Karine Vin (1) (karine.vin@anses.fr), Véronique Sirot (1), Marion Hulin (2), Jean Luc Volatier (3)

(1) Anses, Direction de l'évaluation des risques, Unité Méthodologie et études relatives aux risques physico-chimiques, Maisons-Alfort, France

(2) Anses, Direction de l'évaluation des risques, Observatoire des résidus de pesticides, Maisons-Alfort, France

(3) Anses, Direction de l'évaluation des risques, Maisons-Alfort, France

Résumé

Les études de l'alimentation totale (EAT) font partie de l'arsenal des outils de surveillance utilisés en France pour contribuer à la sécurité sanitaire des aliments vis-à-vis des risques chimiques. Basées sur le principe d'une analyse des aliments tels que consommés, elles permettent d'estimer l'exposition chronique de la population à différentes substances chimiques en combinant les valeurs de contaminations aux données de consommation individuelles, mais aussi de suivre les apports en nutriments pour ces mêmes populations. Deux EAT ont déjà été menées en France respectivement pour la population des adultes et pour celle des enfants de plus de trois ans. Ces études ont permis d'identifier des substances pour lesquelles un risque de dépassement des valeurs toxicologiques de référence ne peut être écarté, au moins pour certains groupes de consommateurs. Une EAT dédiée aux enfants de moins de trois ans est actuellement en cours. Un projet d'harmonisation des EAT au niveau européen se déroule sur la période 2012-2016, afin de promouvoir ce type d'étude en Europe et favoriser les comparaisons des résultats entre pays.

Mots-clés

Exposition, contaminants, nutriments, risque, alimentation

Abstract

Total Diet Studies in France

Total Diet Studies (TDSs) are part of the surveillance system used in France to ensure the safety of food with regard to chemical risks. Based on an analysis of foods prepared as consumed, they estimate chronic population exposure to various chemicals by combining contamination data with individual consumption data, while also monitoring nutrient intake. Two TDSs, one targeting adults and another for children over three years of age, have already been conducted in France. These studies have identified several substances for which the risk of exceeding the health-based guidance value cannot be excluded, at least for some population groups. A TDS dedicated to children under three years of age is currently in progress. A European research project for harmonizing the TDS at EU level is also under way (2012-2016) and aims to promote this type of study in Europe as well as the inter-country comparison of results.

Keywords

Exposure, Contaminants, Nutrients, Risk, Food

L'estimation de la contamination des aliments et de leur composition en nutriments constitue un outil majeur de la sécurité sanitaire. Elle permet en effet de caractériser les expositions par voie alimentaire à des agents microbiologiques, chimiques ou physiques et de quantifier les apports nutritionnels. Ces expositions permettent d'évaluer les risques pour la population et ainsi d'éclairer les prises de décision en matière de gestion des risques.

En France, la surveillance de la teneur des aliments en différentes substances chimiques est régulièrement assurée dans un cadre réglementaire par des plans de contrôle et de plans de surveillance, pilotés par les ministères compétents. Or, ces programmes de surveillance se focalisent la plupart du temps sur une partie seulement du régime alimentaire et utilisent des limites analytiques adaptées aux contrôles réglementaires, qui peuvent être distinctes de celles utilisées pour l'évaluation du risque. À titre d'exemple, les limites analytiques ciblées pour les pesticides dans les plans de surveillance sont principalement les LMR (limites maximales de résidus); dans les Études de l'alimentation totale (EAT) les limites visées peuvent être dix fois inférieures.

Afin de compléter et d'affiner les données d'exposition, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) et l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) recommandent la mise en œuvre d'EAT.

L'objectif de cet article est d'une part, de présenter les principes fondamentaux des EAT, et de faire un point sur les EAT déjà menées en France en présentant à la fois leur méthodologie et les principaux résultats obtenus et, d'autre part, de voir en perspective quels sont les travaux d'harmonisation sont actuellement menés au niveau européen. Il illustre également en quoi les études de type EAT contribuent à une action de vigilance vis-à-vis des contaminants des aliments.

Les principes fondamentaux des EAT

Les EAT reposent sur trois principes fondamentaux (EFSA, 2011a). Tout d'abord l'échantillonnage doit être représentatif du régime alimentaire de la population afin de pouvoir établir l'exposition à une

substance donnée la plus juste possible. En général, on recommande que plus de 90 % du régime soient couverts par l'échantillonnage. Le second principe des EAT est le regroupement d'échantillons avant analyse (étape de « pooling ») lors de laquelle des produits ayant des niveaux de contamination attendus proches sont regroupés afin de réduire le nombre d'échantillons à analyser (par exemple les oranges, pamplemousses, citrons, etc. peuvent être regroupés dans un échantillon « agrumes » dès lors que l'on considère que leur contamination sera proche pour les substances recherchées), afin de limiter le coût d'une telle étude. Cette étape doit être particulièrement réfléchie car un regroupement d'aliments trop disparates pourrait engendrer une dilution importante des substances à analyser, réduisant alors la probabilité de détection analytique. Enfin, les aliments doivent être analysés tels que consommés, ce qui signifie qu'ils doivent être lavés, épluchés et préparés (découpage, cuisson...) comme le ferait le consommateur. Cette étape permet de prendre en compte l'apparition ou la disparition de certaines substances au cours des processus de préparation culinaire.

Les EAT françaises

Une première étude de l'alimentation totale (EAT 1) a été réalisée entre 2000 et 2004 par l'Institut national de recherche agronomique (Inra), en collaboration avec l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa). Elle a permis de dresser un bilan de l'exposition des adultes et des enfants aux contaminants inorganiques (aluminium, antimoine, arsenic, cadmium, mercure et plomb) et minéraux, ainsi qu'aux mycotoxines.

En 2006, l'Agence s'est autosaisie afin de réaliser une seconde étude (EAT 2), incluant 445 substances contre 30 lors de la première EAT. Cette seconde étude couvrait l'ensemble du territoire métropolitain, à travers huit inter-régions, tandis que trois grandes villes avaient été étudiées dans l'EAT 1. Elle s'est appuyée sur les données de l'enquête individuelle et nationale sur les consommations alimentaires (Inca 2) réalisée en 2006-2007, représentative des consommations alimentaires

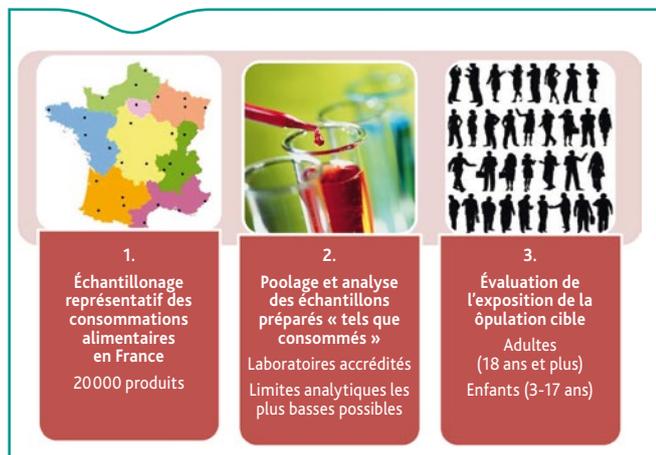


Figure 1. Les grandes étapes de l'EAT2 en France

en France (Dubuisson *et al.*, 2010). *In fine*, cette étude a conduit à la collecte de plus de 20000 produits alimentaires représentant 212 types d'aliments. Les calculs d'exposition ont été réalisés selon les recommandations internationales de l'OMS, en combinant les données de consommation de l'étude INCA 2 avec les résultats analytiques (Figure 1). Ces résultats ont été comparés à des valeurs de référence afin de caractériser les risques pour différentes populations (Anses, 2011a, b).

Pour quelques substances, il a été conclu que le risque pour certains contaminants ne pouvait être exclu pour certains groupes particuliers de consommateurs au sein de la population générale (en particulier les enfants). C'est particulièrement le cas du plomb, du cadmium, de l'arsenic inorganique, de l'aluminium, du méthylmercure (éléments traces), des dioxines et PCB (contaminants environnementaux), du déoxynivalénol et ses dérivés (mycotoxines), de l'acrylamide (substance formée lors de la cuisson), des sulfites (additifs alimentaires), et du diméthoate (résidu de pesticide).

L'EAT 2 a permis d'évaluer les apports en nutriments et les expositions aux contaminants de la population générale, c'est-à-dire des enfants de plus de trois ans et des adultes de 18 à 79 ans, mais pas de groupes de population particuliers comme les enfants de moins de trois ans ou les femmes enceintes. Les enfants de moins de trois ans font l'objet d'une EAT dédiée lancée par l'Anses en 2010 et qui s'appuie sur une étude de consommation spécifique (SFAE, 2005). Cette étude inclut l'échantillonnage des produits de consommation exclusivement destinés aux jeunes enfants comme les laits infantiles ou les petits pots pour bébés, et intègre les modes de préparation utilisés pour le réchauffage des aliments (prise en compte du contenant, du mode de chauffage...) (Hulin *et al.*, 2014). En effet, la population infantile étant considérée comme particulièrement sensible, du fait de son développement inachevé, l'obtention de données d'exposition chez les moins de trois ans est cruciale. Ainsi, plus de 400 substances seront analysées, dont notamment des substances présentes plus particulièrement dans les produits infantiles (par ex. le furane) ou des substances supposées ou connues comme perturbateurs endocriniens (bisphénol A, phtalates, alkylphénols notamment). Les résultats sont actuellement en cours d'exploitation.

Perspective : harmonisation des EAT au niveau européen

Au niveau européen, plusieurs pays réalisent régulièrement des EAT. Cependant, les méthodologies utilisées diffèrent, ce qui complique la comparaison des résultats d'un pays à l'autre et donc la prise de décision réglementaire au niveau européen. Par ailleurs, certains États membres ne disposent pas encore d'EAT. Suite à ce constat, l'Union européenne a décidé de financer un projet de recherche visant à définir, tester et promouvoir au niveau européen une méthodologie commune permettant de réaliser des études d'exposition à différents

contaminants alimentaires. La réalisation de ce projet nommé « TDS Exposure » a été confiée à l'Anses et à un consortium de 26 partenaires répartis dans dix-neuf pays européens. Ce projet a démarré en février 2012 et s'est achevé fin janvier 2015.

Dans le cadre de ce projet, les méthodes utilisées pour la définition des catégories de contaminants ciblées par les EAT, l'échantillonnage des aliments étudiés et la modélisation de l'exposition vont être évalués et harmonisés. Une base de données sera créée, regroupant les données d'EAT existantes en Europe et des études pilote seront mises en œuvre dans cinq pays ne disposant pas à l'heure actuelle d'étude de l'alimentation totale ou disposant déjà d'une étude mais souhaitant voir évoluer leur méthodologie : Allemagne, Finlande, Islande, Portugal et République tchèque (site internet : tds-exposure.eu).

Conclusion

Les EAT permettent de mieux évaluer et donc de mieux gérer les risques liés à la présence de contaminants chimiques dans notre alimentation. Elles offrent pour un coût « limité » (dans la mesure où tous les produits ne sont pas analysés individuellement) une vision plus représentative de l'exposition alimentaire réelle de la population à divers contaminants que les plans de surveillance, dont l'objectif est avant tout de veiller au respect de la réglementation et qui ne prennent en considération que certains aliments, individuellement et de surcroît non préparés à la consommation. Elles peuvent également permettre de suivre l'évolution des expositions d'une population dans le temps, ou d'identifier l'émergence de certaines substances dans le régime alimentaire, présentant un intérêt en termes de santé publique (lorsque ces substances jugées non préoccupantes auparavant le deviennent du fait d'une exposition en forte hausse par exemple). Elles permettent aussi d'identifier les aliments qui contribuent le plus aux apports et aux expositions, et l'évolution des consommations et leur impact sur le niveau de risque. Elles constituent à ce titre un outil de premier ordre pour optimiser la gestion des risques chimiques d'origine alimentaire et d'appréhender l'efficacité des moyens de maîtrise mis en œuvre.

Références bibliographiques

- Anses 2011a. Étude de l'Alimentation Française 2 (EAT2) - Tome 1 : Contaminants inorganiques, minéraux, polluants organiques persistants, mycotoxines, phyto-estrogènes. In Rapport d'expertise, scientifique, Maisons-Alfort, Anses Ed, 305 pp.
- Anses 2011b. Étude de l'Alimentation Française 2 (EAT2) - Tome 2 : Résidus de pesticides, additifs, acrylamide, hydrocarbures aromatiques polycycliques. In Rapport d'expertise, scientifique, Maisons-Alfort, Anses Ed, 405 pp.
- Dubuisson, C., Lioret, S., Touvier, M., Dufour, A., Calamassi-Tran, G., Volatier, J.L., Lafay, L., 2010. Trends in food and nutritional intakes of French adults from 1999 to 2007: results from the INCA surveys. *Brit J Nutr* 103, 1035-1048.
- EFSA 2011a. Joint Guidance of EFSA, FAO and WHO - Towards a harmonised Total Diet Study approach: a guidance document, 66 pp.
- Hulin, M., Bemrah, N., Nougadere, A., Volatier, J.L., Sirot, V., Leblanc, J.C., 2014. Assessment of infant exposure to food chemicals: the French Total Diet Study design. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 31, 1226-1239.

La plateforme IdentyPath de l'Anses: une plateforme nationale d'identification et de typage des agents pathogènes basée sur le développement des approches de séquençage NGS, de qPCR haut et moyen débits

Fach Patrick (patrick.fach@anses.fr), Delannoy Sabine, Woudstra Cédric

Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Plateforme nationale IdentyPath, Maisons-Alfort, France

Résumé

La création de la plateforme IdentyPath a été décidée par l'Anses en 2010 pour répondre aux enjeux de santé publique que constituent les maladies infectieuses dans une démarche de transversalité et de mutualisation des compétences. La plateforme IdentyPath met à disposition de nouvelles méthodologies de séquençage haut débit, de PCR haut et moyen débits pour la détection qualitative et quantitative, l'identification, le typage et la caractérisation moléculaire des micro-organismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires ou impliqués en santé animale ou végétale. Elle a pour objectif d'apporter un appui aux laboratoires de l'Agence, afin de constituer une plateforme de référence dans l'analyse moléculaire haut et moyen débit.

Mots-clés

NGS, qPCR, haut-débit, agents pathogènes, plate-forme, IdentyPath

Abstract

ANSES's IdentyPath: a French platform for the identification and typing of pathogens based on Next Generation Sequencing and high- and mid-throughput qPCR

ANSES decided to create the IdentyPath platform in 2010 to meet the public health challenges raised by infectious diseases using a cross-cutting approach based on skill sharing. The IdentyPath platform offers new high-throughput sequencing methodologies, high- and mid-throughput PCR for qualitative and quantitative detection, identification, typing and molecular characterization of pathogenic microorganisms involved in foodborne disease outbreaks, or in animal and plant health issues. The main objective of IdentyPath is to provide support to the ANSES laboratories in order to develop a reference platform for high- and mid-throughput molecular analysis.

Keywords

NGS, qPCR, High throughput, Pathogens, Platform, IdentyPath

IdentyPath: une plateforme au cœur des missions de l'Anses

La création de la plateforme IdentyPath en 2010 a permis de répondre à la nécessité de développement d'outils de diagnostic et caractérisation rapides, sensibles et de large spectre pour la réalisation des missions de recherche, de référence, d'expertise et de surveillance des laboratoires de l'Agence. La plateforme contribue, à travers l'ensemble des projets dans lesquels elle est partie prenante, à relever les enjeux de santé publique dans le domaine des maladies infectieuses en couvrant les secteurs de la santé animale, de la sécurité alimentaire et de la santé du végétal. Elle a pour vocation de:

- soutenir l'effort de recherche de l'ensemble des laboratoires de l'Anses par la mise en œuvre d'outils méthodologiques puissants et innovants,
- contribuer à l'amélioration des dispositifs de surveillance, de veille, d'alerte et faciliter l'identification de dangers émergents au travers d'outils analytiques à large spectre,
- faire rayonner les activités de l'Agence par un positionnement novateur en recherche aux niveaux communautaire et international,
- appuyer la création de réseaux fédérateurs, d'échanges et de partenariats.

IdentyPath: une plateforme composée d'outils performants et innovants

Pour répondre à ces enjeux diagnostiques et analytiques, la plateforme IdentyPath dispose d'une palette d'outils s'appuyant sur des techniques de pointe en biologie moléculaire, et diversifiés de façon à s'adapter aux besoins spécifiques des différents projets. Ainsi, les technologies de PCR temps réel (qPCR) disponibles actuellement sont les suivantes: le GeneDisc® Cyclo de Pall, le LightCycler® 1536

de Roche® Diagnostics et le BioMark HD™ de Fluidigm. Ces appareils permettent d'effectuer des tests de PCR en temps réel sous différents formats permettant l'analyse de 36 à 18 432 réactions de qPCR en un seul essai. Les instruments disponibles offrent donc une gamme de puissance analytique considérable couvrant un grand nombre de besoins analytiques, allant du bas débit au très haut débit, de type exploratoire ou régulier pour la surveillance par exemple. C'est ainsi que les systèmes BioMark HD™ et LightCycler® 1536 sont des appareils de haut et très haut débits permettant la détection simultanée de plusieurs centaines de gènes, le génotypage par la détection de SNP (Single Nucleotide Polymorphism) et la quantification absolue par Digital PCR alors que le GeneDisc Cyclo est adapté à la détection ou l'expression d'un nombre moins important de gènes (Figure 1). Pour chacun de ces appareillages, il existe une flexibilité importante dans la conception des supports permettant d'adapter la combinaison entre le nombre de cibles ou marqueurs (gènes) à détecter en fonction du nombre d'échantillons à tester.

Les enjeux et perspectives de développement de la plateforme IdentyPath s'inscrivent dans le cadre du développement des nouvelles générations de séquençage haut débit (Next Generation Sequencing, NGS) et des outils de bio-informatique associés indispensables à l'analyse des génomes. Ainsi, l'acquisition récente d'un séquenceur de paillasse à haut débit, le MiSeq® d'Illumina, vient compléter l'offre de qPCR haut et moyen débits déjà disponible sur la plateforme. Ce séquenceur de paillasse permettra de séquencer rapidement de petits génomes bactériens ou viraux, en cas de crise par exemple, ou encore de séquencer des produits d'amplification générés par exemple à partir du BioMark HD™. Il se prêterait moins au séquençage de masse qui peut être nécessaire dans le cadre des activités de surveillance. L'objectif est de poursuivre le développement de cette plateforme scientifique et technologique autour de ces méthodologies modernes qui peuvent être utilisées pour le typage et l'identification d'agents pathogènes (bactéries, virus et parasites) responsables de toxi-infections alimentaires, de maladies animales épizootiques ou de zoonoses.

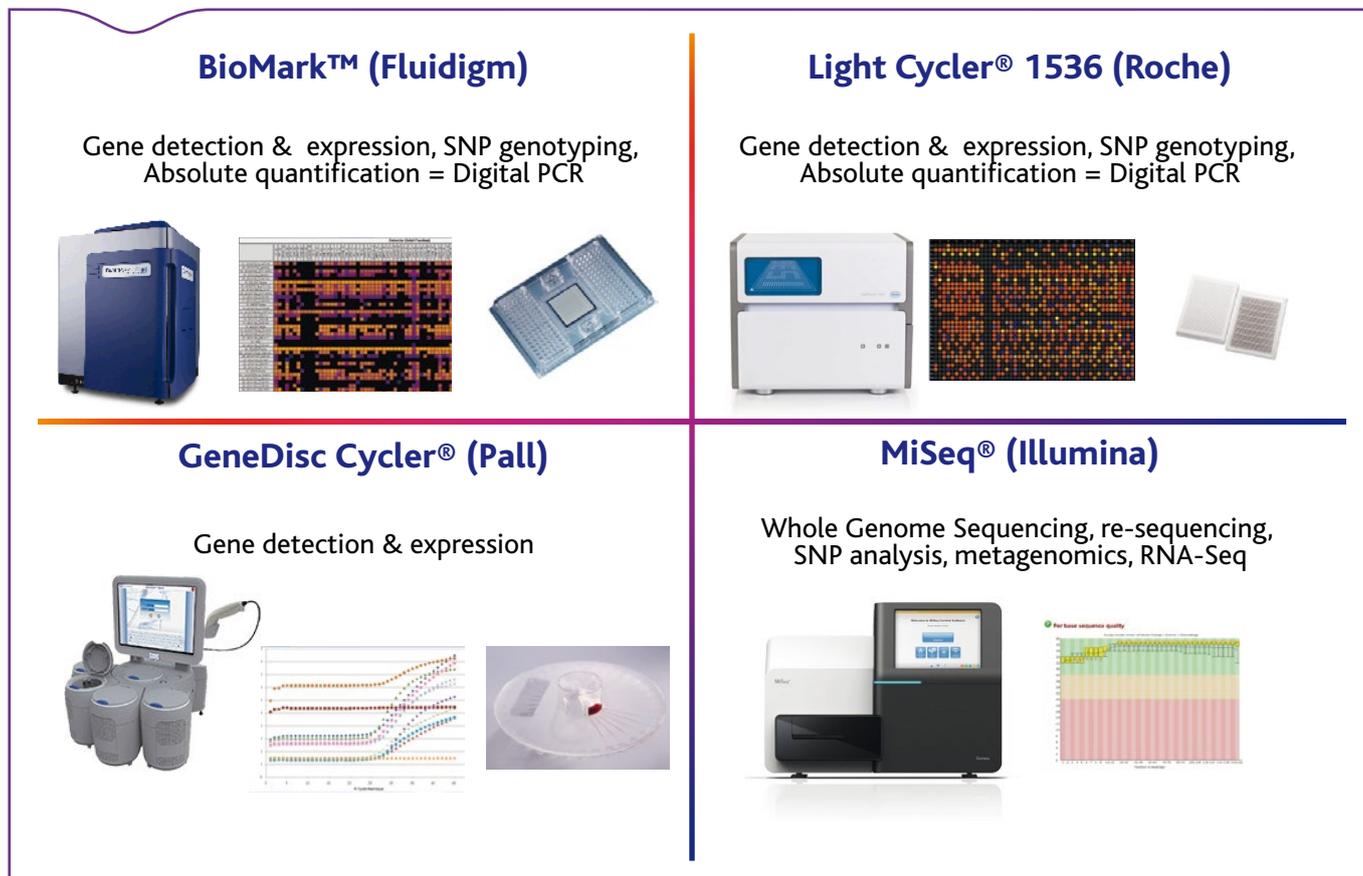


Figure 1. Les différents outils et leurs applications sur la plateforme IdentityPath

IdentityPath: une plateforme nationale pour la vigilance vis-à-vis des contaminants microbiens et des maladies infectieuses

Dans sa vocation nationale, la plateforme a pour missions de :

- réaliser une veille technologique concernant les approches innovantes pour la détection, la quantification, l'identification et la caractérisation complète et rapide des agents infectieux,
- fournir un appui scientifique et technique aux équipes porteuses de projet des laboratoires de l'Anses pour mettre au point et valider de nouvelles méthodes de détection et de typage plus performantes,
- fournir aux laboratoires de l'Anses un accès à des technologies haut débit sous la forme de collaborations.

L'objectif est de doter les laboratoires de l'Anses en charge d'activités de recherche, de surveillance, de référence ou d'expertise sur divers agents pathogènes, d'une structure capable d'apprécier avec précision l'évolution et l'émergence de souches à fort potentiel pathogène et/ou épidémique pour l'Homme, l'animal, ou les végétaux. Ceci afin de répondre rapidement et efficacement aux sollicitations des autorités sanitaires françaises et européennes en cas d'épizootie ou d'épidémie comme ce fut le cas lors de l'épidémie à *E. coli* O104:H4 en 2011.

De plus, elle mène des travaux de recherche s'attachant plus spécifiquement aux points suivants :

1. Améliorer le diagnostic botulique

- En identifiant de nouveaux marqueurs génétiques pertinents (typage génotypique) permettant de caractériser les souches de *Clostridium botulinum* tant en santé humaine qu'animale.
- En construisant les outils analytiques de la surveillance de ces agents pathogènes notamment en appui du LNR botulisme aviaire de l'Anses, pour l'investigation d'épisodes toxiques alimentaires et en soutien des dispositifs de surveillance des agents de la menace (bioterrorisme).

- En développant et en automatisant l'analyse génomique *in silico* des souches de *C. botulinum* responsables du botulisme chez l'Homme et l'animal notamment en explorant les loci CRISPRs ou les gènes associés aux antigènes flagellaires.

2. Développer des outils d'appréciation moléculaire des risques liés aux *E. coli* productrices de Shiga-toxines (STEC ou VTEC) pathogènes pour l'Homme

- En explorant les nouvelles approches de séquençage de génomes et d'analyse bio-informatique des données de séquençage pour sélectionner les marqueurs génétiques d'intérêt diagnostique en santé publique (ilots de pathogénicité, facteurs d'adhésion, effecteurs de types III, etc.). La plateforme a la capacité actuellement de rechercher plus de 200 marqueurs génétiques permettant de caractériser les différents pathotypes de *E. coli*. Elle développe par ailleurs une base de données sur les séquences CRISPR associées aux *E. coli* pathogènes responsable des colites hémorragiques et du syndrome hémolytique et urémique (SHU).
- En concevant les outils qPCR haut débit utiles en épidémiologie moléculaire et contribuer à inscrire l'Anses au cœur du dispositif français d'épidémiologie des souches de STEC. La plateforme développe en particulier un vaste projet de séquençage des gènes associés à la biosynthèse des antigènes somatiques et flagellaire de *E. coli* afin de fournir une offre complète de sérotypage moléculaire des souches de *E. coli*.

IdentityPath: enjeux et perspectives de développement

La plateforme IdentityPath cherchera à mettre en place, en collaboration avec divers laboratoires européens, les conditions de 'séquençage direct' des agents microbiens dans des matrices complexes (échantillons d'environnement, aliments, prélèvements cliniques). Cette approche de type métagénomique repose sur le principe de 'séquençage *in-situ*', permet de donner une vue exhaustive de la contamination

d'un échantillon sans aucun *a priori* concernant la contamination de l'échantillon. L'intérêt de cette approche de séquençage direct est d'essayer de combiner à la fois détection, caractérisation et typage des agents directement dans l'échantillon sans qu'il soit nécessaire de les isoler. À terme, elle pourrait permettre d'identifier de nouveaux génotypes d'agents pathogènes non cultivables par les méthodes conventionnelles. Ce type d'approche en métagénomique peut, par exemple, être utilisé lors de 'challenge tests' afin d'étudier l'évolution de la flore totale d'un aliment au cours d'un processus de vieillissement ou en fonction de différentes conditions (temps, température) de stockage. C'est aussi, sur le principe, la possibilité de mettre en évidence dans un échantillon biologique de nouveaux microorganismes non cultivables (par exemple les virus) ou des bactéries stressées difficilement revivifiables avec les techniques classiques de bactériologie (milieux de culture). Cette approche, lorsqu'elle pourra être mise en place en routine, semble donc prometteuse et apportera une avancée

considérable en termes de vigilance et détection d'émergences. Il convient désormais de construire des référentiels moléculaires pour évaluer l'approche métagénomique; la qPCR haut débit semble être la solution de choix pour constituer ce référentiel. Un consortium est en passe de se constituer dans le cadre de l'appel à projet H2020 et l'apport de la plateforme dans cette perspective concerne le développement de la 'qPCR haut débit' qui peut être l'outil de choix pour valider en quelque sorte l'approche métagénomique vis-à-vis d'un standard de référence. En effet, les données obtenues par 'séquençage *in-situ*' mériteront dans un premier temps d'être confirmées, les pipelines d'analyse informatique pour l'analyse en métagénomique restent encore à construire et à être évalués. Comme toute nouvelle méthode cette approche nécessite d'être comparée à une méthode de référence. La qPCR haut débit reconnue depuis plusieurs années pour sa spécificité et sensibilité constituera ainsi une méthode de choix pour évaluer/valider l'approche métagénomique.

Brève. Détection statistique d'événements inhabituels à partir d'un système de surveillance *Short item. Statistical detection of unusual events from a surveillance system*

Yann Le Strat (y.lestrat@invs.sante.fr)

Institut de veille sanitaire, Saint-Maurice, France

Mots-clés: événements inhabituels, détection, surveillance/Keywords: Unusual events, Detection, Surveillance

Un des objectifs de la surveillance épidémiologique est la détection de phénomènes inhabituels à des fins d'alerte sanitaire. Nous nous plaçons dans le cadre d'une surveillance continue, spécifique ou non, constituée d'un ensemble de déclarants (médecins, biologistes, vétérinaires, etc.) rapportant des événements de santé au système de surveillance. Pour simplifier, nous utiliserons le terme « cas » pour désigner ces événements de santé (infections, décès, etc.). Un événement inhabituel est l'observation d'un nombre de cas rapportés au système de surveillance, significativement plus élevé que le nombre de cas attendu. Cette définition est très proche de la définition classique d'une épidémie. Elle englobe des cas liés épidémiologiquement, mais aussi des cas sporadiques n'ayant pas de lien entre eux. La distribution des cas dans le temps et l'espace définissent trois types de clusters: les clusters temporels, spatiaux et spatio-temporels. Un cluster temporel est un intervalle de temps dans lequel le nombre de cas est anormalement élevé – ces cas étant dispersés géographiquement (par ex. une épidémie nationale de salmonellose). Un cluster spatial est une zone géographique dans laquelle le nombre de cas est anormalement élevé, l'occurrence des cas s'étalant dans le temps (sur plusieurs mois, voire même plusieurs années – c'est le cas de certains cancers par exemple). Enfin, un cluster spatio-temporel est un intervalle de temps et une zone géographique dans lesquels le nombre de cas est anormalement élevé – comme les toxi-infections alimentaires collectives par exemple. La mise en évidence le plus précocement possible de ces clusters permet, en cas de besoin, de mettre en œuvre des investigations et des mesures de contrôle (par ex. le retrait du marché d'un produit contaminé) pour limiter l'ampleur d'un phénomène épidémique. Devant l'augmentation du nombre de données à analyser et l'augmentation de la fréquence des analyses, la détection précoce s'appuie sur des méthodes statistiques produisant des signaux statistiques. Ces signaux rejoignent d'autres signaux épidémiologiques qui aident l'épidémiologiste à enclencher ou non des investigations.

Méthodes statistiques de détection

Nous distinguons les méthodes de détection purement temporelles des méthodes de détection spatiales ou spatio-temporelles.

Détection temporelle

La majorité des méthodes de détection temporelle repose d'abord sur l'estimation du nombre attendu de cas, puis sur un test statistique permettant de déterminer si le nombre de cas rapportés est significativement supérieur à ce nombre attendu.

L'estimation du nombre attendu est basée sur la prédiction d'un modèle, le plus souvent un modèle de régression, développé à partir des nombres de cas rapportés dans le passé. Les tendances, saisonnalités et surdispersions, si elles existent, doivent être prises en compte pour réaliser des estimations fiables du nombre attendu et de son intervalle de prédiction. Des régressions de Poisson, de quasi-Poisson ou binomiale négative peuvent être envisagées (Enki *et al.* 2013).

Le seuil épidémique est défini par la borne supérieure de l'intervalle de prédiction du nombre attendu. Si le nombre de cas rapportés est supérieur à cette borne supérieure, on peut statistiquement affirmer l'existence d'un cluster temporel. La valeur du seuil est estimée chaque fois que la méthode de détection est exécutée (le plus souvent chaque semaine ou chaque jour).

De nombreuses méthodes ont été développées depuis les années 1990 (Farrington *et al.* 2004; Unkel *et al.* 2012). Elles font maintenant partie des outils indispensables à une surveillance de qualité intégrant une détection précoce et automatisée d'événements inhabituels (Hulth *et al.* 2010). Le package surveillance dans le logiciel R propose de nombreuses méthodes de détection (Höhle 2007). Le choix d'une méthode statistique est souvent difficile en l'absence d'étude comparative. Une solution consiste à utiliser en parallèle plusieurs méthodes. En cas d'événement inhabituel, l'analyse de l'épidémiologiste sera ainsi facilitée si plusieurs méthodes produisent en même temps des alarmes.

Détection spatiale

Les méthodes de détection spatiales prennent en compte les coordonnées géographiques des cas. Cela signifie qu'il faut disposer du lieu de survenue ou d'exposition de chaque cas. De nombreuses méthodes ont été développées pour tester une tendance à l'agrégation de cas d'un événement de santé (Goria *et al.* 2012). L'une des plus utilisées est le balayage spatial. Son objectif est la surveillance d'une zone géographique afin d'identifier des zones pour lesquelles une incidence plus élevée d'une maladie est observée, dans un intervalle de temps défini, sans hypothèses supplémentaires *a priori*.

Les méthodes de balayage spatial appliquent des fenêtres (le souvent circulaires) sur la zone d'étude considérée et dénombrent les cas et les individus à risque à l'intérieur et à l'extérieur de chaque fenêtre. Différentes méthodes existent, se distinguant entre autres par la construction de la fenêtre qu'elles utilisent. Parmi les méthodes de détection des agrégats, la *statistique de scan spatiale* est devenue l'une des plus communément utilisées (Kulldorff 1997).

Détection spatio-temporelle

La détection spatio-temporelle est une généralisation de la détection spatiale. L'analyse spatio-temporelle ajoute aux deux dimensions spatiales, une troisième dimension représentant le temps. On ne balaie plus une zone géographique par un cercle mais par un cylindre, la hauteur de celui-ci représentant le temps. L'intérêt de la détection spatio-temporelle par rapport à la détection spatiale est de prendre en compte le temps de survenue des cas. L'analyse spatio-temporelle est donc généralement plus intéressante que la détection purement spatiale.

Le logiciel libre Satscan propose des méthodes temporelles, spatiales et spatio-temporelles (<http://www.satscan.org/>). Il est utilisé par de nombreuses équipes à travers le monde dans des domaines très variés de la surveillance.

Discussion

L'analyse d'un nombre croissant de données de surveillance, à un rythme journalier ou hebdomadaire, nécessite l'utilisation de méthodes automatisées de détection précoce. Plusieurs pays européens disposent de ces outils pouvant être utilisés en routine

pour la surveillance spécifique ou non-spécifique, chez l'Homme ou chez l'animal. Les défis des prochaines années pour les pays disposant de systèmes de surveillance, seront de deux ordres. D'une part il s'agira d'insérer au cœur de l'analyse des données de surveillance, des modalités de détection temporelles et spatio-temporelles à différents niveaux géographiques (national, régional, départemental) pour un ensemble de maladies et affections. D'autre part, il conviendra d'améliorer les performances des méthodes (en termes de sensibilité et de spécificité), en prenant en compte les caractéristiques propres aux systèmes de surveillance, notamment des délais de déclaration lorsqu'ils existent et sont non négligeables. Les progrès informatiques et statistiques devront ainsi permettre d'améliorer l'identification des événements de santé, aussi bien en termes de réactivité que de sensibilité et spécificité.

Références bibliographiques

- Enki, D.G., Noufaily, A., Garthwaite, P.H., Andrews, N.J., Charlett, A., Lane, C., *et al.*, 2013. Automated biosurveillance data from England and Wales, 1991-2011. *Emerg Infect Dis.* 19(1),35-42.
- Farrington, P., Andrews, N. Outbreak detection: Application to infectious disease surveillance. In: Brookmeyer R, Stroup D, editors. *Monitoring the health of populations.* Oxford University Press; 2004. 203-31.
- Goria, S., Le Strat, Y., 2012. Analyse statistique spatiale des données de surveillance. In: John Libey, editor. *Epidémiologie de terrain - Méthodes et applications.* 437-49.
- Höhle, M., 2007. Surveillance: An R package for the surveillance of infectious diseases. *Comput Stat.* 22, 571-82.
- Hulth A, Andrews N, Ethelberg S, Dreesman J, Faensen D, van PW, *et al.*, 2010. Practical usage of computer-supported outbreak detection in five European countries. *Euro Surveill.* 15(36).
- Kulldorff, M., 1997. A spatial scan statistic. *Commun Stat Theory Methods.* 26(6), 1481-96.
- Unkel, S., Farrington, C., Garthwaite, P., 2012. Statistical methods for the prospective detection of infectious disease outbreaks: a review. *J R Stat Ser A Stat Soc.* 175(1), 49-82.

Attribution de source des zoonoses alimentaires : quantifier la contribution de sources multiples aux infections humaines

Julie David (julie.david@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, Unité Épidémiologie et bien-être du porc, Ploufragan, France

Résumé

Les méthodes d'attribution de source sont des outils de santé publique transversaux permettant de quantifier la contribution de différentes sources aux infections d'origine alimentaire. Ces méthodes s'appuient sur des données de surveillance intégrant l'ensemble de la chaîne alimentaire de la fourche à la fourchette, et se déclinent en quatre familles méthodologiques qui répondent à des enjeux de santé publique différents et offrent des images complémentaires de la contribution des sources aux infections. Certaines traitent ainsi plutôt les cas sporadiques et d'autres, les cas épidémiques et les attribuent soit au point de réservoir, soit au point d'exposition. Le choix d'une méthode se fait selon la question de santé publique traitée, les caractéristiques de l'agent pathogène étudié et les données disponibles. Outil « One health » par excellence, l'attribution de source est étudiée et utilisée pour guider les politiques de santé publique en Europe, aux États-Unis, au Canada et en Nouvelle-Zélande. En France, elle a fait l'objet de plusieurs publications méthodologiques ciblées sur les salmonelles.

Mots-clés

Attribution de source, santé publique, zoonoses alimentaires, analyse de risque, One health

Abstract

Source attribution of foodborne zoonoses: quantifying the contribution of several sources to the human burden
Source attribution approaches are cross-functional public health tools that enable quantification of the relative contribution of several sources to the burden of foodborne zoonoses. Supported by farm-to-fork integrated surveillance data, they can be classified into four methodological groups. These groups address different public health issues and provide complementary views of the contribution of different sources to the burden. The different source attribution methods will focus on either sporadic or outbreak-related cases, and will assign them to either the reservoir point or the exposure point. The choice of an approach will depend on the public health issue to be addressed, the characteristics of the pathogen studied and the data available. Source attribution, the ultimate "One Health" tool, is studied and used to provide guidance for public health policies in Europe, the United States, Canada and New Zealand. In France, several source attribution methodological papers targeting Salmonella have been published to date.

Keywords

Source attribution, Public health, Foodborne zoonoses, Risk assessment, One Health

L'attribution de source consiste à évaluer la contribution relative de différentes sources à l'impact global d'une maladie. En clair, on cherche à savoir pour une zoonose alimentaire, la proportion de cas imputables au poulet, aux bovins, au porc, etc.

Prenons le cas des salmonelloses en France. L'impact sur la santé humaine (nombre de cas) est estimé sur la base des chiffres publiés par le Centre national de référence et l'Institut de veille sanitaire. Les réservoirs de l'agent pathogène et les voies de contamination sont certes connues et surveillées pour les principales, mais qu'en est-il de la contribution respective de ces sources aux infections humaines ? Peut-on répondre à la question de l'impact relatif des mesures prises simultanément dans différentes filières de productions animales sur la santé humaine ? Est-ce la diminution de la prévalence chez les volailles ou chez les porcs qui a fait diminuer le plus efficacement les cas humains ?

Plusieurs approches traitent la question des sources des agents pathogènes ubiquitaires. Les méthodes de « source tracking » permettent d'identifier des sources de contamination, mais pas de quantifier leur contribution. L'analyse quantitative de risque microbiologique (qMRA) permet de quantifier le nombre de cas pouvant résulter de la contamination d'une source, mais pas de plusieurs simultanément. Les méthodes épidémiologiques classiques permettent d'investiguer l'origine d'une épidémie, ou d'identifier les facteurs de risque (expositions) pour un groupe de cas particulier, mais pas forcément de couvrir l'ensemble des sources à l'échelon national. L'attribution de source complète cet arsenal par des outils transversaux (développés ci-après) qui permettent de quantifier simultanément la contribution d'un ensemble de sources potentielles aux cas humains. Les résultats d'attribution de source, exprimés sous la forme d'un nombre ou d'une proportion de cas attribués par source, ou sous la forme d'un classement relatif des sources selon l'importance de leur contribution, permettent ainsi de répondre aux questions précédemment évoquées (Figure 1).

Attribution de source et surveillance

De par sa transversalité, l'attribution de source requiert une quantité non négligeable de données et implique une étroite collaboration de différents acteurs de la surveillance des agents pathogènes : santé publique, secteurs vétérinaire, agro-alimentaire et environnemental. De la qualité des données collectées (représentativité, exhaustivité, nombre de sources incluses) dépendra la qualité des résultats d'attribution. Selon la méthode utilisée, tout ou partie des données suivantes sera nécessaire :

- données sur les cas humains : système d'enregistrement des cas (sporadique/épidémique, expositions, voyages récents, type du ou des isolats microbiens),
- données sur la contamination des sources potentielles : réservoir (par ex. élevage)/véhicule (par ex. viande), source concernée, prévalence/fréquence des différents types microbiens,
- exposition de la population : intensité d'exposition à chaque source (quantités consommées, fréquences de consommation ou d'exposition),
- typage des isolats : système de typage discriminant, harmonisé, standardisé et systématiquement appliqué aux isolats issus de cas humains comme de sources potentielles.

Les études européennes d'attribution de source s'appuient généralement sur des données de surveillance nationales, surveillance soutenue par la réglementation européenne en matière de zoonoses et d'hygiène des produits. Les équipes nord-américaines spécialisées en attribution (IFSAC (Interagency Food Safety Analytics Collaboration) aux États-Unis et FoodNet Canada au Canada) utilisent des systèmes de surveillance reposant sur des sites sentinelles. Par exemple, FoodNet Canada dispose de trois sites sentinelles en Ontario, en Alberta et en Colombie-Britannique, dans lesquels sont déployés quatre volets de

recueil de données: enregistrement des cas humains, surveillance des élevages, surveillance de la contamination des viandes au détail et surveillance des eaux de surface. Des études ponctuelles permettent d'ajouter au besoin des informations concernant d'autres sources de contamination potentielles. Ce dispositif couvre bactéries, parasites et virus et permet de disposer pour une population et son territoire, de l'ensemble des données nécessaires pour réaliser les études d'attribution de source. En Nouvelle-Zélande enfin, données nationales et données de sites sentinelles sont utilisées.

En France, le projet d'attribution de source des salmonelloses humaines mené entre 2005 et 2009 (collaboration Anses, Inserm, Institut Pasteur, InVS, DGAL) (David, 2009) a démontré la richesse des systèmes de surveillance existants et la complémentarité des données issues de réseaux événementiels et issues de surveillance active pour une démarche d'attribution de source. Ces travaux ont également souligné l'importance d'inclure l'ensemble des sources potentielles au-delà des filières considérées comme majoritairement contributrices et usuellement surveillées, *i.e.* les productions avicoles (poulets de chair, poules pondeuses et dindes) et porcines (Figure 1).

Méthodologie

Différentes approches d'attribution ont été développées (Tableau 1).

- Les approches sur base microbiologique (par ex. approche par typage microbiologique, évaluation comparative de l'exposition, assymetric island model, index de similarité):
 - par comparaison des isolats issus de cas humains et de sources, soit en considérant des regroupements par type, soit en considérant la similarité génétique entre ces isolats,
 - approches construites à partir du qMRA pour comparer les doses exposantes issues de plusieurs voies de contamination.
- Approches les plus abouties et les plus puissantes, elles sont aussi les plus gourmandes en données. Deux études méthodologiques françaises portant sur l'approche par typage microbiologique ont été publiées en 2013 (David *et al.*, 2013a; David *et al.*, 2013b).
- Les approches épidémiologiques: classification de résultats d'investigation de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC)

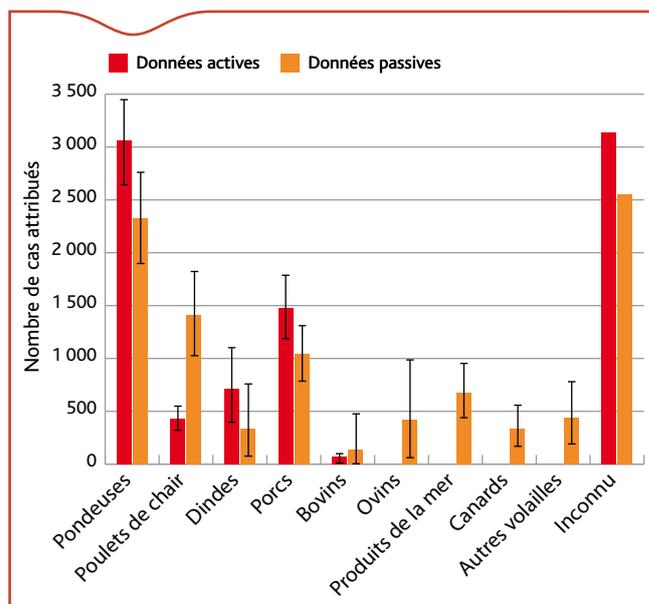


Figure 1. Attribution des cas humains de salmonelloses en France en 2005 sur la base de données de surveillance de la contamination des sources issues soit du réseau *Salmonella* (données de surveillance événementielle), soit de la surveillance nationale et européenne (surveillance active), modèle bayésien d'attribution par typage microbiologique (David, 2009)

par catégorie d'aliments, méta-analyses d'enquêtes cas témoins et d'études de cohortes comprenant un résultat exprimé sous forme de fraction attribuable.

- Les études d'intervention: l'analyse d'interventions visant une ou plusieurs sources de l'agent pathogène permet d'évaluer la contribution relative de cette ou de ces sources (noter ici l'étude réalisée par l'InVS en 2007, (Poirier *et al.*, 2008)).
- L'élicitation d'experts: permet de travailler sur des agents pathogènes pour lesquels peu de données existent en passant par l'analyse statistique de questionnaires administrés à un panel d'experts.

Tableau 1. Approches d'attribution de source

Méthode	Cas sporadiques (S) vs groupés (G)	Réservoirs (R) vs véhicules (V)	Données nécessaires	Défis	Exemple de question de santé publique
Typage microbiologique	S	R ou V	Cas et informations épidémiologiques Contamination des sources Typage des isolats systématisé et harmonisé Consommation des différentes sources	Méthode de typage discriminante Système de typage généralisable et harmonisable Produits importés Couvrir l'ensemble des sources potentiellement significatives	Quelles espèces animales devraient être incluses pour maximiser l'impact de mesures de contrôle en élevage
Evaluation comparative d'exposition	S	V	Contamination des sources Caractéristiques microbiologiques de l'agent pathogène Données d'exposition	Nombreuses données nécessaires sur l'agent pathogène	Quelles sont les principales voies d'exposition pour un agent pathogène
Cas témoins (ou cohortes ou cas-cas) et méta-analyse de ces études	S	V	Cas Informations épidémiologiques Information sur les expositions récentes des cas et des témoins	Expositions fréquentes Représentativité de l'étude/population ciblée Fraction attribuable Disponibilité de données adaptées à une utilisation en méta-analyse	Quelles sont les pratiques qu'une campagne d'information devrait cibler
Résumés de TIAC	G	V	Résultats d'investigation de TIAC Système de catégorisation des denrées	TIAC diffuses ou couvrant plusieurs unités administratives Disponibilité de données concernant la nature de l'agent pathogène	Renforcer le contrôle des préparations à risque en restauration
Intervention	S et G	R ou V	Données temporelles et/ou géographiques (avant/après et/ou ici/ailleurs) sur les cas et la contamination des sources	Système de surveillance stable sur le long terme, y compris pour la période pré-intervention	Quel est l'impact relatif sur les infections humaines d'une intervention ciblant une filière
Elicitation d'experts	S et/ou G	R ou V	Opinion d'experts (réponses à un questionnaire)	Composition du panel d'experts	Toute question et tout agent pathogène

Les approches les plus en pointe actuellement sont les approches sur base microbiologique. Elles font appel à différents types de modélisation: bayésienne, dérive génétique, stochastique. Ces approches nécessitent une surveillance intensive des sources potentielles et un système de typage harmonisé et déployé à grande échelle. Les récents développements en recherche se font dans le sens de la valorisation de systèmes de typage de plus en plus complexes (CGF et MLST issus de séquençage de génome complet) et de la combinaison de méthodes pour affiner les estimations (Mughini Gras *et al.*, 2012).

Le choix d'une méthode d'attribution se fait principalement sur trois critères:

- objectif de santé publique poursuivi: souhaite-t-on connaître la répartition par source des cas sporadiques ou épidémiques, veut-on intervenir en amont au niveau du réservoir, ou au point d'exposition (voie de contamination, véhicule), par ex. élevage de volailles vs hygiène en cuisine ?
- caractéristiques de l'agent pathogène: dispose-t-on de méthodes de typage discriminantes? Les types obtenus sont-ils répartis de façon hétérogène entre les sources? L'agent pathogène cause-t-il plutôt des cas sporadiques ou des TIAC ?
- disponibilité des données: elle détermine la faisabilité des différentes approches selon l'éventail de sources surveillées, l'harmonisation et le systématisme du typage, l'enregistrement des expositions, l'investigation des sources de TIAC, etc.

Les différentes approches donneront des images différentes et complémentaires de la contribution des sources, avec différents niveaux d'exigence en données et différents niveaux de précision. Elles répondront à des questions de santé publique spécifiques.

Conclusion

L'attribution de source est un outil original en ce qu'il constitue une approche quantitative, intégrative et globale de l'origine des infections alimentaires. Les résultats d'attribution permettent d'alerter sur les sources dont l'impact en santé publique est prépondérant et de mesurer *a posteriori* l'efficacité des mesures prises sur l'évolution des

cas humains. Les résultats d'attribution ont été la base de la réduction drastique des cas humains de campylobactériose en Nouvelle-Zélande (Muellner *et al.*, 2011). Ils sont utilisés annuellement au Danemark pour guider la politique de santé publique en matière d'infections entériques d'origine alimentaire et sont appelés à être de plus en plus utilisés au niveau européen. Ce type d'approche constitue ainsi un outil de santé publique de choix pour la gestion des infections alimentaires multi-sources, qui appelle une implication forte de l'ensemble des acteurs de la surveillance d'un pathogène, de la fourche à la fourchette en passant par l'environnement. Un exemple s'il en est de démarche One Health.

Références bibliographiques

David, J. M., 2009. Attribution des cas de salmonelloses humaines aux différentes filières de production animale en France, Adaptabilité et robustesse du modèle bayésien d'attribution par typage microbiologique. Université européenne de Bretagne, Rennes.

David, J.M., Guillemot, D., Bemrah, N., Thébaud, A., Brisabois, A., Chemaly, M., Weill, F.X., Sanders, P., Watier, L., 2013a. The Bayesian microbial subtyping attribution model: robustness to prior information and a proposition. *Risk Anal.* 33, 397-408.

David, J.M., Sanders, P., Bemrah, N., Granier, S.A., Denis, M., Weill, F.X., Guillemot, D., Watier, L., 2013b. Attribution of the French human Salmonellosis cases to the main food-sources according to the type of surveillance data. *Prev. Vet. Med.* 110, 12-27.

Muellner, P., Marshall, J.C., Spencer, S.E., Noble, A.D., Shadbolt, T., Collins-Emerson, J.M., Midwinter, A.C., Carter, P.E., Pirie, R., Wilson, D.J., Campbell, D.M., Stevenson, M.A., French, N.P., 2011. Utilizing a combination of molecular and spatial tools to assess the effect of a public health intervention. *Prev. Vet. Med.* 102, 242-253.

Mughini Gras, L., Smid, J.H., Wagenaar, J.A., de Boer, A.G., Havelaar, A.H., Friesema, I.H., French, N.P., Busani, L., van Pelt, W., 2012. Risk factors for campylobacteriosis of chicken, ruminant, and environmental origin: a combined case-control and source attribution analysis. *PLoS ONE* 7, e42599.

Poirier, E., Watier, L., Espie, E., Weill, F.X., De Valk, H., Desenclos, J.C., 2008. Evaluation of the impact on human salmonellosis of control measures targeted to *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium in poultry breeding using time-series analysis and intervention models in France. *Epidemiol. Infect.* 136, 1217-1224.

Vers des stratégies analytiques globales et non ciblées de recherche de résidus de substances interdites en élevage

Gaud Dervilly-Pinel (laberca@oniris-nantes.fr), Stéphanie Prévost, Ludivine Sérée, Bruno Le Bizec

Oniris, Laboratoire d'étude des résidus et contaminants dans les aliments (Laberca), Laboratoire national de référence pour les promoteurs de croissance et contaminants environnementaux organiques, LUNAM Université, Nantes, France

Résumé

Certaines substances β -adrénergiques peuvent être utilisées chez l'animal d'élevage à des fins zootechniques. Ces β -agonistes peuvent être incorporés à des doses très faibles dans les aliments destinés aux animaux. Ces molécules modifient certains processus biologiques liés à la croissance des tissus en augmentant la lipolyse et la synthèse protéique, en diminuant la lipogenèse et la dégradation des protéines. Ces substances sont considérées comme des « agents de répartition ». Les méthodes classiques dites ciblées permettent de manière routinière de contrôler une quarantaine de β -agonistes dont l'usage est interdit chez les animaux de production. La simplicité relative des procédés de synthèse pour ce type de molécules permet d'envisager une possible circulation sur le marché noir en Europe de substances dont la structure chimique n'a pas encore été officiellement décrite. Cette hypothèse de travail a conduit le LNR français compétent en la matière à développer dès 2007 des stratégies de criblage, non plus ciblées uniquement sur les molécules natives ou leurs métabolites, mais sur des marqueurs moléculaires d'effet, consécutifs à l'administration de la dite substance connue ou pas. Ces approches dites non ciblées ou métabolomiques sont utilisées officiellement depuis 2013 en France pour le contrôle officiel. Il s'agit d'une première mondiale en la matière.

Mots-clés

Anabolisants, agonistes β -adrénergiques, spectrométrie de masse, métabolomique, biomarqueurs, dépistage

Abstract

Towards global and untargeted analytical strategies to screen for banned substance residues in livestock

A number of β -adrenergic agonist drugs may be used for fattening purposes in livestock. When added to feed even at low doses, β -adrenergic agonists modify various biochemical tissue growth processes by increasing lipolysis, decreasing lipogenesis, decreasing protein degradation and increasing protein synthesis. These substances are considered as repartitioning agents. Classical "targeted" analytical methods routinely authorize screening for around 40 forbidden molecules in food animal production. As the organic synthesis of such compounds is relatively simple, the circulation of new molecules that have not yet been described is probable on the black market. This working hypothesis was the starting point for the French National Reference Laboratory to develop alternative detection strategies which were not based on the monitoring of native compounds or their metabolites, but rather on effect-specific molecular biomarkers following animal exposure to, or treatment with, a known or unknown substance. A world first, these untargeted analytical strategies, also known as metabolomic strategies, are officially used in France since 2013 in the context of its national growth promoter monitoring system.

Keywords

Anabolic, β -adrenergic agonist drugs, Mass spectrometry, Metabolomics, Biomarkers, Screening

L'utilisation des promoteurs de croissance en élevage est prohibée au sein de l'Union européenne depuis 1988 (directive 88/146/EC puis directive 96/22/EC). Afin de garantir au consommateur des denrées exemptes de résidus de ce type de substances, un dispositif de surveillance et de contrôle accompagne cette mesure (directive 96/23/EC). S'assurer de l'absence des composés interdits dans les denrées alimentaires d'origine animale requiert le développement de méthodes d'analyse spécifiques et sensibles. Au cœur de cette problématique, la classe des agonistes β -adrénergiques (β -agonistes) (groupe A5 de la directive 96/23/EC) retient particulièrement l'attention. L'usage des β -agonistes en élevage soulève des questions relatives à l'activité pharmacologique des résidus présents dans les denrées animales à l'égard du consommateur. Ces résidus issus d'agonistes préférentiels des récepteurs bêta-2 adrénergiques (β 2-AR) (prédominants au niveau vasculaire et bronchique) demeurent capables d'activer les récepteurs bêta-1 adrénergiques (β 1-AR) (préférentiels au niveau cardiaque). Ces molécules, utilisées pour certaines d'entre elles à des fins thérapeutiques en médecine humaine et vétérinaire en raison de leurs propriétés pharmacologiques, présentent parfois des effets zootechniques intéressants. C'est le développement d'agonistes spécifiques des récepteurs adrénergiques (β -AR), en particulier le clenbutérol, qui a conduit à envisager l'utilisation des β -agonistes en élevage pour leurs effets « d'agents de répartition », à savoir une diminution de la masse du tissu adipeux, associé à une accréation protéique⁽¹⁾. Ces propriétés anabolisantes ont été évaluées chez de nombreuses espèces animales, l'activité la plus forte ayant été

observée chez les ruminants (augmentation de la masse protéique produite, amélioration de la conformation des carcasses et de l'indice de consommation).

Genèse de l'approche

Si un contrôle performant de l'usage des β -agonistes peut être aujourd'hui assuré par le réseau des laboratoires officiels en Europe, la mise en évidence de certaines pratiques, notamment le recours par d'éventuels fraudeurs à de nouveaux composés synthétiques ou encore l'usage de cocktails basses doses, demeure un défi pour les scientifiques et une problématique toujours d'actualité pour les structures de contrôle. Le développement de nouvelles approches analytiques apparaît aujourd'hui nécessaire pour faire progresser l'efficacité du contrôle de l'utilisation de ces substances en élevage. Dans ce contexte, des stratégies dites « globales » ou « indirectes » sont mises en œuvre afin de mettre en évidence, non pas la molécule administrée, mais l'effet qu'elle produit sur l'animal. L'idée sous-jacente est d'identifier des biomarqueurs de pratiques anabolisantes. Ces stratégies globales réfèrent notamment aux approches « omiques » parmi lesquelles la métabolomique, qui à travers la génération d'empreintes métaboliques permet la mise en évidence de profils discriminants d'animaux traités versus non traités et la mise en lumière de biomarqueurs d'effet associés. Le développement de ces approches métabolomiques, basées le plus souvent sur la chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse très haute résolution, constitue depuis une dizaine d'années une activité intense de recherche et de développement au sein du Laberca (laboratoire national de référence en la matière). De nombreux projets

(1) Accréation protéique ou gain protéique net: correspond à une synthèse protéique supérieure à la protéolyse

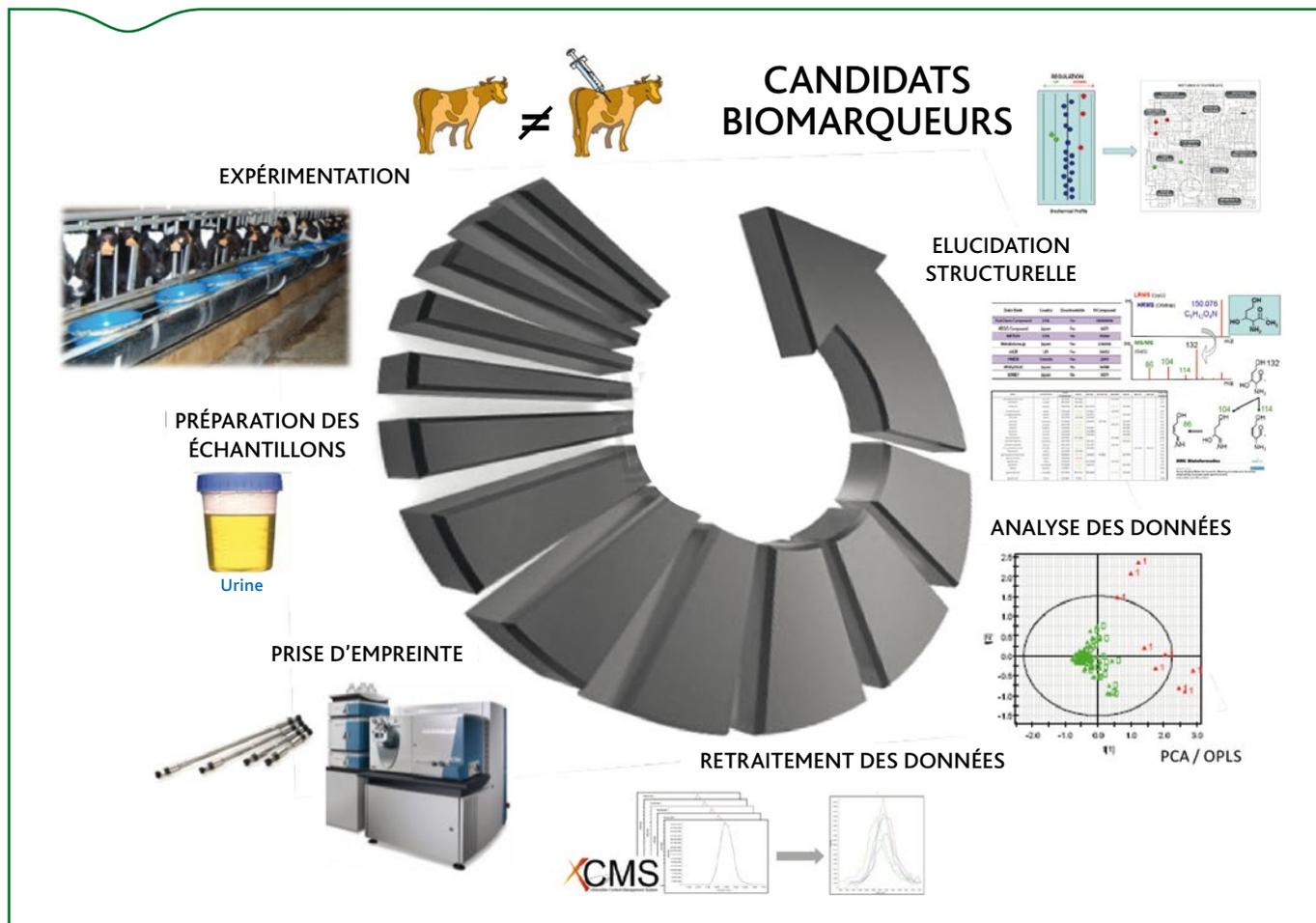


Figure 1. Processus analytiques conduisant à l'observation (ou pas) de marqueurs d'effets consécutifs à l'exposition d'un animal de production à une substance active (par ex. β -agoniste)

de recherche soutenus par la région Pays de la Loire, l'État (DGAL) et l'Union européenne (EU FP6, EU FP7, Projets Marie Curie) ont permis d'obtenir des résultats prometteurs autorisant aujourd'hui d'envisager l'utilisation officielle de biomarqueurs signant l'effet anabolisant chez des animaux de production.

Comment identifie-t-on ces biomarqueurs ?

Le processus conduisant à la détection et à l'identification de biomarqueurs d'exposition ou d'effet débute nécessairement par une expérimentation animale bien calibrée. La puissance statistique doit être raisonnablement ajustée de manière à donner de la robustesse aux signaux détectés dès les premières observations. La plus basique des expérimentations est conduite sur deux groupes d'animaux (le plus souvent veaux pour les β -agonistes), l'un étant considéré comme témoin, l'autre recevant l'administration de la substance (la posologie et la durée du traitement sont définies sur la base de conditions d'usage pré-supposées). Les deux groupes d'animaux doivent posséder des caractéristiques intrinsèques (races, âge...) et d'élevage (conditions physiques, alimentation, stress...) – à défaut d'identiques – les plus proches possibles de manière à ne pas entraîner de biais dans l'interprétation des observations, en raison d'un paramètre qui ne serait pas lié à l'administration de la molécule. Les fluides biologiques (sang et urine) des animaux sont prélevés de manière homogène entre individus avant et après administration à pas de temps réguliers. La conservation des échantillons doit être identique du début à la fin de l'expérimentation et entre animaux; une température de -80°C est requise pour prévenir la dégradation de composés labiles du métabolome. Le processus analytique débute par la préparation des échantillons en se plaçant dans les meilleures conditions de comparabilité (Figure 1). Une normalisation est fréquemment réalisée; pour illustration, une mesure

de la gravité spécifique de chaque échantillon permet par dilution de ramener tous les échantillons à la même valeur. Ensuite, puisque par principe une telle stratégie analytique ne s'appuie pas sur des *a priori* en termes d'analyse, l'échantillon est amené, lorsque possible, tel quel à l'analyseur. Une étape de filtration reste toutefois nécessaire pour éliminer les molécules à haut poids moléculaire (> 10000 Da). On considère qu'une vaste majorité des molécules caractérisées sous le vocable métabolome possède des masses moléculaires inférieures à 1000 Da. Deux types principaux d'enregistreurs sont utilisés par la communauté; d'une part la résonance magnétique nucléaire (RMN), d'autre part la spectrométrie de masse très haute résolution. La RMN ne donne en pratique accès qu'à une faible fraction du métabolome, limite due sa relative faible sensibilité (détection possible au-dessus de plusieurs dizaines de microgrammes).

La spectrométrie de masse en revanche produira des signaux interprétables jusqu'à quelques centaines de picogrammes, donnant ainsi accès à la plus grande partie du métabolome. N'importe quel spectromètre de masse ne peut pas produire ces empreintes métaboliques; seuls ceux opérant en très haute résolution (résolution $> 30,000$) pourront, par la spécificité du signal produit, donner une information sur la masse exacte des molécules donc leur formule brute. Les spectromètres de masse compétents pour cette opération sont essentiellement les temps de vol (TOF) et les orbitrapes; ils sont le plus souvent couplés à de la chromatographie en phase liquide ou gazeuse. Les empreintes chromato-spectrométriques produites pour chaque échantillon sont extrêmement riches en informations si bien que la comparaison des profils entre échantillons n'est possible que par l'usage d'outils chimio-métriques puissants et dédiés.

Une étape d'alignement et de normalisation des signaux précède l'usage des outils statistiques qui comprennent une analyse de variance (ANOVA), une analyse en composante principale (ACP), une Orthogonal Partial Least Squares (OPLS) ou une analyse par classification

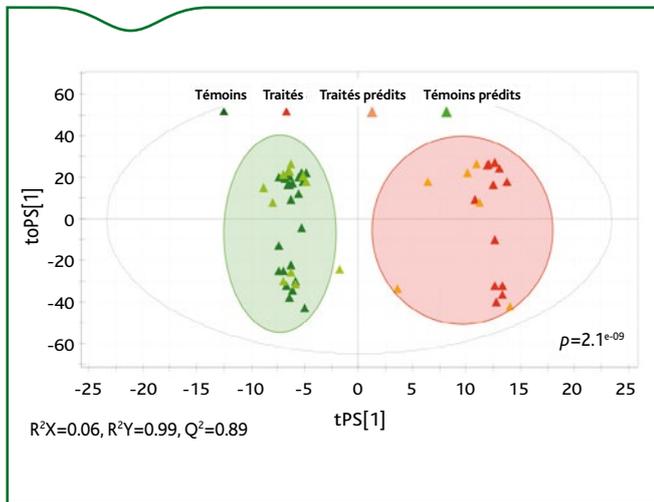


Figure 2. Analyse multivariée supervisée de type OPLS (Orthogonal Projections to Latent Structures) et représentation d'un jeu de données combinant animaux traités (en rouge ou orange) et témoins (verts clair et foncé). Chaque point représente un animal. Une séparation significative des deux groupes d'animaux est observée sur ce graphique. La prédictivité d'appartenance à un groupe pour un échantillon collecté chez un animal traité (orange) versus non traité (vert clair) est assurée en atteste le positionnement des animaux considérés dans le modèle.

ascendante hiérarchique (CAH). Un exemple de représentation graphique est donné en Figure 2; l'OPLS sépare nettement les deux classes d'animaux traités versus non traités et prédit parfaitement l'appartenance d'animaux au statut connu dans le modèle. Chaque axe de l'analyse intègre une équation liant les marqueurs entre eux. Une représentation sous forme de S-plot permet de mieux visualiser les marqueurs responsables de la différence entre groupes (Figure 3). Chaque point (=une variable) sur ce graphique (par ex. M300T1063) correspond à une molécule. Les points aux extrémités du nuage représentent les molécules contribuant le plus à la différence observée, elles sont dès lors considérées comme marqueurs potentiels de l'effet. Les deux extrémités du nuage de points correspondent, d'un côté aux

signaux sur-exprimés chez les animaux traités, de l'autre à ceux sous-exprimés chez ces mêmes animaux traités. À ce stade du processus, des signaux, donc des candidats biomarqueurs, peuvent se dégager spécifiquement dans chacun des deux groupes d'animaux et expliquer la séparation entre groupes. Deux informations sont accessibles, le temps de rétention du marqueur et sa masse exacte.

L'identification de la structure développée, donc l'assignation d'un nom à la molécule, passe alors par des investigations additionnelles. Cette élucidation implique d'abord l'interrogation de bases de données; pour des molécules déjà décrites, l'identification peut être rapide. Pour des molécules qui ne le seraient pas, les étapes menant à la structure chimique de la molécule inconnue peuvent être beaucoup plus chronophages.

Comment valide-t-on ces biomarqueurs ?

La validation du caractère diagnostique des candidats biomarqueurs passe par la mesure du profil métabolique d'un grand nombre d'échantillons collectés chez des animaux non traités. La plus grande variabilité doit être introduite à ce niveau pour rendre robuste l'information délivrée par les biomarqueurs finalement retenus. Les caractéristiques des animaux recrutés doivent permettre de couvrir le plus grand nombre de situations en termes de race, âge, sexe, alimentation, variables de collecte (heure, saison...). Pour tester le caractère sélectif de la réponse donnée par les biomarqueurs, des urines collectées chez des animaux traités par des substances appartenant à d'autres classes pharmacologiques peuvent également être intégrées au modèle afin de vérifier que le profil des biomarqueurs d'intérêt n'est pas perturbé. Enfin, des échantillons d'urine issus d'autres expérimentations où les animaux auraient été traités par des β -agonistes de structure différente de celle utilisée dans l'expérimentation originelle permettent de tester le caractère universel des marqueurs d'effet, *i.e.* au regard de la réponse donnée pour des composés d'une même classe pharmacologique. La durée de détectabilité de la perturbation du profil des biomarqueurs suite à un traitement β -agoniste doit être déterminée pour préciser la performance diagnostique de l'approche.

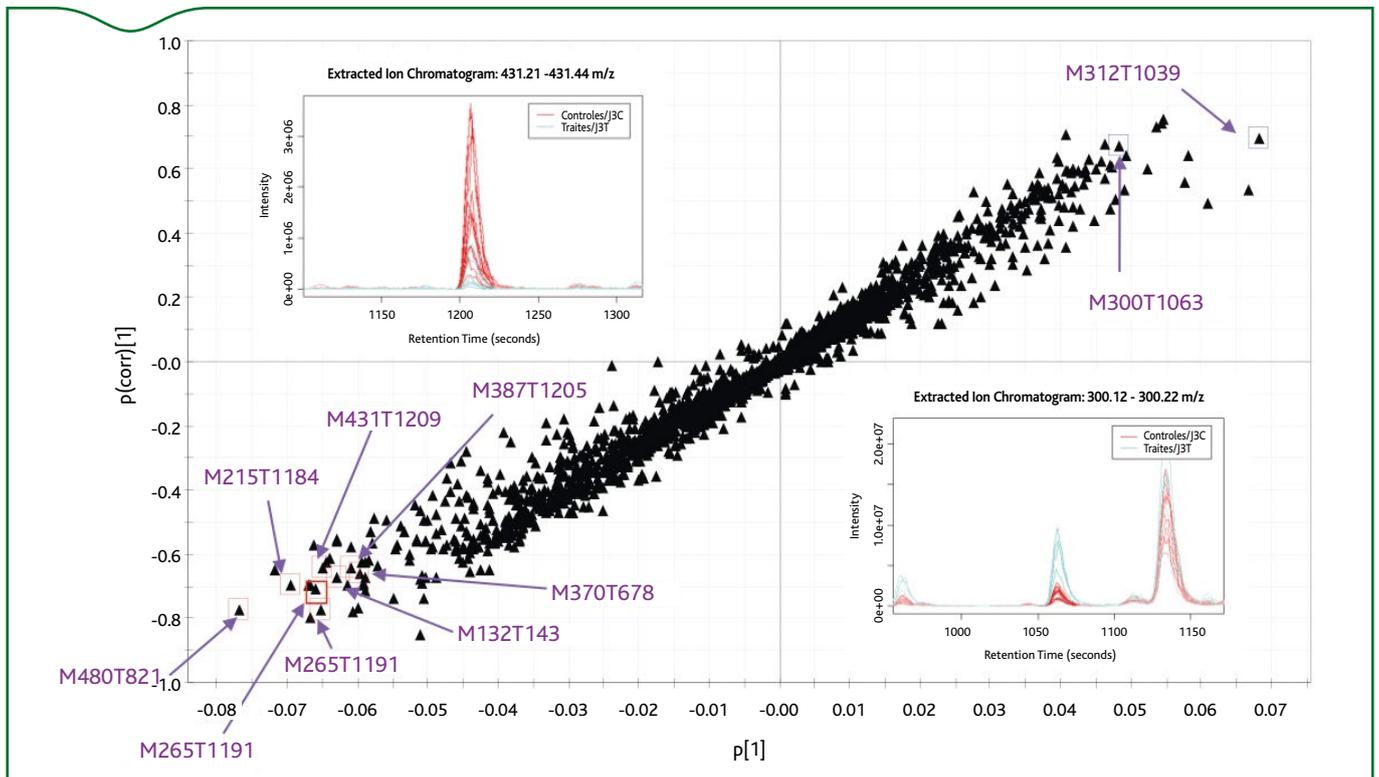


Figure 3. Représentation S-plot des molécules ayant contribué à la séparation des groupes témoins et traités. Chaque point (par ex. M300T1063) correspond à une molécule. Plus ces points sont proches des extrémités, plus ils contribuent à la séparation. Ils sont des marqueurs potentiels de l'effet. Dans le carré en haut à droite apparaissent des signaux sur exprimés chez les animaux traités; dans le carré en bas et gauche, les signaux sont plus exprimés chez les témoins.

Comment utilise-t-on ces biomarqueurs ?

Lorsque les biomarqueurs sont caractérisés partiellement ou totalement, deux stratégies sont possibles. La première repose sur le développement de test rapide, peu coûteux et facile à mettre en œuvre, utilisant des anticorps dirigés contre chacun des marqueurs. L'inconvénient de cette approche est qu'elle nécessite de connaître parfaitement les biomarqueurs pour pouvoir développer des anticorps spécifiques. La seconde stratégie est basée sur un couplage chromatographie – spectrométrie de masse en approche ciblée. Le principe de la dilution isotopique peut être utilisé pour garantir une bonne quantification individuelle de chacun des biomarqueurs et *in fine* une prédiction robuste pour l'échantillon testé. L'avantage principal est que la connaissance de la structure développée du marqueur n'est pas indispensable; l'inconvénient réside dans la mesure qui reste technique et réservée à des laboratoires spécialisés.

En cas de perturbation de l'homéostasie métabolique, *i.e.* une valeur pour y dans l'équation au-delà d'une valeur seuil traduisant la suspicion d'une non-conformité (Figure 4), une approche ciblée visant les β -agonistes connus est mise en œuvre. Si le résultat est en désaccord avec le test métabolomique de dépistage, la recherche de résidus d'un β -agoniste dont la structure chimique n'est pas encore connue est activée. Il s'agit alors d'une véritable opération de *fishing* qui peut nécessiter l'usage concomitant de tests biologiques (reconnaissance de la molécule par anticorps, cage chimique ou récepteur) et spectrométriques (identification de la structure chimique).

Conclusion

L'efficacité du modèle et sa pertinence à prédire des échantillons d'animaux traités avec différents β -agonistes - seuls ou en cocktails basses doses a été démontrée. La variabilité naturelle des profils métaboliques des animaux a été éprouvée sur plusieurs centaines d'individus confortant chaque jour un peu plus le modèle. Ce dernier présente dorénavant un pouvoir prédictif répondant aux exigences réglementaires en matière de méthode de dépistage, notamment au regard du taux cible de faux-suspects et faux conformes. Après un plan expérimental 2014 ayant permis de finaliser le modèle expérimental, le plan 2015 permettra de produire les premiers résultats officiels de dépistage. La spécificité du modèle et sa capacité à prédire d'autres types de traitements anabolisants chez les bovins (stéroïdes, GH...) sont également en cours d'investigation.

Références bibliographiques

- Antignac, J. P., Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Elliott, C., et al. (2011). Mass spectrometry-based metabolomics applied to the chemical safety of food. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 30(2), 292–301. doi:10.1016/j.trac.2010.11.003.
- Courant, F., Pinel, G., Bichon, E., Monteau, F., Antignac, J. P., & Le Bizec, B. (2009). Development of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to screen for clenbuterol abuse in calves. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analyst*, 134(8), 1637–1646. doi:10.1039/b901813a.
- Courant F, Antignac JP, Dervilly-Pinel G, Le Bizec B. Basics of mass spectrometry-based metabolomics. *Journal of Proteome Research* 2014;14:2369-2388.
- Dervilly-Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chereau, S., Rambaud, L., Essers, M., et al. (2011). Assessment of two complementary liquid chromatography coupled to high resolution mass spectrometry metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analytica Chimica Acta*, 700(1–2), 144–154. doi:10.1016/j.aca.2011.02.008.
- Dervilly-Pinel, G., Courant, F., Chereau, S., Royer, A., Boyard-Kieken, F., Antignac, J., et al. (2012). Metabolomics in food analysis: Application to the control of forbidden substances. *Drug Testing and Analysis*, 4, 10.
- Dervilly-Pinel G, Chereau S, Cesbron N, Monteau F, Le Bizec B. LC-HRMS based metabolomics screening model to detect various β -agonists treatments in bovines. *Metabolomics* 2015 (DOI 10.1007/s11306-014705-3).

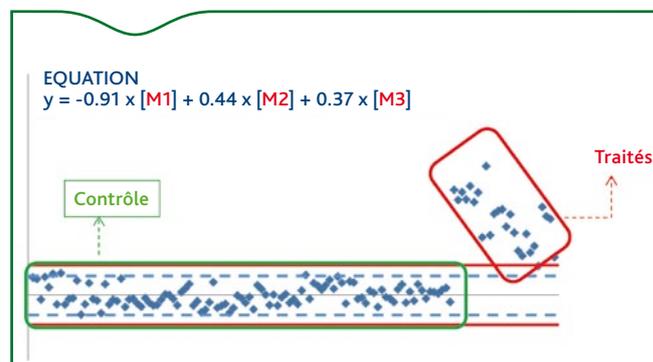


Figure 4. Mise en équation des biomarqueurs et utilisation en contrôle officiel

L'axe des ordonnées représente une équation liant les trois marqueurs retenus pour le test (M1, M2, M3), l'axe des abscisses correspondant aux différents animaux. Plusieurs centaines d'échantillons témoins ont permis de calculer pour ces trois marqueurs des valeurs moyennes mais aussi d'en déduire les valeurs des 95^e et 99^e percentiles, (P95 et P99, resp.) Au-delà de la valeur du P99, un échantillon est considéré suspect et doit faire l'objet de la procédure de confirmation.

Gallart-Ayala H., Chéreau S., Dervilly-Pinel G., Le Bizec B. Potential of mass spectrometry metabolomics for chemical food safety. *Bioanalysis Review*, 2015;7(1):133-146.

Jacob, C. C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., & Le Bizec, B. (2013). Evaluation of specific gravity as normalization strategy for cattle urinary metabolome analysis. *Metabolomics*. doi:10.1007/s11306-013-0604-z.

Jacob, C., Dervilly-Pinel, G., Biancotto, G., Monteau, F., & Le Bizec, B. (2014). Global urine fingerprinting by LC-ESI(?)–HRMS for better characterization of metabolic pathway disruption upon anabolic practices in bovine. *Metabolomics*. doi:10.1007/s11306-014-0685-3.

Kaabia, Z., Dervilly-Pinel, G., Popot, M. A., Bailly-Chouriberry, L., Plou, P., Bonnaire, Y., et al. (2014). Monitoring the endogenous steroid profile disruption in urine and blood upon nandrolone administration: an efficient and innovative strategy to screen for nandrolone abuse in horses. *Drug Testing and Analysis*. doi:10.1002/dta.1520.

Kieken, F., Pinel, G., Antignac, J., Garcia, P., Popot, M., Grall, M., et al. (2011). Development and application of a metabolomic approach based on liquid chromatography-high resolution mass spectrometry to reveal an illegal administration of recombinant equine growth hormone in horse from urinary and plasmatic biological signatures. *Metabolomics*, 7, 9.

Kouassi Nzoughe J, Dervilly-Pinel G, Chéreau S, Biancotto G, Monteau F, Elliott CT, Le Bizec B. First insights into serum metabolomics of Revalor-XS® implanted bovines; Screening model to predict animals' status. *Metabolomics* 2015.

Le Bizec, B., Pinel, G., & Antignac, J. P. (2009). Review: Options for veterinary drug analysis using mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1216, 8016–8034.

Mooney, M. H., Bergwerff, A. A., van Meeuwen, J. A., Luppa, P. B., & Elliott, C. T. (2009). Biosensor-based detection of reduced sex hormone-binding globulin binding capacities in response to growth-promoter administrations. [Research Support, Non-U.S. Gov't]. *Analytica Chimica Acta*, 637(1–2), 235–240. doi:10.1016/j.aca.2008.08.024.

Pinel, G., Weigel, S., Antignac, J. P., Mooney, M. H., Elliott, C., Nielsen, M. W. F., et al. (2010). Targeted and untargeted profiling of biological fluids to screen for anabolic practices in cattle. *TrAC, Trends in Analytical Chemistry*, 29(11), 1269–1280. doi:10.1016/j.trac.2010.06.010.

Pinel, G., Weigel, S., Lommen, A., Chéreau, S., Rambaud, L., Essers, M., et al. (2011). Assessment of two complementary LC-HRMS metabolomics strategies for the screening of anabolic steroid treatment in calves. *Analytica Chimica Acta*, 700, 10.

Retrouvez tous les numéros du *Bulletin épidémiologique* au format électronique
<http://bulletinepidemiologique.mag.anses.fr/>



[Aller au menu](#) | [Aller au contenu](#) | [Aller à la recherche](#) | [Accessibilité](#) | [Plan du site](#)
FR | EN

RECHERCHER

[> TOUS LES NUMÉROS](#)



[Présentation](#) | [Tous les numéros](#) | [Abonnement électronique](#) | [Contact](#)

NUMÉRO 67 BULLETIN EPIDÉMIOLOGIQUE

mars 2015

ÉDITO

Dans ce premier numéro très fourni de 2015, un premier article présente des résultats originaux sur la prévalence d'un parasite zoonotique, *Diphyllobothrium latum*, chez les poissons des lacs subalpins en France. Il est intéressant de constater que l'entretien du cycle épidémiologique entre les poissons de lac et l'Homme est très certainement dû aux évolutions des pratiques alimentaires, avec la mode actuelle de consommation de poissons crus.



Télécharger le numéro

AU SOMMAIRE

ARTICLES

Prévalence de l'infestation par *Diphyllobothrium latum* de différents poissons des lacs Léman, du Bourget et d'Annecy et évaluation de l'incidence des cas humains auprès des laboratoires d'analyse médicale de la région (2011-2013)
Auteur : Jean Dupouy-Camet, Malak Haidar, Eduardo Dei-Cas, Hélène Yera, Laurent Espinat, Amine Benmostefa, Jean Guillard, Cécile-Marie Allouat-Denis

Episodes de mortalité massive de moules bleues observés en 2014 dans les Pertuis charentais
Auteur : C. Béchemin, P. Soletchnik, P. Polsenaere, O. Le Moine, F. Pernet, M. Protat, M. Fuhrman, C. Quéré, S. Goultiquet, C. Corporeau, S. Lapègue, A. Travers, B. Morga, M. Garrigues, C. Garcia, P. Haffner, C. Dubreuil, N. Faury, L. Baillon, J.-P. Baud, T. Renault

Influenza aviaire dans le monde : situation au 31 janvier 2015
Auteur : Marisa Peyre, Nicolas Gaidet, Alexandre Caron, Julien Cappelle, Annelise Tran, François Roger

ACTUALITÉS

FIÈVRE CATARRHALE OVINE EN EUROPE EN 2014 : ÉPIZOOTIE DANS LES BALKANS, PROGRESSION DE LA CIRCULATION EN ITALIE ET EN ESPAGNE
Elena Arsevska (elena.arsevska@cirad.fr), Thomas Balenghien, Emmanuel Bréard, Claire Garros, Renaud Lancelot, Corinne Sailleau, Stéphan Zientara

PREMIÈRE DÉTECTION DU PETIT COLÉOPTÈRE DES RUCHES (*AETHINA TUMIDA*) EN ITALIE
Marie-Pierre Chauzat (marie-pierre.chauzat@anses.fr), Stéphanie Franco, Véronique Duquesne, Marie-Pierre Rivière, Richard Thiéry, Fayçal Meziani, Pascal Hendriks, Magali Ribière-Chabert, Franco Mutinelli

Consultez l'article de votre choix grâce à une recherche ciblée par sujet, auteurs et mots du titre.

[Aller au menu](#) | [Aller au contenu](#) | [Aller à la recherche](#) | [Accessibilité](#) | [Plan du site](#)
FR | EN

RECHERCHER

[> TOUS LES NUMÉROS](#)



[Présentation](#) | [Tous les numéros](#) | [Abonnement électronique](#) | [Contact](#)

2009 2010 2011 2012 2013 **2014** 2015



Télécharger

N° 61 Bulletin épidémiologique : mars 2014 >>>



Télécharger

N° 62 Bulletin épidémiologique : juin 2014 >>>



Télécharger

N° 63 Bulletin épidémiologique : sept. 2014 >>>



Télécharger

N° 64 Bulletin épidémiologique : oct. 2014 >>>

ACTUALITÉS

FIÈVRE CATARRHALE OVINE EN EUROPE EN 2014 : ÉPIZOOTIE DANS LES BALKANS, PROGRESSION DE LA CIRCULATION EN ITALIE ET EN ESPAGNE
Elena Arsevska (elena.arsevska@cirad.fr), Thomas Balenghien, Emmanuel Bréard, Claire Garros, Renaud Lancelot, Corinne Sailleau, Stéphan Zientara

PREMIÈRE DÉTECTION DU PETIT COLÉOPTÈRE DES RUCHES (*AETHINA TUMIDA*) EN ITALIE
Marie-Pierre Chauzat (marie-pierre.chauzat@anses.fr), Stéphanie Franco, Véronique Duquesne, Marie-Pierre Rivière, Richard Thiéry, Fayçal Meziani, Pascal Hendriks, Magali Ribière-Chabert, Franco Mutinelli

[Aller au menu](#) | [Aller au contenu](#) | [Aller à la recherche](#) | [Accessibilité](#) | [Plan du site](#)
FR | EN

RECHERCHER

[> TOUS LES NUMÉROS](#)



[Présentation](#) | [Tous les numéros](#) | [Abonnement électronique](#) | [Contact](#)

ABONNEMENT ÉLECTRONIQUE BE

Pour être informé, par courriel, de la parution du dernier numéro du BE, merci de compléter le formulaire ci-dessous.

Utilisation des données personnelles
 Les informations recueillies par cette fiche de renseignements feront l'objet d'un traitement informatisé, destiné à la gestion des inscriptions à la lettre d'information électronique du Bulletin Épidémiologique Santé animale - Alimentation. Conformément à la loi "informatique et libertés" du 6 janvier 1978 modifiée, vous bénéficiez d'un droit d'accès et de rectification aux informations qui vous concernent. Vous pouvez exercer ce droit auprès de la Direction de l'Information, de la communication et du dialogue avec la société de l'Anses par courrier électronique. Vous pouvez également vous opposer au traitement des données qui vous concernent pour un motif légitime.

* Champ requis

Nom *

Prénom

Courriel *

Profession

Organisation

Soumettre

Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation n° 68/Sécial Vigilance sur la chaîne alimentaire 59

Directeur de publication: Marc Mortureux
Directeur associé: Patrick Dehaumont
Comité de rédaction: Didier Boisseleau,
Anne Brisabois, Corinne Danan, Françoise Gauchard, Pascal
Hendrikx, Paul Martin, Elisabeth Repérant, Sylvain Traynard
Rédacteur en chef: Didier Calavas
Rédactrice en chef adjointe: Clara Marcé

Secrétaire de rédaction: Vera Varilova-Kant
Responsable d'édition: Fabrice Coutureau
Assistante d'édition: Céline Leterq
Webmaster du site du BE: Julien Vigneron
Anses - www.anses.fr
14 rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex

Courriel: bulletin.epidemo@anses.fr
Conception et réalisation: Parimage
Impression: Bialec
65 boulevard d'Austrasie - 54000 Nancy
Tirage: 4000 exemplaires
Dépôt légal à parution/ISSN 1630-8018

Numéro coordonné par Corinne Danan (1), Isabelle Berta (2), Anne Brisabois (3), Françoise Gauchard (4), Nathalie Jourdan-Da Silva (5), Didier Calavas (5)

- (1) Direction générale de l'alimentation, Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments, Bureau d'appui à la surveillance de la chaîne alimentaire, Paris, France
- (2) Anses, Direction des laboratoires, Unité de coordination et d'animation de la surveillance, Maisons-Alfort, France
- (3) Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Unité *Listeria Salmonella E.coli*, Maisons-Alfort, France
- (4) Anses, Direction de l'évaluation des risques, Unité Observatoire des aliments, Maisons-Alfort, France
- (5) Institut de veille sanitaire, Département des maladies infectieuses, Unité EAZ, maladies entériques alimentaires et zoonoses, Saint-Maurice, France
- (6) Anses, Laboratoire de Lyon, France

