



# *Euro*Reference

*Les cahiers de la* Référence

Hiver 2013

Numéro 11





# *Euro* **Reference**

*Les cahiers de la* **Référence**

**Cahier numéro 11**

Hiver 2013

## Éditorial

Dans ce numéro, deux articles sont consacrés à la nouvelle réglementation française sur les « MOT », micro organismes et toxines utilisables à des fins de bioterrorisme ou d'agroterrorisme. Le premier article est publié dans la rubrique *Focus* et présente les règles et principes généraux de la mise en place de cette nouvelle réglementation dans les laboratoires de l'Anses en France, le second, publié dans la rubrique *Méthodes* est une guide pratique pour la mise en place de ces nouvelles contraintes en matière de biosécurité et de sûreté. Il est possible, peut-être probable, que d'autres pays européens vont adopter des réglementations similaires et nous avons pensé que ces guides pourraient constituer un partage d'expérience utile à tous.

Toujours dans les nouvelles réglementations, un article de la rubrique *Focus* commente la révision du Règlement (CE) N°882/2004 sur l'organisation des contrôles officiels dans les pays membres de l'Union européenne.

À côté des articles méthodologiques ou de recherche (recherche des néonicotinoïdes dans le nectar; modélisation de la contamination par *Listeria monocytogenes*; souches de *Salmonella* monophasiques), ce numéro est donc largement consacré à des aspects réglementaires, français ou européens.

Enfin, le *Point de vue* vous présente une réflexion sur le rôle des laboratoires de référence dans la surveillance proprement dite, à partir d'un article lui aussi élaboré au niveau européen.

Bonne lecture!

**La rédaction**

## Au sommaire



### Point de vue

Quel est le rôle des LNR/CNR dans la surveillance des maladies ?

Page 2



### Focus

Mise en œuvre de la nouvelle réglementation MOT: expérience de l'Anses

Page 5

Révision du règlement (CE) n° 882/2004 sur l'organisation des contrôles officiels

Page 10



### Méthodes

Guide méthodologique pour l'évaluation des risques relatifs à la sécurité et la sûreté biologiques

Page 13

Méthode de confirmation moléculaire des souches de *Salmonella* variants monophasiques et immobiles du sérovar Typhimurium

Page 14

Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans le nectar par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Page 19



### Recherche

Modélisation de la contamination par *Listeria monocytogenes* pour l'amélioration de la surveillance dans les industries agro-alimentaires

Page 23



### Agenda

EURL News : European Union Reference Laboratories News

Page 27



## Point de vue

### Quel est le rôle des LNR/CNR dans la surveillance des maladies?

Paul Martin (paul.martin@anses.fr)

Anses, Laboratoire de Lyon, FRANCE

#### Fonctions essentielles des LNR/CNR

Dans leur rapport technique de 2010 (ECDC, 2010) « Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases », les auteurs définissent de manière claire et synthétique cinq types d'activités, les « core-fonctions », pour les laboratoires ou centre nationaux de référence en Europe :

- fonction 1 : diagnostic de référence (reference diagnostics);
- fonction 2 : matériel de référence (reference material resources);
- fonction 3 : expertise scientifique (scientific advice);
- fonction 4 : collaboration et recherche (collaboration and research);
- fonction 5 : surveillance, alerte et réponse (monitoring, alert and response).

Le document est le résultat d'un consensus entre les représentants des points focaux nationaux (NMFPs ou National Microbiology Focal Points) des différents pays de l'Union. Il entend encourager la coopération entre « experts » et laboratoires de référence et servir de document central pour les futures discussions sur le système européen de laboratoires de référence. Les termes de « laboratoire national de référence » (LNR) et de « centre national de référence » (CNR) sont tous deux couramment employés. Cependant cet usage est souvent spécifique de chaque pays et différentes interprétations de chaque terminologie existent. Pour éviter toute confusion et établir une référence commune, nous utiliserons ici, comme le recommande le rapport de l'ECDC (2010), la terminologie « laboratoire de référence en microbiologie ».

Nous développerons ici la *core-fonction 5*, essentielle à nos yeux, des laboratoires de référence en microbiologie : la surveillance, l'alerte et la réponse. En effet, ces activités sont le pivot des interactions entre un laboratoire de référence en microbiologie et l'organisme en charge de la surveillance épidémiologique des maladies au niveau national (ou provincial, suivant le niveau où est située, dans chaque pays, cette responsabilité).

Les objectifs de la fonction 5 peuvent se résumer de la façon suivante pour un agent pathogène donné :

- 1 – mesurer, sur une base annuelle, semestrielle, mensuelle, etc., l'évolution spatio-temporelle de la présence, du nombre d'identifications du pathogène et de ses grandes caractéristiques (résistance aux antibiotiques, antiviraux ou antiparasitaires, nouveaux sérotypes, etc.);
- 2 – alerter les autorités de santé publique de tout événement inhabituel, inattendu, concernant cet agent pathogène : apparition d'une résistance nouvelle aux antibiotiques, émergence d'un nouveau sérotype, shift sérotypique, nouveau facteur de virulence, occurrence inhabituelle de cas groupés, etc. ;
- 3 – en cas de foyer ou de véritable épidémie/épidémiologie, participer activement, en étroite collaboration avec l'organisme chargé de la surveillance épidémiologique de cette maladie, à la documentation des isolats des pathogènes impliqués, de façon à confirmer l'unicité de l'étiologie des cas épidémiques et les différencier si nécessaire des cas endémiques, à

surveiller leur possible microévolution (*i.e.* l'acquisition par exemple d'une résistance aux antiviraux, aux antibiotiques, etc.) et surtout à les caractériser de façon suffisamment précise pour permettre l'identification certaine de l'origine de l'épidémie. Ce dernier point est particulièrement important dans les cas de maladies humaines d'origine alimentaire, pour lesquelles l'identification de la source épidémique est essentielle pour la mise en œuvre des mesures de santé publique qui en découlent. Ce dernier aspect, particulièrement important en termes de santé publique, est en fait très opérationnel. Il nécessite donc une relation de travail équilibrée et en confiance, souvent journalière, entre le laboratoire de référence en microbiologie (ou les laboratoires s'il en existe plusieurs, parfois dépendant de plusieurs ministères comme la santé, l'agriculture, l'environnement, etc.) et l'organisme responsable de la surveillance épidémiologique. La participation du laboratoire de référence en microbiologie aux investigations épidémiologiques (prévue par exemple en France pour les CNR dans leur cahier des charges) est l'un des moyens qui favorisent ce travail en commun.

Les relations entre les deux types d'investigateurs concernés par la surveillance épidémiologique des maladies, microbiologistes et épidémiologistes, sont des interactions **régulières** (pour les tendances spatio-temporelles, l'adoption de nouvelles techniques de laboratoire ou méthodes épidémiologiques, etc.), **fortes** (lors des crises sanitaires, épidémies) et **organisées** (de façon à bien situer le rôle de chacun, notamment lors des investigations d'épidémies). Une relation équilibrée entre ces deux types de partenaires aux cultures scientifiques différentes mais nécessairement complémentaires, facilite et améliore grandement les résultats en termes de santé publique.

#### Le diagnostic moléculaire, un challenge pour le rôle des laboratoires de référence en microbiologie dans la surveillance de la circulation des souches

L'importance de l'épidémiologie moléculaire pour l'activité des laboratoires de référence en microbiologie n'est plus à démontrer, que ce soit lors des épidémies d'origine alimentaire, pour retrouver l'origine de la contamination et l'aliment incriminé, ou en santé animale et humaine, pour déterminer par exemple l'origine d'un clone de pathogène impliqué dans une infection nosocomiale, l'origine d'une maladie virale émergente en Europe, ou déterminer les caractéristiques de virulence d'une population donnée de bactéries pathogènes. Dans tous ces cas, l'implication des microbiologistes aux côtés des épidémiologistes est essentielle.

Du point de vue du laboratoire de référence en microbiologie, le diagnostic moléculaire, surtout lorsqu'il est réalisé en première intention, ce qui est de plus en plus souvent le cas, représentera dans le futur un véritable défi. En effet le diagnostic moléculaire va, pour la majorité des agents pathogènes, remplacer les méthodes classiques de culture et d'isolement des souches bactériennes, virales ou fongiques, et donc modifier considérablement nos



## Point de vue

possibilités de caractérisation phénotypique et génotypique des isolats pathogènes, mais aussi réduire progressivement la nature et la mémoire de nos collections et limiter les possibilités d'analyse historique rétrospective. Ce point peut être important sur le plan épidémiologique et clinique, mais aussi sur le plan fondamental, notamment en limitant les études sur l'évolution des agents pathogènes.

Cependant, il ne s'agit pas d'un phénomène très récent. Cette problématique existe déjà depuis plusieurs années avec les micro-organismes pathogènes non cultivables ou difficilement cultivables. C'est par exemple le cas des virus des hépatites, et en particulier du virus de l'hépatite E (VHE). Pour ce dernier, qui n'est pas cultivé en routine, les microbiologistes ont cependant développé tout un système de diagnostic et de typage moléculaire (Baylis, 2011) réalisé directement à partir des échantillons biologiques que fournit la clinique (selles, sérum) ou même à partir d'échantillons d'eau. La PCR ciblée suivie d'un séquençage du brin amplifié permet de classer le virus dans l'un des quatre génotypes décrits, puis de le sous-typier et de le situer dans l'arbre phylogénétique des VHE. Ce même type de démarche s'étend maintenant à d'autres genres viraux, difficilement cultivables ou non (Kroneman, 2011 ; Ren, 2013).

Ce type d'approche est réalisable tant pour les virus que pour les bactéries, pour lesquelles le typage moléculaire est souvent venu remplacer le sérotypage classique, long et laborieux (Doumith, 2004). Bien que certaines techniques de typage moléculaire des bactéries puissent théoriquement être réalisées sans passer par l'étape classique de culture bactérienne, du moins lorsque le prélèvement est potentiellement mono-microbien, comme le typage des VNTR (Variable Number Tandem Repeat), le SLST (Single Locus Sequence Typing), le typage du gène de la protéine A de *Staphylococcus aureus*, ou même le MLST (Multi-Locus Sequence Typing), en pratique les techniques de typage moléculaire des bactéries sont réalisées après culture et isolement classiques. C'est le cas des typages les plus utilisés comme le MLST et le typage VNTR, et bien sûr de la macro-restriction d'ADN (PFGE) pour laquelle des quantités importantes d'ADN sont nécessaires. Dans un proche avenir, le développement de l'accès aux séquences complètes de génomes bactériens (Whole Genome Sequence, WGS) ou viraux à des fins d'épidémiologie moléculaire par des méthodes NGS (Next Generation Sequencing) apporteront de telles qualités et quantités d'informations, utiles tant aux épidémiologistes qu'aux cliniciens infectiologues, qu'il y a des chances importantes de voir ces techniques se généraliser dans un avenir peut-être pas très lointain. La connaissance que le WGS apportera sur le virulome, sur le « toxome » (ensemble de tous les gènes de toxines) et le résistome (Wright, 2007) d'un ou de plusieurs isolats cliniques pourra être essentielle à la prise en charge du malade, comme à la prise de décision en santé publique. De plus le WGS, aujourd'hui réalisable à partir d'ADN obtenu à partir de culture pure peut aussi être réalisé, au moins théoriquement, par WGA (Whole Genome Amplification) basée sur une Amplification par déplacements multiples (MDA) utilisant la DNA-polymérase du phage Phi29 et des primers randomisés (random primers) (Lasken, 2003). Des kits de WGA sont aujourd'hui commercialisés et permettent, à partir de 10 ng d'ADN, d'obtenir entre 40 et 50 µg d'ADN en fin de réaction, une quantité suffisante pour obtenir une séquence complète. D'autres méthodes ont été adaptées à la détection et l'amplification de très faibles quantités d'ADN

dans les prélèvements pathologiques, comme par exemple pour les bactéries de l'espèce *Chlamydia trachomatis* (Seth-Smith, 2013).

Le diagnostic moléculaire réalisé dans les laboratoires de microbiologie clinique ne se fait pas en une seule étape : avant l'étape d'amplification proprement dite, les étapes de dilution des inhibiteurs potentiels et de concentration de l'ADN ou de l'ARN, constituent aussi des sources essentielles de matériel biologique. En effet, seuls quelques micro litres sont généralement utilisés pour la PCR diagnostique, et le reste peut être conservé quelques semaines au moins et être utilisé à la demande par les laboratoires de référence, à des fins de caractérisation génotypique et d'épidémiologie moléculaire, comme à des fins de recherche.

Enfin, l'expérience de TYPENED en Hollande (Niesters, 2013) est aussi une des réponses à ce défi en permettant d'intéresser les microbiologistes cliniques et les infectiologues aux données de l'épidémiologie moléculaire. Le concept est basé sur une base de données partagée qui collige les données cliniques, microbiologiques (séquences) et épidémiologiques. Tous les laboratoires participants, cliniques et de référence, ont accès à toutes les données de la base, ce qui permet une comparaison en temps réel entre les données obtenues par un laboratoire de diagnostic et celles obtenues par d'autres laboratoires dans la même période de temps par exemple, ou ayant la même expression clinique, la même réponse thérapeutique, etc. Cliniciens comme épidémiologistes de santé publique et microbiologistes des laboratoires de référence y trouvent ainsi chacun un intérêt.

Les perspectives de développement de ces systèmes sont prometteuses, car elles s'ouvrent sur une réelle amélioration de la surveillance des maladies infectieuses au niveau global, tant pour le clinicien infectiologue que pour le microbiologiste, l'épidémiologiste et le gestionnaire du risque. Avec ou sans étape de culture classique du pathogène et après quelques améliorations techniques dans l'instrumentation, obtenir les séquences complètes de chaque pathogène impliqué dans une pathologie sera possible et accessible. Cela permettra, outre une meilleure adéquation thérapeutique avec les données de la microbiologie moléculaire, une intégration rapide et en temps réel des données globales sur le ou les malades, les agents pathogènes et les données épidémiologiques. En effet, la transmission et l'échange de données moléculaires sont incomparablement plus « transportables » que les isolats de pathogènes bactériens, viraux, fongiques ou parasitaires. À la condition que ces données soient partagées, cela constitue l'opportunité de créer un système global de bases de données reliées entre elles pour la caractérisation génétique des microorganismes isolés des malades, humains ou animaux, et des sources potentielles de contamination (prélèvements hospitaliers, aliments, eaux de boisson, etc.) Cette surveillance intégrée (Aarestrup, 2012) permettra une réponse de santé publique mieux coordonnée, y compris transfrontalière lorsque nécessaire, et plus adaptée aux menaces réelles pour la santé publique.

### Références

Aarestrup F M, Brown E W, Detter C, Gerner-Smidt P, Gilmour M W, Harmsen D, et al. 2012. Integrating genome-based informatics to modernize global disease monitoring, information sharing, and response. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2012 Nov [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1811.120453>

Sommaire

Point de vue

Focus

Méthodes

Recherche

Agenda



## Point de vue

Baylis S A, Hanschmann K-M, Blümel J, Nübling C M, on behalf of the HEV Collaborative Study Group, 2011. Standardization of Hepatitis E Virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*, 49:1234-1239.

Doumith M, Buchrieser C, Glaser P, Jacquet C, Martin P, 2004. Differentiation of the major *Listeria monocytogenes* serovars by multiplex PCR, *J Clin Microbiol*, 42:3819-3822.

ECDC, 2010. European Centre for Disease Prevention and Control. Core functions of microbiology reference laboratories for communicable diseases. Stockholm: ECDC; 2010.

Lasken R S, Egholm M, 2003. Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends in Biotech*, 21:531-535.

Niesters H G, Rossen J W, van der Avoort H, Baas D, Benschop K, Claas EC, Kroneman A, van Maarseveen N, Pas S, van Pelt W, Rahamat-Langendoen J C, Schuurman R, Vennema H, Verhoef L, Wolthers K, Koopmans M, 2012. Laboratory-based surveillance in the molecular era: the TYPENED model, a joint data-sharing platform for clinical and public health laboratories. *EuroSurveillance*. 2013;18(4):pii=20387. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20387>

Seth-Smith H M B, Harris S R, Skilton R J, Radebe F M, Golparian D, Shipitsyna E, Duy P T, Scott P, Cutcliffe L T, O'Neill C, Parmar S, Pitt R, Baker S, Ison C A, Marsh P, Jalal H, Lewis D A, Unemo M, Clarke I N, Parkhill J, Thomson N R, 2013. Whole-genome sequences of *Chlamydia trachomatis* directly from clinical samples without culture. *Genome Res*, 23:855-866.

Wright, G D, 2007. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nat Rev Microbiol*, 5:175-186.

Ren X, Yang F, Hu Y, Zhang T, Liu L, Dong J, *et al.* 2013. Full genome of influenza A (H7N9) virus derived by direct sequencing without culture. *Emerg Infect Dis* [Internet], 2013 Nov [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1911.130664>

Kroneman A, Vennema H, Deforche K, Avoort H V D, Penaranda S, Oberste M S, Vinjé J, Koopmans M, 2011. An automated genotyping tool for enteroviruses and noroviruses? *J Clin Virol*, 51:121-125.



## Focus

### Mise en œuvre de la nouvelle réglementation MOT: expérience de l'Anses

S. Allix, B. Garin-Bastuji, V. Jestin, N. Madani, P. Marianneau, E. Monchâtre-Leroy, F. Rizzo, E. Rousset, K. Sidi-Boumedine, S. Zini (sylvie.zini@anses.fr).

Anses, Maisons-Alfort, France

**Les nouvelles mesures réglementaires françaises, relatives aux opérations mettant en œuvre les micro-organismes et toxines (MOT), sont en passe de modifier durablement le paysage des laboratoires de microbiologie. Ce nouveau cadre réglementaire vient renforcer le dispositif de contrôle dans ce domaine pour une meilleure sécurité et sûreté biologiques. Il se traduit en pratique par un accroissement des exigences administratives et fonctionnelles qui nécessitent une plus grande vigilance de la part des opérateurs. Pour répondre à ces nouvelles exigences, l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (Anses) a mis en place en son sein une méthodologie d'évaluation des risques prenant en compte les spécificités de ses laboratoires dans les domaines de la référence et de la recherche.**

#### Introduction

Le code de la santé publique définit dans le chapitre IX, article L. 5139-1, la notion de micro-organismes et toxines (MOT) : il s'agit des agents biologiques pathogènes pour l'Homme et des toxines, dont l'emploi serait de nature à présenter un risque pour la santé publique ainsi que les produits qui en contiennent. Concrètement, ces MOT sont susceptibles de présenter un risque réel pour la santé publique en cas d'exposition accidentelle (notion de *sécurité biologique*) ou intentionnelle (notion de *sûreté biologique*) hors de leur zone de confinement. La liste des MOT est arrêtée par le ministre en charge de la santé. La modification de l'article L. 5139-2 du code de la santé publique s'est traduite par la publication du décret n°2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux MOT, entré en application au 1<sup>er</sup> juillet 2012. Ce nouveau cadre réglementaire, qui comprend sept arrêtés d'application et une décision, concerne l'ensemble des laboratoires français réalisant toute opération concernant des MOT à des fins de diagnostic, de recherche, de développement ou d'enseignement.

Ce cadre réglementaire vise avant tout à protéger le travailleur, l'environnement et la population contre une dissémination, accidentelle ou malveillante, d'un agent biologique dangereux, en établissant des règles de sécurité et de sûreté appropriées, permettant de réduire efficacement les risques pour la santé publique. Le contrôle de la bonne application de ces règles revient à l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM), laquelle a la charge de délivrer les autorisations, d'administrer et de contrôler toutes les opérations concernant des MOT (production, fabrication, transport, importation, exportation, détention, offre, cession, acquisition et emploi).

Souignons qu'un régime d'exonération est établi pour :

- certaines spécialités pharmaceutiques, médicaments expérimentaux contenant des MOT ayant fait l'objet d'une inactivation ou d'une atténuation, assurant un niveau de sécurité suffisant pour la santé publique ;
- les réactifs destinés aux analyses réalisées dans les domaines vétérinaires et de la protection des végétaux ;
- les opérations réalisées par les établissements recevant aux seules fins d'analyse des échantillons biologiques (avec un délai de conservation inférieur à 30 jours) ;
- les opérations réalisées par les établissements du ministère de la défense (sauf pour celles d'importation et d'exportation).

Un autre allègement de la réglementation est également notable, même si la notion générale de « tout ou partie de MOT », reste toujours valable. Il s'agit des fragments de matériel génétique (ADN ou ARN) qui ne sont plus considérés comme partie de MOT, dès lors qu'ils ont une longueur inférieure à 500 nucléotides. Concernant les toxines, sont exemptés de la réglementation les fragments de toxines protéiques inférieurs à 167 acides aminés.

Pour répondre aux exigences du décret du 30 juin 2010, le dossier de demande d'autorisation comporte désormais deux parties distinctes :

- un dossier technique visant à décrire de façon détaillée les installations, les procédures et les systèmes de sécurité et de sûreté mis en œuvre par le laboratoire afin d'assurer la protection de son personnel, de la population et de l'environnement. Dans ce dossier, l'opérateur doit justifier de l'utilité de l'emploi de MOT ;
- une analyse des risques en matière de sécurité et de sûreté, tenant compte des mesures de protection déjà existantes.

Les laboratoires de référence et de recherche de l'Anses sont particulièrement concernés par ces nouvelles mesures, car ils sont appelés à travailler sur tous types de MOT (bactéries, virus, protéines, ADN, toxines). Aussi, pour répondre aux nouvelles exigences, l'Anses a rapidement dû s'organiser, sous peine de voir certaines de ses activités remises en cause. Devant la relative complexité de la nouvelle réglementation et la diversité des MOT mis en œuvre à l'agence, il est apparu nécessaire de mettre en place un groupe de travail en interne, chargé d'analyser les textes, de proposer une méthode commune pour harmoniser les dossiers, aider et soutenir les laboratoires de l'Anses dans leur démarche. Il a donc été créé *de facto* un Comité de maîtrise des risques biologiques en laboratoire (CMRBL), regroupant les expertises nécessaires pour répondre aux exigences de la réglementation. Ce comité a notamment travaillé sur la base de la méthodologie d'évaluation des risques fourni par l'ANSM et a proposé aux laboratoires de l'Anses un guide méthodologique d'évaluation des risques adapté aux problématiques de la recherche et de la référence, qu'il nous a semblé intéressant de rendre accessible aux laboratoires ayant les mêmes spécificités que celles de l'Anses. De plus, le CMRBL a joué un rôle d'interlocuteur unique en faisant remonter à l'ANSM les questions posées par les différents



## Focus

laboratoires de l'Anses, ce qui a permis d'établir avec l'ANSM des échanges constructifs et de trouver des réponses à la plupart des questions.

### La méthodologie adoptée par l'Anses

Parmi les onze laboratoires que compte l'Anses, six sont concernés par les MOT. Ces laboratoires sont implantés dans différentes régions du territoire français et comportent, selon les cas, des locaux et/ou des animaleries confinées de niveau 2 ou 3. Depuis juin 2012, 13 dossiers de demande de renouvellement et trois dossiers de demande d'autorisation ont été adressés à l'ANSM.

Le CMRBL regroupe 14 personnes aux compétences complémentaires : directeur de laboratoire, scientifique, ingénieur, technicien, responsable qualité, responsable biosécurité, responsable animalerie, assistant de prévention en hygiène et sécurité, délégué sécurité défense. Deux d'entre elles ont préalablement suivi une formation spécifique de trois jours en évaluation des risques, selon la Méthode d'analyse des modes de défaillance et de criticité (AMDEC). Du fait de l'important retard dans le calendrier des publications des arrêtés d'application MOT, le CMRBL n'a pu débuter ses travaux que début 2012, ce qui n'a laissé que très peu de temps aux laboratoires pour finaliser leurs dossiers, la date butoir fixée par le décret de 2010 étant le 30 juin 2012.

Dans un premier temps, le CMRBL a réalisé une analyse du dossier technique et interrogé l'ANSM sur les points qui n'apparaissaient pas clairs. L'ANSM a toujours répondu précisément à chaque question, par mail ou par téléphone, et précisé que, d'une manière générale, le pétitionnaire dispose d'une grande liberté de réponses, dès lors que celles-ci sont bien argumentées. Les principales réponses aux questions de l'Anses ont été regroupées dans le **Tableau 1**. Suite à cette analyse, le CMRBL a édité à l'attention des laboratoires de l'Anses, un exemplaire du dossier technique, assorti d'une explication de texte et de propositions de réponses.

La seconde phase a consisté à élaborer un « guide méthodologique pour l'évaluation des risques relatifs à la sécurité et la sûreté biologique » [<http://www.ansespro.fr/euroreference/>], en s'appuyant sur le modèle proposé par l'ANSM (« méthode de gestion des risques en sécurité et sûreté biologiques », version du 3 mai 2011) et disponible sur demande. Cependant, ce modèle s'est avéré peu adapté aux problématiques des laboratoires de l'Anses, tant sur le volet descriptif que sur le plan de la sémantique. Aussi les questionnaires d'identification des dangers ont-ils été adaptés aux spécificités de l'Anses (référence et recherche). Les échelles de cotation des risques en sécurité et en sûreté biologiques initialement proposées ont été modifiées qualitativement et quantitativement. Les bornes définissant les niveaux de risques « faible », « moyen » et « inacceptable », ont également été revues. Concernant le volet sécurité biologique, la méthodologie de calcul du risque a été totalement revue, avec l'introduction de la notion de gravité extrinsèque et une modification du calcul de l'indice de criticité. Ces modes de calcul ont été éprouvés dans plusieurs laboratoires de l'Anses puis ajustés, avant d'être définitivement adoptés par le CMRBL. Par ailleurs, l'Anses a choisi d'intégrer le système de management des risques biologiques dans sa politique globale de management des risques, puis de décliner celle-ci selon la spécificité de chaque entité.

### Mise en œuvre de la réglementation : quels impacts pour les laboratoires ?

#### Formation du personnel

Un niveau minimal de compétences et de qualifications est défini pour le titulaire d'autorisation ainsi que pour les personnes qu'il habilite dans l'arrêté du 17 mars 2011. En complément, les exigences de l'arrêté du 23 janvier 2013 sont très précises concernant l'habilitation et la formation initiale et continue du personnel avant tout accès aux installations et aux MOT. De toute évidence, chaque laboratoire devra mettre en place un plan de formation individualisé et adapté à chaque activité. Certaines universités ou organismes privés proposent déjà des enseignements spécifiques sur les risques biologiques, qui peuvent être adaptés à la problématique des MOT. Il est intéressant de souligner qu'un groupe de réflexion, porté par la Société Française de Microbiologie, travaille à l'élaboration d'un référentiel national de formation aux risques biologiques pour harmoniser les savoirs et les pratiques et donner un cadre formel afin que les personnes n'aient pas à recommencer leur formation lorsqu'elles changent de laboratoire. De fait, ces exigences de formation mais aussi d'habilitation des personnes travaillant sur les MOT excluent la participation de stagiaires de courte durée aux travaux portant sur tout ou partie de MOT. Cette conséquence pourrait être lourde pour certains laboratoires de recherche.

#### Locaux, équipements et matériels

La conception et l'utilisation des locaux et des équipements s'appuient sur le processus de management du risque, ce qui suppose de nombreuses exigences en termes de moyens, qu'il est important de budgétiser précisément avant d'initier la mise en œuvre des MOT. La capacité d'utilisation des installations doit être documentée dans les conditions normales et limites, en accord avec le volume d'activité du laboratoire afin de prévenir toute surexploitation. Par ailleurs, les opérations de validation, qualification, maintenance, surveillance des équipements de sécurité et de sûreté vont représenter une part très importante des dépenses de fonctionnement du laboratoire. Les laboratoires « anciens » doivent s'attendre à des dépenses non négligeables de mise aux normes.

#### Sous-traitance

Dans ce contexte très contraignant, un certain nombre de laboratoires seront tentés de se tourner vers l'externalisation de certaines tâches. Or, là encore, la réglementation définit très précisément le rôle et les responsabilités de chaque partenaire et impose de contractualiser toutes les opérations relatives à la mise en œuvre des MOT. À ce titre, la responsabilité du donneur d'ordre est nettement mise en avant.

#### Gestion documentaire

Comme pour tout système qualité, une gestion documentaire devra permettre d'assurer la traçabilité de toutes les opérations effectuées et la sécurisation des documents attestant de la mise en œuvre des mesures de sécurité et de sûreté biologiques. L'ensemble de ces documents devront être disponibles, ce qui nécessitera la mise en place d'un système de gestion documentaire spécifique.

#### Exigences spécifiques

L'arrêté du 23 janvier 2013, relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques,





## Focus

définit dans son chapitre 7 des « exigences spécifiques » concernant l'utilisation d'animaux vertébrés et invertébrés (arthropodes) mettant en œuvre des MOT et des micro-organismes génétiquement modifiés de MOT. Ces exigences sont complémentaires et sans préjudice des réglementations relatives à l'expérimentation animale (décret du 1<sup>er</sup> février 2013 et ses arrêtés) et aux MGM (directive 2009/41/CE du parlement européen).

Pour les établissements d'expérimentation animale, ces exigences imposent des contraintes jusque-là non obligatoires. Par exemple, les animaux vertébrés doivent faire l'objet d'un marquage individuel et durable de façon à assurer une traçabilité des animaux. Cette exigence ne présente pas de difficulté de mise en œuvre ni de surcoût pour les animaux de moyenne et de grande taille (lagomorphes, chiens, chats, primates, animaux de rente, etc.) lesquels sont déjà identifiés individuellement avant leur entrée dans les établissements d'expérimentation animale (articles L. 212 et R. 214 du code rural).

Par contre, pour les petits rongeurs de laboratoire (souris et rats), la mise en œuvre de l'identification individuelle est plus complexe et des surcoûts non négligeables sont à prévoir en fonction de la technique utilisée (tatouage, baguage, puce électronique). L'identification la plus simple à mettre en œuvre, mais surtout la plus sûre, reste pour ces petits animaux l'implantation sous la peau d'un transpondeur électronique. Cette technologie présente cependant quelques désavantages à prendre en compte : 1) elle ne peut pas être utilisée de manière systématique en raison d'une modification du système immunitaire due à la réaction inflammatoire locale au site d'implantation du transpondeur qui peut interférer avec les résultats expérimentaux ; 2) son coût peut atteindre trois à quatre euros HT par animal en fonction de la taille et de la qualité du transpondeur pour un animal dont la valeur commerciale est de deux à trois euros HT (dans le cas de souris OFI ou Swiss par exemple). Une analyse des risques en sûreté biologique en fonction du MOT et du modèle animal orientera le choix de la technique d'identification individuelle à utiliser.

S'agissant de la question des arthropodes, la réglementation demande que le recours aux animaux invertébrés avec des MOT soit précédé d'une analyse des risques en sécurité biologique afin d'éviter une diffusion des arthropodes en dehors des systèmes de confinement choisis. Cette analyse des risques devra prendre en compte le mode de déplacement des arthropodes de type volant (moustiques) ou non (puces, poux, tiques). Des précautions supplémentaires doivent également être prises pour éviter la manipulation des arthropodes libres ou fixés sur animaux vertébrés dans des PSM de type I ou II. Ces précautions sont principalement de deux ordres : 1) une protection des personnels avec des équipements de protection individuelle devant recouvrir l'intégralité de la peau pour éviter le risque de piqûres par un arthropode ; 2) la mise en place d'un sas froid ou de tapis collant devant les portes de sortie des salles d'hébergement des arthropodes pour prévenir le risque d'un échappement des animaux vers l'extérieur. Enfin, la réglementation impose un comptage systématique et rigoureux de tous les individus avant et après manipulation avec toutes les contraintes de temps de travail supplémentaire que cela impose. Il est à noter que lors de la conception du guide méthodologique d'analyses des risques rédigé par le CMRBL de l'Anses, ces points spécifiques liés à l'expérimentation animale ont été intégrés tant sur le plan de la sécurité biologique que sur le plan de la sûreté biologique.

### Plan d'urgence et zones de restriction d'accès

Il est important de noter que le laboratoire aura obligation de mettre en place un plan d'urgence interne pour faire face aux situations pouvant mettre en danger son personnel, le public ou l'environnement. Ce plan d'urgence comprend la description précise du circuit des alertes internes et des échanges d'informations avec les services de secours extérieurs et les autorités administratives. Il doit également prévoir la réalisation périodique d'exercices de simulation. Pour élaborer ce plan, le laboratoire devra impérativement travailler en concertation avec les services externes (préfecture, pompiers, SAMU, gendarmerie, etc.). Enfin, à ces mesures de sécurité, viendront s'ajouter les mesures de sûreté visant à limiter le risque d'une utilisation de MOT à des fins malveillantes. Afin de ne pas alourdir le système, ces mesures devront être en cohérence avec les exigences du décret du 2 novembre 2011 relatif à la protection du potentiel scientifique et technique de la Nation qui préconise la délimitation de zones à régime restrictif (ZRR) pour les biens matériels et immatériels à double usage, pouvant être captés ou détournés.

En outre, pour les MOT inscrits dans l'annexe I de l'arrêté du 30 avril 2012, un plan particulier d'intervention doit être mis en place. Celui-ci définit les moyens de secours mis en œuvre et leurs modalités de gestion en cas d'accident dont les conséquences dépassent l'enceinte de l'installation à risques concernée. Ces modalités couvrent les phases de mise en vigilance, d'alerte et d'intervention mais aussi les exercices de sécurité civile réalisés périodiquement pour une bonne appropriation du dispositif. Le plan particulier d'intervention constitue un volet du dispositif d'Organisation de la réponse de sécurité civile (Orsec) départemental.

### Conclusion

Si cette réglementation s'inscrit, de fait, dans une logique de protection de la santé publique qui s'impose progressivement au niveau européen, il n'en est pas moins vrai que la lourdeur administrative de ce cadre réglementaire et la contrainte temporelle forte imposée par les pouvoirs publics ont pu entraîner des difficultés de mise en œuvre pour certains laboratoires. Par ailleurs, la mise en œuvre de cette nouvelle réglementation provoque une dichotomie entre les laboratoires concernés par les MOT et les laboratoires confinés de niveau 3 non concernés par les MOT, ces derniers n'étant pas soumis à un contrôle ou une inspection systématiques qui vérifieraient l'application de l'arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures de prévention pour les travailleurs susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. Pour mémoire, cet arrêté porte sur les préconisations à mettre en œuvre dans un laboratoire pour respecter la notion de sécurité biologique et dans une moindre mesure de sûreté biologique. Il est alors surprenant que des laboratoires manipulant des agents de classe 3, même s'ils ne sont pas des MOT, ne soient soumis à aucun contrôle. *A contrario*, les laboratoires concernés par les MOT, que ce soient des agents de classe 2 ou 3 sont soumis à des contraintes réglementaires très strictes. Pour certains laboratoires, la réglementation MOT va se superposer à celle des ZRR, voire à celle relative aux secteurs d'activité d'importance vitale, à celle du code de la Défense concernant les toxines, lesquelles sont considérées comme des produits chimiques relevant du **tableau 1** de la Convention d'interdiction des armes chimiques (CIAC) et à celle du double usage (règlement CE 388/2012 du 19 avril 2012). Enfin, si l'ensemble des contraintes



## Focus

imposées par les MOT a permis une certaine clarification des acteurs concernés par les MOT, le désengagement de certains laboratoires sur ces sujets pourra conduire à un certain vide dans le maillage sanitaire français sur des micro-organismes très réglementés en laboratoire, mais existant à l'état naturel sur le territoire national (*Mycobacterium tuberculosis* ultra-résistante dans les hôpitaux, *Francisella tularensis* régulièrement isolée dans la faune sauvage, etc.).

### Références bibliographiques

*Textes réglementaires relatifs aux MOT*

Code de la santé publique: article L. 5139-2 modifié par la Loi n°2009-879 Art 111. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichCodeArticle.do?cidTexte=LEGITEXT000006072665&idArticle=LEGIARTI000020889763&dateTexte=>

Décret n°2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022415024&categorieLien=id>

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les mentions qui figurent sur les états annuels des stocks prévus à l'article R. 5139-14 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022415125&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent dans le registre ou les enregistrements mentionnés à l'article R. 5139-17 du code de la santé publique. [<http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022415149&dateTexte=&categorieLien=id>]

Arrêté du 30 juin 2010 fixant les renseignements qui figurent sur l'autorisation mentionnée à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022415141&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 17 mars 2011 relatif aux compétences et qualifications dont le titulaire de l'autorisation mentionnée à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique justifie pour lui-même ainsi que pour les personnes qu'il habilite pour contribuer sous sa responsabilité aux opérations faisant l'objet de cette autorisation. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000023776935&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 30 mai 2011 fixant la liste des médicaments mentionnée à l'article R. 5139-26 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00002418577>

Arrêté du 30 avril 2012 fixant la liste des micro-organismes et toxines prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000025837146&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 11 juin 2013 modifiant l'arrêté du 23 janvier 2013 relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnés à l'article R. 5139-18 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027047902&categorieLien=id>

Décision du 20 octobre 2010 fixant le contenu du dossier technique mentionné à l'article R. 5139-3 du code de la santé publique et accompagnant la demande d'autorisation prévue à l'article R. 5139-1 du code de la santé publique. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000022993011>

### Textes réglementaires relatifs aux mesures de confinement

Arrêté du 16 juillet 2007 fixant les mesures techniques de prévention, notamment de confinement, à mettre en œuvre dans les laboratoires de recherche, d'enseignement, d'analyse, d'anatomie et cytologie pathologiques, les salles d'autopsie et les établissements industriels et agricoles où les travailleurs sont susceptibles d'être exposés à des agents biologiques pathogènes. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT00000465273&dateTexte=&categorieLien=id>

Directive 2009/41/CE du parlement européen et du conseil du 6 mai 2009 relative à l'utilisation confinée de micro-organismes génétiquement modifiés. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2009:125:0075:0075:FR:PDF>

### Textes réglementaires relatifs à la protection des animaux de laboratoire

Décret n° 2013-118 du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037840&categorieLien=id>

Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013 fixant les conditions d'agrément, d'aménagement et de fonctionnement des établissements utilisateurs, éleveurs ou fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques et leurs contrôles. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037983&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à l'acquisition des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037960&dateTexte=&categorieLien=id>

Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013 fixant les conditions de fourniture de certaines espèces animales utilisées à des fins scientifiques aux établissements utilisateurs agréés. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027037949>

Arrêté du 1<sup>er</sup> février 2013 relatif à l'évaluation éthique et à l'autorisation des projets impliquant l'utilisation d'animaux dans des procédures expérimentales. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000027038013&dateTexte=&categorieLien=id>

### Textes réglementaires relatifs aux plans de sécurité et de sûreté

Règlement CE n° 388/2012 du 19 avril 2012 portant modification du règlement (CE) n° 428/2009 du Conseil instituant un régime communautaire de contrôle des exportations, des transferts, du courtage et du transit de biens à double usage. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:129:0012:0280:FR:PDF>

Décret n° 2005-1158 du 13 septembre 2005 relatif aux plans particuliers d'intervention concernant certains ouvrages ou installations fixes et pris en application de l'article 15 de la loi n° 2004-811 du 13 août 2004 relative à la modernisation de la sécurité civile. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000000786335&dateTexte=&categorieLien=id>

Décret du 2 novembre 2011 relatif à la protection du potentiel scientifique et technique de la nation. <http://www.legifrance.gouv.fr/affichTexte.do?cidTexte=JORFTEXT000024749915&dateTexte=&categorieLien=id>

Sommaire

Point de vue

Focus

Méthodes

Recherche

Agenda



## Focus

Tableau 1. Aperçu des questions posées et les réponses apportées par l'ANSM.

Questions	Réponses ANSM
Que signifie le terme « devenir » des MOT, employé dans la partie 2.2 du dossier technique ?	Il revient au demandeur de l'autorisation de préciser quel est le « devenir » du MOT : destruction en fin de manipulation, éventuellement stockage par congélation, destruction du lot en fin de projet, etc.
Que signifie le terme « opération » dans la partie 3.4 Descriptif des opérations du dossier technique ?	« L'opération » est un terme générique qui peut être défini par le demandeur en fonction des activités propres du laboratoire.
Dans le chapitre 3.4.4 « Description de la mise en œuvre », il est difficile de répondre <i>a priori</i> , avant la mise en œuvre effective des protocoles : nombre maximum d'animaux utilisés pour l'expérimentation ; dose infectieuse maximale inoculée par animal ; durée et périodicité de l'expérimentation animale ; volume et surface maximum de culture ; durée et périodicité des cultures, etc.	La description de mise en œuvre peut être faite en donnant des chiffres moyens dans le cas des laboratoires de recherche qui modifient souvent leurs protocoles.
Système de management du risque : l'analyse des risques doit-elle être conduite pour chaque protocole ou peut-on considérer des groupes d'opérations à risques ?	Il s'agit d'évaluer les risques vis-à-vis de dangers « génériques » (risque de piqûre, risque de vol, échappement d'un animal, etc.) rencontrés lors de la mise en œuvre des protocoles.
Dans le cadre précis de ces validations de spécificité, un LNR peut-il détenir les ADN extraits de souches d'organismes classés MOT et les utiliser sur une période inférieure à 30 jours, et ainsi bénéficier d'une dispense d'autorisation ?	- soit l'ADN comprend moins de 500 paires de bases alors il est de fait exempté de réglementation MOT (arrêté du 30 avril 2012) ; - soit vous faites en sorte que cet ADN soit considéré comme un réactif vétérinaire et alors là aussi du coup il sera exempté.
La plupart des méthodes disponibles sont des PCR pour lesquelles il faut un témoin positif. Comment font les LVD pour avoir un témoin positif de référence qu'ils conservent moins de 30 jours ? Quels sont les critères qui permettent de considérer qu'un ADN est un réactif vétérinaire ?	L'article R. 5139-2 du CSP prévoit effectivement une exemption d'autorisation notamment pour les réactifs contenant des MOT, lorsqu'ils correspondent à des réactifs destinés aux analyses réalisées dans les domaines vétérinaires et de la protection des végétaux tels qu'ils sont définis à l'article L. 202-6 et au 1° de l'article R. 203-1 du Code rural et de la pêche maritime (CRPM). Les seuls réactifs vétérinaires exemptés sont ceux validés par les LNR.
Pour les virus de la grippe aviaire, comment interpréter le terme « responsables d'infection humaine » ? Doit-on se baser sur la seule constatation effective de cas humains rapportés ou sur le caractère zoonotique potentiel suspecté compte tenu de certaines caractéristiques virales mises en évidence ou en l'absence de ces informations, sur un classement par défaut dans cette catégorie selon le principe de précaution ?	La réglementation est basée sur la constatation effective de cas humains rapportés. L'arrêté du 30 avril 2012 précise : pour les <i>Orthomyxoviridae</i> : - virus de grippe aviaire de type A et sous-type H5N1, responsables d'infection humaine ; - virus de grippe aviaire de type A et sous-types » H7N7 et H7N3, responsables d'infection humaine. » Cette liste pourra évoluer si d'autres cas sont rapportés.
Certains renseignements demandés dans le dossier relèvent de la sécurité défense : doivent-ils être transmis ?	Les documents peuvent être classifiés confidentiels défense si nécessaire avant l'envoi à l'ANSM, laquelle dispose de personnel habilité à recevoir ce type de document.
Comment évaluer l'aptitude physique et psychique d'une personne amenée à travailler avec des MOT ?	Lors de la visite médicale, le médecin a tenté de percevoir les craintes qui peuvent être liées à la manipulation d'un agent MOT ou au travail en milieu confiné (claustrophobie). La mention « apte » suffit si cela implique ce questionnement.
Quelles sont les exigences en matière de formation des auditeurs MOT ?	Pas d'exigences spécifiques, seule nécessité de valider leur compétence en matière d'audit et de compétences MOT.



## Focus

### Révision du règlement (CE) n° 882/2004 sur l'organisation des contrôles officiels

Françoise KREMER (francoise.kremer@agriculture.gouv.fr)

SDPRAT- DGAL – ministère de l'agriculture, de l'agroalimentaire et de la forêt, Paris, FRANCE

**La Commission européenne vient d'adopter le 6 mai 2013 un ensemble de quatre propositions de règlements concernant la santé animale, la santé des végétaux, le matériel de reproduction végétale et les contrôles officiels<sup>1</sup>. Ce dernier texte remplacera le règlement (CE) n° 882/2004 sur les contrôles officiels, élaboré dans le cadre du paquet hygiène et couvrira un champ élargi, notamment au secteur végétal. Il constituera un texte de base sur l'organisation et la qualité des contrôles officiels, tant pour la production dans les différents États membres que pour l'importation des produits et des animaux en provenance des pays tiers. C'est maintenant au législateur européen, Parlement et Conseil, d'examiner les propositions et de les faire évoluer vers les textes définitifs.**

#### Contexte

Bien qu'élaboré dans le cadre du « paquet hygiène »<sup>2</sup>, l'actuel règlement (CE) n° 882/2004 dit « contrôles officiels » couvre déjà, en plus de la législation alimentaire, la santé animale et la protection animale. Les trois autres règlements remplaceront un ensemble de directives, soit plus de soixante textes en santé animale, la directive (CE) n° 2000/29 en santé des végétaux et douze directives dans le secteur du matériel de reproduction végétale, en dispositions directement applicables dans l'ensemble des États membres.

La révision du règlement (CE) n° 882/2004 s'inscrit dans ce contexte et la nécessité d'adapter les règles régissant les contrôles officiels pour l'ensemble des secteurs concernés. C'est aussi l'occasion d'améliorer les dispositions actuelles et de clarifier certains points à la lumière de l'expérience acquise. La proposition de règlement est donc plus transversale que la version actuelle et a été élaborée dans un souci de cohérence juridique avec l'ensemble des textes sectoriels. Elle a vocation à être complétée par une quarantaine d'actes délégués, pris par la Commission européenne (CE) et environ autant d'actes d'exécution votés en comité technique, avant adoption.

#### Un champ élargi et des critères qualitatifs pour les services de contrôles

La proposition clarifie et élargit le champ qui couvrira, outre les domaines des denrées alimentaires, de l'alimentation animale, de la santé des végétaux, de la santé et protection animales, le matériel de reproduction végétale, des domaines très fortement liés à la chaîne alimentaire comme les sous-produits animaux, les OGM, les produits phytopharmaceutiques. Les signes de qualité et d'origine sont maintenant explicitement cités.

En complément des contrôles officiels au sens de la vérification de la conformité à la réglementation, la notion d'« autres activités officielles » est introduite afin de couvrir les activités de type épidémiosurveillance, lutte contre les maladies animales et les organismes nuisibles.

Les critères qualitatifs, qui s'appliqueront aux autorités compétentes et à l'organisation des contrôles, restent fidèles aux principes actuels du règlement (CE) n° 882/2004 :

- les autorités compétentes, désignées dans chaque État

membre, doivent disposer, entre autres, d'un personnel libre de conflits d'intérêt, qualifié et en nombre suffisant, d'un nombre suffisant de laboratoires et des compétences légales pour l'exercice de leurs missions. Elles doivent mettre en place des audits « internes », les agents sont tenus à la confidentialité,...

- les contrôles doivent être réalisés selon le risque, notamment de non conformité, et en fonction de la nature du danger. La transparence des résultats de contrôle est clarifiée et un dispositif de vérification de l'efficacité des contrôles et des procédures doit être mis en place.

Parmi les points nouveaux, figure l'obligation pour les opérateurs d'assurer aux services de contrôle l'accès aux locaux et aux systèmes informatiques et de coopérer avec eux dans la réalisation des contrôles.

#### Une articulation avec des modalités de contrôle dans des domaines spécifiques

Dans la perspective d'une cohérence de l'ensemble du paquet législatif, une série de dix articles assure le lien juridique avec des dispositions à prendre par acte délégué, dans différents domaines sectoriels, afin d'harmoniser au niveau européen certaines modalités de contrôle et de reprendre certaines dispositions existantes.

Ainsi, par exemple, les dispositions relatives au contrôle des résidus de médicaments vétérinaires et substances interdites seront reprises dans un texte s'appuyant sur le nouveau règlement contrôle officiel et la Directive 96/23/CE sera abrogée.

#### Une délégation d'activités mieux adaptée aux différents secteurs

La délégation d'activités de contrôle ou d'autres activités officielles reste possible dans la proposition, sous réserve de l'existence de délégués répondant à des critères qualitatifs exigeants, pouvant aller jusqu'à l'accréditation. Dans un souci d'adaptation à la santé animale, les personnes physiques, comme les vétérinaires praticiens par exemple, peuvent également être délégués de missions confiées par les autorités compétentes.

1. <http://www.ansespro.fr/euroreference/Documents/ER10-Actu3.pdf>

2. Le paquet hygiène comprend les règlements (CE) n° 178/2002, 882/2004, 852/2004, 853/2004, 854/2004, 183/2005 et plusieurs textes d'application complémentaires.



## Focus

### Un chapitre entier dédié aux analyses et aux laboratoires

Le choix des méthodes d'analyse à mettre en œuvre (article 33)<sup>3</sup> privilégie l'harmonisation européenne et place en premier lieu les méthodes prévues dans des textes européens. Par défaut le choix de la méthode à utiliser doit être effectué selon une cascade : (i) les méthodes reconnues à l'échelon international, normalisées par le CEN, ou (ii) les méthodes validées selon des protocoles scientifiques acceptés à l'échelon international, élaborées ou recommandées par les laboratoires de référence de l'Union européenne (LRUE), ou (iii) les méthodes réglementaires nationales, ou (iv) les méthodes validées, élaborées ou recommandées par les laboratoires nationaux de référence (LNR), ou enfin (v) des méthodes « *ad hoc* » validées.

Un paragraphe a été ajouté pour le cas d'analyses à effectuer en urgence, en l'absence de méthodes disponibles et répondant aux critères ci-dessus : flexibilité est donnée aux LNR ou aux autres laboratoires compétents pour utiliser des méthodes non validées.

Le droit pour les opérateurs, dont les animaux ou biens sont soumis aux contrôles, de recourir à l'avis d'un second expert est maintenu (article 34) mais peut être limité par des textes d'application (actes d'exécution) à venir.

En matière d'échantillonnage (article 35), une nouvelle disposition est ajoutée, permettant l'échantillonnage en vue des contrôles « par internet », sans être identifié comme « contrôleur ».

En ce qui concerne les laboratoires officiels, chargés des analyses dans le cadre de contrôles officiels, (articles 36 à 41), leur désignation reste fondée sur l'accréditation du laboratoire mais des dérogations sont possibles temporairement dans le cas de nouvelles méthodes ou de modifications de méthodes et/ou de situations d'urgence, ainsi que dans le cas des recherches de trichine dans la viande. Les laboratoires d'analyse des semences et plants sont également dérogatoires à cette obligation d'accréditation. Le texte permet également d'assouplir ultérieurement, dans certains cas particuliers, l'obligation d'accréditation. Le projet de révision ajoute l'obligation, pour les laboratoires officiels, de participer aux essais inter-laboratoires d'aptitude organisés par le LNR ou le LRUE.

Les autorités compétentes doivent s'assurer, au moyen d'audits et d'inspections, du respect des conditions de désignation des laboratoires.

### Contrôles des animaux et des biens à l'importation

Les nouvelles dispositions, dans un souci de simplification et d'harmonisation entre les secteurs, remanient les dispositions du règlement (CE) n° 882/2004 et les modalités de contrôles des produits et animaux entrant dans l'UE. Elles contribuent à hiérarchiser les contrôles selon les risques. Une nouvelle dénomination, les « postes de contrôle frontaliers » remplace les diverses dénominations spécifiques à chaque secteur dans le cas des contrôles obligatoires avant dédouanement. Différents outils, tel le document sanitaire commun d'entrée, seront établis. Les modalités de contrôle et les mesures à prendre sont définies sur une base commune et la coopération avec les autres autorités comme les autorités douanières est

renforcée. Il ne s'agit pas de contrôler un animal vivant selon les mêmes dispositions qu'une boîte de conserve mais d'utiliser les mêmes outils et le même vocabulaire.

### Financement des contrôles et des autres activités officielles

Il reste obligatoire que les États membres veillent au financement des contrôles et des « autres activités » mais la question de la participation financière des opérateurs est profondément modifiée par rapport aux règles actuelles, qui prévoient quelques secteurs avec redevances obligatoires et permettent aux États membres qui le souhaitent d'en développer dans les autres secteurs.

Le principe de base d'un financement du coût complet des contrôles par les opérateurs par le biais de « redevances » perçues par les autorités compétentes est très largement réduit du fait d'une exemption de principe pour les micro-entreprises (moins de 2 millions d'euros de chiffre d'affaires et moins de 10 personnes). En clair, seul un nombre très réduit d'opérateurs serait concerné par le financement des contrôles via un système de redevances qui ne s'appliqueraient qu'à cette tranche d'entreprises.

C'est sans nul doute le chapitre qui suscitera le plus de discussions et de débats au cours de l'examen du texte.

### Certification officielle

La Commission a relevé un véritable défi, tant les différents secteurs utilisent les termes « certification » et « certificat » dans des sens différents. Cela aboutit à inclure sous le chapeau « certification » d'une part les certificats officiels signés, comme par exemple un certificat sanitaire à l'exportation ou un certificat aux échanges entre États membres d'animaux vivants et, d'autre part, les attestations officielles qui peuvent être éditées par le professionnel, comme c'est le cas dans le secteur des semences et plants, après autorisation expresse des autorités de contrôle.

### Laboratoires et centres de références

L'activité de référence n'est pas limitée aux analyses de laboratoire et les nouvelles dispositions (Articles 91 à 97) permettent à la CE de désigner des centres de référence de l'UE dans le secteur du matériel de reproduction des végétaux et en matière de protection animale.

Les laboratoires de référence de l'Union européenne (LRUE) sont bien évidemment maintenus. Les conditions de désignation des LRUE restent globalement inchangées.

Les missions des LRUE sont clarifiées et étendues, bien articulées avec celles des laboratoires nationaux de référence (LNR) désignés par chaque État membre. Principale mission : améliorer et harmoniser les méthodes d'analyse, d'essai ou de diagnostic, ainsi que contribuer à la qualité et l'uniformité des données analytiques générées. Cette mission n'est pas aussi explicitement définie dans le règlement et le texte prévu conforte l'une des missions essentielles d'un LRUE. D'autres missions sont ajoutées : (i) collaborer avec l'EFSA et l'ECDC, (ii) apporter un soutien actif au diagnostic des foyers de maladies d'origine alimentaire, zoonotique ou animale ou d'organismes nuisibles aux végétaux, en recevant les agents pathogènes pour confirmation, caractérisation et études taxonomiques ou épizootiques, (iii) établir et maintenir des collections de

3. Les numéros des articles sont ceux du document provisoire de décembre 2013 mais pourront changer dans la version définitive.



## Focus

référence d'agents pathogènes ou d'organismes nuisibles aux végétaux, lorsque cela est pertinent dans leur domaine de compétence.

Les LRUE devront publier la liste des LNR.

Compte-tenu de l'élargissement du champ du règlement, c'est le domaine de la santé des végétaux qui bénéficiera du dispositif LRUE-LNR dans l'ensemble de UE, déjà en place dans le secteur alimentaire et de la santé animale.

En ce qui concerne les LNR (Articles 98 à 99), les conditions de leur désignation et leurs missions sont globalement maintenues, avec quelques précisions apportées.

### Points généraux incombant aux autorités compétentes

La proposition de texte clarifie les relations entre les autorités compétentes des différents États membres et avec la CE, dans le but d'améliorer le respect de la réglementation. Ce dispositif d'échanges d'information et de coopération vient en complément des procédures d'urgence, telles que celles prévues par exemple dans le cadre du RASFF (Rapid Alert System for Feed and Food).

La préparation d'un plan de contrôle national pluriannuel et de son rapport annuel est maintenue. À noter cependant une nouveauté : la CE prévoit la possibilité de déterminer, par acte délégué, des critères de catégorisation des risques selon les activités des opérateurs, des priorités de contrôle et des indicateurs de performance que les États membres devront intégrer dans leur programmation des contrôles. Des plans d'urgence concernant les denrées alimentaires et l'alimentation animale doivent être établis. En santé animale et santé des végétaux, ces plans d'urgence sont du ressort de la réglementation sectorielle.

Un chapitre particulier est dédié aux mesures dites coercitives et aux sanctions que doivent mettre en œuvre les autorités compétentes.

### La Commission garde son rôle important en mettant en œuvre plusieurs activités

Les contrôles de la CE sont maintenus dans le but principal de vérifier la mise en œuvre du système de contrôle par les autorités compétentes dans les États membres. Ces contrôles concernent aussi les pays tiers dans le contexte du dispositif encadrant les conditions d'entrée des animaux et des « biens » couverts par le texte, dans l'UE.

Le programme européen de formation des agents des autorités compétentes (connu sous la dénomination Better Training for Safer Food – BTSF) est élargi à l'ensemble du champ du règlement.

Un système général de gestion de l'information est prévu, englobant le système d'information actuel « TRACES » portant actuellement sur l'importation et les échanges et permettant la transmission de données à la CE.

### Une entrée en application échelonnée

L'entrée en application du nouveau règlement sera échelonnée de un à trois ou cinq ans après l'entrée en vigueur de la version votée par le législateur et elle sera coordonnée avec l'entrée en application des trois autres textes sectoriels.

### La procédure législative

Le Parlement et le Conseil des ministres de l'UE ont débuté l'examen du texte ainsi que celle des trois autres propositions dès la fin du premier semestre 2013. L'ensemble de ce « paquet législatif » doit rester cohérent et il faut s'attendre à un temps de travail de plusieurs mois. Les positions françaises sont préparées par l'ensemble des services concernés, coordonnées par le Secrétariat général aux affaires européennes.

### Conclusion

La proposition de règlement « contrôles officiels et autres activités officielles » de la CE reprend la majorité des principes du règlement (CE) n° 882/2004 pour ce qui est de l'organisation « technique » des contrôles, dans une perspective d'harmonisation entre secteurs. Le dispositif harmonisé de contrôles à l'importation serait commun à tout type de produits et aux animaux. La place de la référence devrait être renforcée par la création de centres de référence en protection animale et dans le domaine des semences et plants. En ce qui concerne les laboratoires d'analyse, laboratoires de référence de l'Union européenne et laboratoires nationaux de référence, ils poursuivraient leur contribution à la qualité du dispositif, avec des missions précisées et élargies. Le chapitre « financement », par contre modifierait fondamentalement le dispositif actuel.



## Méthodes

### Guide méthodologique pour l'évaluation des risques relatifs à la sécurité et la sûreté biologiques

Sébastien Allix, Stéphanie Etienne, Bruno Garin-Bastuji, Benoît Gassilloud, Isabelle Iteman, Véronique Jestin, Florence Lavissière, Nora Madani, Philippe Marianneau, Elodie Monchatre-Leroy, Franca Rizzo, Elodie Rousset, Sylvie Zini (Sylvie.zini@anses.fr)

Anses, Maisons-Alfort, France.

Les activités de laboratoire mettant en œuvre des micro-organismes pathogènes ou des toxines présentent des risques de dommage potentiellement importants pour l'homme et son environnement. Le Comité de maîtrise des risques biologique en laboratoire (CMRBL) de l'Anses propose une **méthodologie générale d'identification des dangers, d'analyse et d'évaluation des risques liés à l'utilisation des micro-organismes et des toxines (MOT)**, tels que définis par le décret du 30 juin 2010<sup>1</sup> et les règles de bonnes pratiques édictées par l'Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé (ANSM)<sup>2</sup>. Cette méthode est dérivée de la Méthode d'analyse des modes de défaillance et de criticité (AMDEC) et s'appuie sur le modèle proposé par l'ANSM. L'originalité de la méthodologie présentée dans ce guide repose sur la prise en compte des spécificités des laboratoires de référence et de recherche propres à l'Anses. Aussi les questionnaires d'identification des dangers ont-ils été adaptés à ces particularités, de même que les échelles de calcul de risque. De même, ces modes de calcul ont été éprouvés avec différents agents pathogènes mis en œuvre dans les laboratoires de l'Anses puis ajustés, avant d'être définitivement adoptés par le CMRBL.

Le présent guide se compose de quatre parties distinctes :

- Présentation du modèle d'évaluation des risques
- Présentation du micro-organisme ou de la toxine
- Livret 1 : Analyse des risques en sécurité biologique
- Livret 2 : Analyse des risques en sûreté biologique

Le guide méthodologique complet est disponible à l'adresse suivante :

<http://www.ansespro.fr/euroreference/Documents/ER11-GuideMethodologique.pdf>

1. Décret n° 2010-736 du 30 juin 2010 relatif aux micro-organismes et toxines.

2. Arrêté relatif aux règles de bonnes pratiques tendant à garantir la sécurité et la sûreté biologiques mentionnés à l'Art. R.5139-18 du code de la santé publique.



## Méthodes

### Méthode de confirmation moléculaire des souches de *Salmonella* variants monophasiques et immobiles du sérovar Typhimurium

R. Lailler (renaud.lailler@anses.fr), J. Grout, M. Marault, C. Oudart, F. Moury, A. Brisabois  
Université Paris-Est, Unité CEB, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

**Les salmonelles demeurent la première cause de toxi-infections alimentaires collectives confirmées en France. Parmi les 2600 sérovars répertoriés au sein du genre bactérien *Salmonella*, certains sont plus fréquemment isolés en santé humaine, hygiène des aliments et/ou santé animale.**

**Depuis environ cinq ans, des salmonelles dites « variants Typhimurium-like » émergent chez l'Homme et dans de nombreux secteurs de la chaîne alimentaire et filières animales.**

**Cet article présente une méthode de caractérisation moléculaire développée et appliquée depuis 2010, à des fins de surveillance. Elle répond aux besoins permanents d'adaptation des méthodes de laboratoire pour l'application de la réglementation et la mise en œuvre des mesures de gestion face aux dangers microbiologiques que représentent notamment les salmonelles potentiellement présentes dans les aliments.**

#### Résumé

Les laboratoires français de référence, en charge de la surveillance des salmonelles en santé humaine ou dans les secteurs alimentaire et vétérinaire, ont observé depuis 2008 l'émergence de souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, dites « variants monophasiques de Typhimurium ». Ce constat également dressé au niveau européen a conduit l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) à formuler, en 2010, des recommandations pour la caractérisation et la surveillance de ces isolats tout au long de la chaîne alimentaire. La détection de ces variants au sein des filières avicoles réglementées conduit aujourd'hui à appliquer en Europe des mesures de gestion identiques à celles requises pour S. Typhimurium.

La réglementation française est plus exigeante: elle prend en compte deux types de variants monophasiques: S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 et le variant immobile S. 1,4,[5],12:-:-.

Afin de confirmer qu'il s'agit de variants du sérovar Typhimurium, une méthode PCR (réaction de polymérisation en chaîne) multiplexe conventionnelle a été développée. Il est ainsi possible de suivre les tendances évolutives d'isolement de ces variants, tout au long de la chaîne alimentaire.

Le bilan établi à partir du panel de souches, collecté par le réseau *Salmonella* sur la période 2011-2012, a permis de constater l'émergence au sein de plusieurs filières animales des souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, confirmées comme variant monophasique du sérovar Typhimurium.

Cette méthode PCR est complémentaire à la méthode de sérotypage conventionnel par agglutination sur plaque, elle permet de confirmer rapidement l'identité de ces variants. Elle constitue également un outil précieux pour préciser la situation épidémiologique, suivre les tendances liées à l'isolement de la souche, évaluer les risques et adapter les mesures de gestion dans les différentes filières.

#### Contexte

À l'échelle internationale, les données de surveillance des dernières années mettent en évidence une augmentation importante de l'occurrence de souches dont la formule

antigénique (S. 1,4,[5],12:i:-) est très proche de celles de *Salmonella* Typhimurium (S. 1,4,[5],12:i:1,2) (EFSA, 2010; Anses, 2013; Mulvey, 2013). Ces souches correspondent à des variants flagellaires du sérovar Typhimurium, dits monophasiques du fait de l'absence d'expression de la seconde phase flagellaire, codée par le gène *fljB*. Les souches ayant perdu l'expression antigénique de la première phase flagellaire ou des deux phases (respectivement S. 1,4,[5],12:-:1,2 et S. 1,4,[5],12:-:-) sont également détectées mais de manière beaucoup moins fréquente (EFSA, 2010; Anses, 2013; Mulvey, 2013).

Considérant, d'une part l'émergence des souches de variants monophasiques de S. Typhimurium au niveau européen et d'autre part, le risque qu'elles représentent pour la santé publique, jugé comparable aux souches de sérovar Typhimurium, l'EFSA a recommandé un sérotypage complet de toutes les souches suspectées être des salmonelles, suivi d'une confirmation par PCR de l'absence du gène *fljB* pour les souches présentant la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:- (EFSA, 2010).

En France, compte tenu de la survenue de plusieurs toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à des souches de *Salmonella* nommées « variants du sérovar Typhimurium », le champ d'application des arrêtés ministériels a été étendu au-delà de la réglementation européenne, en considérant les trois variants flagellaires existants du sérovar Typhimurium (S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 et S. 1,4,[5],12:-:-). Ces arrêtés<sup>1</sup> prévoient que les troupeaux contaminés par un variant du sérovar S. Typhimurium soient désormais traités comme des troupeaux positifs pour S. Typhimurium.

Suivant le type d'élevage concerné, ces mesures se traduisent par l'abattage du troupeau contaminé, ou l'envoi des œufs vers des établissements fabriquant des ovoproduits, ou encore le traitement thermique des viandes positives après recherche dans le muscle.

Compte tenu de cette émergence et de la réglementation associée, la direction générale de l'alimentation demande<sup>2</sup> depuis 2010 aux laboratoires vétérinaires et agro-alimentaires d'analyses de première intention, pour tout isolement d'un variant antigénique présentant l'une des trois formules antigéniques

1. Les deux arrêtés du 26 février 2008 relatifs à la lutte contre les infections à *Salmonella* (en filière ponte et en filière chair); L'arrêté du 4 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de dindes de reproduction; L'arrêté du 22 décembre 2009 relatif à la lutte contre les infections à *Salmonella* dans les troupeaux de poulets de chair et de dindes d'engraissement.

2. Note de service DGAL/SDSSA/N2010-8059 du 04 mars 2010 modifiant la note de service DGAL/SDSSA/N2010-8026 du 27 janvier 2010.





## Méthodes

précitées, l'envoi sans délai de la souche au réseau *Salmonella* du laboratoire de sécurité des aliments (LSAL), accompagné de la fiche de renseignement spécifique du réseau. Le réseau *Salmonella* assure la surveillance après avoir confirmé l'identité de ces souches dites « variants Typhimurium-like », à l'aide d'une méthode interne basée sur des tests moléculaires préalablement définis par l'EFSA et décrit ci-après.

En effet, ces souches suspectées être des variants du sérovar Typhimurium, peuvent cependant, compte tenu de la formule antigénique détectée, être des variants d'autres sérovares moins fréquemment identifiés. C'est ainsi que, pour la formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, il est possible d'identifier 6 sérovares ; pour S. 1,4,[5],12:-:1,2, et S. 1,4,[5],12:-:, 16 et 148 sérovares peuvent être respectivement associés (Anses, 2013).

### Principe de la méthode

La méthode mise en œuvre pour confirmer l'identité des variants du sérovar Typhimurium s'appuie d'une part, sur les recommandations de l'EFSA (2010) qui concerne uniquement la confirmation du variant émergent monophasique S. 1,4,[5],12:i:- et d'autre part, sur les travaux effectués par Bugarel *et al.* (2012). La réglementation française concerne l'ensemble des variants monophasiques et immobiles, par conséquent des marqueurs supplémentaires ont été inclus dans cette méthode pour couvrir l'ensemble des besoins de confirmation des variants.

La méthode, basée sur le principe de la réaction de polymérisation en chaîne (PCR), s'applique après la détection par sérotypage conventionnel d'une souche présentant une des formules antigéniques suivantes, S. 1,4,[5],12:i:-, S. 1,4,[5],12:-:1,2 ou S. 1,4,[5],12:-:. Elle cible l'amplification de quatre gènes par l'intermédiaire de deux PCR multiplexes. La première cible le gène *fliB*, qui code pour la seconde phase flagellaire, ainsi que la région intergénique *fliA-fliB*. La présence d'une séquence *IS200* de 1 000 pb dans cette région est spécifique du sérovar Typhimurium et ses variants, celle-ci n'étant pas détectée chez les autres sérovares pour lesquels l'amplicon correspondant a une taille de 250 pb. La seconde PCR cible le gène *mdh*, marqueur du sérovar Typhimurium ainsi que le gène *fliC*, qui code pour la première phase flagellaire. Les séquences des amorces utilisées pour la recherche de ces marqueurs sont listées dans le **tableau 1**.

### Procédure

La méthode moléculaire décrite dans cet article est mise en œuvre à partir d'une culture pure de souche de salmonelle dont la formule antigénique a été déterminée par sérotypage par la méthode d'agglutination sur plaque. Cette méthode conventionnelle de sérotypage repose sur l'utilisation de sérums spécifiques dirigés vers les antigènes de parois (« O ») ou de flagelles (« H ») (Danan, 2009).

Les différentes étapes de la méthode moléculaire de confirmation des « variants » sont :

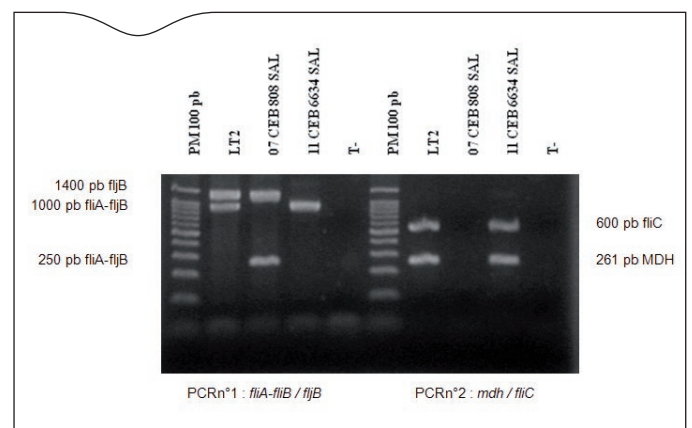
- la mise en culture des souches sur gélose TSAYE, 18 - 24h à 37°C ;
- l'extraction de l'ADN à partir de colonies isolées sur gélose TSAYE (utilisation d'un kit commercial) ;
- la mesure de la concentration de l'extrait d'ADN par utilisation d'un spectrophotomètre à 260 nm ;
- la dilution de l'extrait pour ajuster sa concentration à 50 - 100 ng/μl ;
- la réalisation des deux PCR multiplexes (*fliA-fliB* + *fliB* et *mdh* + *fliC*) selon les modalités présentées dans le **tableau 2** ;

- la migration des produits d'amplification sur gel d'agarose à 2 % ;
- la révélation par fluorescence sous lampe UV des amplicons marqués au BET ;
- la lecture du gel (**figure 1**) et l'interprétation des résultats.

Cette méthode moléculaire nécessite l'utilisation de souches témoins : la souche de référence *Salmonella* Typhimurium LT2 (témoin positif) et une souche de *Salmonella* Brandenburg (souche terrain et témoin négatif). Un témoin négatif sans ADN est également réalisé à chaque expérience.

**Tableau 1 : séquences des amorces PCR utilisées.**

Gènes ciblés	Fonction	Nom des amorces	Séquences (5'-3')	Références
<i>mdh</i>	Malate deshydrogénase	MDH F MDH R	TGCCAACGGAAGTTGAAGTG CGCATTCACCACGCCCTTC	[Amavisit, 2005]
<i>fliC</i>	Antigène flagellaire de phase 1	Anti-sens-i Sens-60	ATAGCCATCTTACCAGTTCC ACTCAGGCTTCCCGTAACGC	[Herrera-Leon, 2004] [Bugarel, 2012]
<i>fliB</i>	Antigène flagellaire de phase 2	Sens-59 Anti-sens-83	CAACAACAACCTGCAGCGTGTGCG GCCATATTCAGCCTCTCGCCCG	[EFSA, 2010]
<i>fliA-fliB</i>	Région inter-génique, de taille variable selon qu'elle héberge ou pas une séquence d'insertion <i>IS200</i>	FFLIB RFLIA	CTGGCGACGATCTGTCGATG GCGGTATACAGTGAATTCAC	[EFSA, 2010]



**Figure 1 : illustration de résultats d'amplification obtenus pour la confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium.**  
[PM100pb: marqueur de poids moléculaires; LT2: sérovar Typhimurium; 07CEB808SAL: S. Brandenburg; 11CEB6634SAL: Variant monophasique S. 1,4,[5],12:i:- du sérovar Typhimurium; T-: témoin négatif sans ADN]



## Méthodes

**Tableau 2: description des conditions de réalisation des deux PCR multiplexes (*fliA-fliB* + *fliJ* et *mdh* + *fliC*).**

PCR 1 Préparation du Mix		PCR 2 Préparation du Mix	
Tampon sans MgCl2	1 X	Tampon sans MgCl2	1 X
MgCl2	2 mM	MgCl2	2 mM
dNTPs	0,2 mM	dNTPs	0,2 mM
Amorce : anti-sens 83	0,8 µM	Amorce MDH-F	0,4 µM
Amorce : sens 59	0,8 µM	Amorce MDH-R	0,4 µM
Amorce FFLIB	0,4 µM	Amorce anti-sens I	0,4 µM
Amorce RFLIA	0,4 µM	Amorce sens-60	0,4 µM
Taq polymérase	1 unité	Taq polymérase	1 unité
Volume total de réaction PCR 25 µl (24 µl ou 23 µl de mix réactionnel/ tube + 1 µl d'ADN à une concentration de 100 ng/µl ou 2 µl d'ADN à 50 ng/µl)			
Conditions d'amplification		Conditions d'amplification	
3 min	94°C	3 min	94°C
35 cycles :		35 cycles :	
30 sec	94°C	30 sec	94°C
40 sec	64°C	40 sec	58°C
1 min 30 sec	72°C	1 min 30 sec	72°C
7 min	72°C	7 min	72°C

**Tableau 3: interprétation des résultats obtenus par la méthode de confirmation des souches de *Salmonella*, variants du sérovar Typhimurium.**

[+ : détection de l'amplicon spécifique du marqueur présentant la taille attendue; - : absence de détection de l'amplicon spécifique du marqueur; pb: paires de bases d'ADN]

Sérovar par agglutination	Marqueurs ciblés				Interprétation
	<i>fliC</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliJ</i>	<i>mdh</i>	
S. 1,4,[5],12:i:-	+	1 000 pb	-	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit « incohérent »
	+	250 pb	-	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:-:1,2	-	1 000 pb	+	+	Variant monophasique confirmé de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant monophasique de Typhimurium dit « incohérent »
	-	250 pb	+	-	Variant monophasique d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:-:-	-	1 000 pb	-	+	Variant immobile de Typhimurium
	+	1 000 pb	+	+	Variant immobile de Typhimurium dit « incohérent »
	-	250 pb	-	-	Variant immobile d'un autre sérovar que Typhimurium
S. 1,4,[5],12:i:1,2	+	1 000 pb	+	+	Typhimurium

### Expression des résultats

L'interprétation des résultats s'effectue selon des règles prédéfinies présentées dans le **tableau 3**. La souche est considérée comme un variant immobile ou monophasique selon que les amplicons correspondant aux gènes *fliC* et/ou *fliJ* sont absents.

Un variant du sérovar Typhimurium est confirmé si les amplicons correspondant au gène *mdh* et à la région intergénique *fliA-fliB* sont détectés et que ce dernier présente la taille attendu de 1 000 pb.

Un variant d'un sérovar autre que Typhimurium est confirmé si les amplicons correspondant au gène *mdh* est absent et que celui de la région intergénique *fliA-fliB* présente une taille de 250 pb.

Il est fait mention de variant « incohérent » (dit « inconsistant » en anglais) d'après Hopkins *et al.* (2010) pour les variants S. 1,4,[5],12:i:-, terminologie extrapolable aux deux autres formules antigéniques, si les gènes codant pour les phases flagellaires (*fliC* et *fliJ*) sont détectés mais non exprimés (non détection des antigènes par la méthode conventionnelle de sérotypage par agglutination).

### Synthèse des résultats utilisant la méthode de confirmation

Durant la période de 2011 à 2012, un total de 703 souches « *Salmonella* Typhimurium-like » d'origine variée (**tableau 4**) ont été analysées par cette méthode (Lailier, 2013). Au sein de ce panel, 690 souches présentaient une formule antigénique S. 1,4,[5],12:i:-, parmi lesquelles 650 souches (94,2 %) ont été identifiées comme variant monophasique du sérovar Typhimurium, 38 souches comme « variant incohérent » par la présence du gène *fliJ* et seulement deux souches comme étant des variant monophasique d'autres sérovares que Typhimurium (**tableau 5**).

L'analyse des huit souches de formule antigénique S. 1,4,[5],12:-:1,2 a montré la présence du gène *fliC* et a confirmé leur statut de variant monophasique du sérovar Typhimurium.

Parmi les cinq souches immobiles de formule antigénique S. 1,4,[5],12:-:-, une seule souche a été confirmée comme variant monophasique, les autres étant des souches variants d'autres sérovares.

**Tableau 4: distribution de l'origine des 703 souches «*Salmonella* Typhimurium-like» collectées en 2011 et 2012, par le réseau *Salmonella* animé par le laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort (Anses).**

Sérovares	S. 1,4,[5],12:i:-	S. 1,4,[5],12:-:1,2	S. 1,4,[5],12:-:-
Alimentation animale	23	/	2
Ecosystème	27	4	1
Santé et production animales... <i>incluant</i>	233	4	2
<i>bovins</i>	48		
<i>volailles</i>	160	4	1
<i>porcins</i>	13		
Aliments... <i>incluant</i>	407	/	/
<i>viandes de bœuf</i>	39		
<i>viandes de volaille</i>	13		
<i>viandes de porc</i>	133		
<b>Total</b>	<b>690</b>	<b>8</b>	<b>5</b>



## Méthodes

**Tableau 5: résultats obtenus par PCR multiplexe sur le panel de souches collectées en 2011 (n=312) et 2012 (n=391), par le réseau *Salmonella* animé par le laboratoire de sécurité des aliments (Anses).**

marqueurs \ sérovar				S. 1,4,[5],12:i:-	S. 1,4,[5],12:-1,2	S. 1,4,[5],12:-:-
<i>fliC</i>	<i>fliA-fliB</i>	<i>fliB</i>	<i>mdh</i>			
+	1 000 bp	-	+	650	/	1
+	1 000 bp	+	+	38	8	/
+	250 bp	-	-	2	/	4
<b>Total</b>				<b>690</b>	<b>8</b>	<b>5</b>

### Discussion/Conclusion

La méthode de confirmation des variants monophasiques et immobiles présentée est une méthode qualitative basée sur l'absence/présence de l'amplicon de taille attendue, détecté par PCR en multiplexe pour génotypage, tel que décrit dans le chapitre 8 de la norme U47-600-2.

Cette méthode s'appuie d'une part sur le protocole recommandé par l'EFSA et d'autre part sur les travaux menés par Bugarel et collaborateurs (2012). Dans le cadre de ces travaux, trois marqueurs différents, connus pour être spécifiques du sérovar Typhimurium, ont été testés sur un panel de souches connues, appartenant au sérovar Typhimurium ou variant confirmé de *S. Typhimurium*.

Il s'agit de la séquence intergénique *fliA-fliB* proposée dans les recommandations de l'EFSA et du gène *mdh*. Le gène *mdh* a été détecté systématiquement dans toutes les souches de sérovar Typhimurium et variants. Ce même marqueur, réputé pour être présent dans de nombreuses souches de *Salmonella*, a également été recherché parmi une collection de 937 souches de sérovaires variés (plus de 230 sérovaires différents) permettant ainsi de mesurer sa spécificité extrinsèque; aucune réaction croisée n'a été détectée, hormis pour une souche de sérovar Kibusi (S. 28:r:e,n,x) et une autre de sérovar Newmexico (S. 9,12:g,z51:1,5) (Bugarel, 2012). Ces deux sérovaires n'appartiennent pas au groupe « O:4 » dans lequel se trouve Typhimurium et ses variants.

L'introduction du gène *mdh* dans le panel des marqueurs recherchés permet donc d'exclure tout faux positif et tout faux négatif (100 % de détection sur les souches attendues être positives).

Comme le recommande l'EFSA dans son avis (EFSA, 2010), la confirmation de l'identité de ces souches dites « *Salmonella Typhimurium-like* », par une caractérisation précise et complète, est importante à mettre en œuvre dans une démarche de surveillance. Des bilans réguliers permettront de juger de l'adéquation des mesures réglementaires avec les objectifs de santé publique poursuivis en France et en Europe.

Concernant les variants dits « incohérents » (*fliB+*, *fliC+*, *fliA-fliB+* à 1 000 pb et *mdh+*), ces souches possèdent tout l'équipement génétique pour être identifié comme appartenant au sérovar Typhimurium. En considérant uniquement les résultats des tests PCR mis en œuvre, ces souches sont non distinguables des souches *S. Typhimurium*. Seule la caractérisation par le sérotypage conventionnel peut mettre

en évidence l'absence d'expression de l'une ou des deux phases flagellaires. Cette absence d'expression pourrait par ailleurs être réversible (Soyer, 2009). La mise en évidence de ces souches « incohérentes » par la méthode décrite pourrait avoir un intérêt dans la détection de nouveaux gènes impliqués dans le mécanisme d'inversion de phase flagellaire.

La méthode décrite ci-dessus ne permet pas d'identifier complètement les variants des autres sérovaires. Des méthodes complémentaires de géno-sérotypage permettraient de palier cette limite. Une des méthodes actuellement disponibles, permettant ce sérotypage moléculaire, a été utilisée partiellement pour compléter la confirmation moléculaire de la méthode ici décrite. Elle a parfois permis d'identifier d'autres sérovaires tels que *S. Coeln* et *S. Schwarzengrund*, dont étaient issus les variants monophasiques et immobiles de l'étude réalisées en 2011-2012. Cependant, cette approche de géno-sérotypage est encore expérimentale et nécessite d'être validée plus globalement.

Dans le cadre de la surveillance menées par les laboratoires, il est pertinent de réaliser une évaluation régulière de la situation épidémiologique en matière de salmonelles afin d'adapter le suivi, et le cas échéant les mesures de gestion dans les différentes filières à l'évolution des sérovaires (notamment émergents comme Kentucky récemment) et des profils d'antibiorésistance.

### Références bibliographiques

Amavisit P., Boonyawiwat W., Bangtrakulnont A. (2005). Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and monophasic *Salmonella* serovar 1,4,[5],12:i:- isolates in Thailand. *J. Clin. Microbiol.* 43:2736-2740.

ANSES, Agence nationale de sécurité sanitaire (2013). Avis de la saisine n° 2012-SA-0214, relatif à l'identification des variants de *Salmonella Typhimurium* et leur prise en compte dans le programme officiel de lutte en élevage avicole.

EFSA-ECDC, European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control (2013). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011; *EFSA Journal* 2013; 11(4):3129 [250 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2013.3129. www.efsa.europa.eu/efsajournal

EFSA, European Food Safety Authority (2010). Scientific Opinion on monitoring and assessment of the public health risk of "*Salmonella Typhimurium-like*" strains. *EFSA Journal*, 8(10), p.1826. http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1826.pdf

Bugarel M., Vignaud M.L., Moury F., Fach P., Brisabois A. (2012). Molecular identification in monophasic and nonmotile variants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology Open*. doi:10.1002/mbo3.3

Danan C., Frey S., Moury F., Bohnert M.L., Brisabois A. (2009). Détermination du sérovar de souches de *Salmonella* isolées dans le secteur vétérinaire par la méthode d'agglutination rapide sur lame. *EuroReference*, No.2, CR2-09M01. http://www.afssa.fr/euroreference/Documents/CR2-Meth-SeroSalmo.pdf

Hamelin E., Pinson M., Bohnert M. Bulletin épidémiologique, santé animale et alimentation N°54 Spécial MRE – Bilan 2011/novembre 2012, p. 54-59, http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/BEP-mg-BE54\_cle45f8\*c.pdf

Herrera-Leon S., McQuiston J.R., Usera M.A., Fields P.I., Garaizar J., Echeita M.A. (2004). Multiplex PCR for distinguishing the most common phase-1 flagellar antigens of *Salmonella* spp. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2581-2586.

Hopkins, K. L., M. Kirchner, B. Guerra, S. A. Granier, C. Lucarelli, M. C. Porrero, et al. (2010). Multiresistant *Salmonella enterica* serovar 4,[5],12:i:- in Europe: a new pandemic strain? *Euro. Surveill.* 15:19580.

Lailler R., Moury F., Granier S.A., Brisabois A. (2012). The *Salmonella* Network, a tool for monitoring *Salmonella* "from farm to fork".



## Méthodes

Euroreference, n°8, hiver 2012. <http://www.anses.fr/euroreference/Documents/ER08-Reseaux-SalmonellaEN.pdf>

Lailler R., Moury F., Grout J., Laporte C., Morel V., Oudart C., Piquet C., Brisabois A. (2013). Monitoring of monophasic and non-motile variants of serotype Typhimurium among non-human strains collected by the French *Salmonella* Network, International Symposium "Salmonella and salmonellosis", I3S, 27-29 may 2013, Saint-Malo.

Mulvey M.R., Finley R., Allen V., Ang L., Bekal S., El Bailey S., Haldane D., Hoang L., Horsman G., Louie M., Robberts L., Wylie J., McCracken M., Langner S., Ahmed R., Tabor H., Gilmour M. (2013). Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype 4,[5],12:i:- involving human cases in Canada: result from the Canadian Integrated Program on Antimicrobial Resistance Surveillance (CIPARS), 2003-10, J. Antimicrob. Chemother. 68: 1982-1986.

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. <http://agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/DGALN20108059Z.pdf>

Soyer Y., Moreno Switt A., Davis A.M., Maurer J., McDonough P.L., Schoonmaker-Bopp D.J., Dumas N.B., Root T., Warnick L.D., Gröhn Y.T., Wiedmann M. (2009). *Salmonella enterica* serotype 4,5,12:i:-, an emerging *Salmonella* serotype that represents multiple distinct clones. J. Clin. Microbiol. 47(11):3546-3556.



## Méthodes

### Dosage des résidus de néonicotinoïdes dans le nectar par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS)

Anne-Claire Martel (anne-claire.martel@anses.fr), Patrick Mangoni, Cristina Gastaldi-Thiery  
Anses, Laboratoire de Sophia-Antipolis (France)

**Le nectar est un liquide sucré produit par les nectaires des plantes. Il constitue l'aliment énergétique essentiel de l'abeille. Ces plantes mellifères visitées par les pollinisateurs peuvent contenir des résidus de pesticides suite à des traitements phytosanitaires ou à la contamination de l'environnement (sol, eau, air). Les abeilles peuvent alors entrer en contact avec ces résidus par l'intermédiaire du nectar contaminé qu'elles ramènent dans la colonie. Ainsi, le laboratoire a mis au point une méthode de dosage des résidus de néonicotinoïdes dans le nectar afin de rechercher une éventuelle implication de ces insecticides dans les cas d'affaiblissements de colonies d'abeilles.**

#### Principe de la méthode

Les pesticides recherchés (imidaclopride, clothianidine, acétamipride, thiaclopride, thiaméthoxam et dinotéfuran) appartiennent à la famille des néonicotinoïdes (**Figure 1**) et sont des substances chimiques utilisées en agriculture (**Tableau 1**) soit pour l'enrobage des semences soit par pulvérisation foliaire sur les cultures. Ce sont des molécules systémiques qui peuvent se retrouver dans les plantes et les divers compartiments de l'environnement. À noter que ces substances sont suffisamment rémanentes dans les sols (Goulson, 2013) pour que les plantes cultivées l'année suivante et même non traitées, ainsi que les adventices, les assimilent. Ainsi, le nectar sécrété par les plantes peut être un bon indicateur de leur contamination par ces résidus (Dively et Kamel, 2012; Stoner et Eitzer, 2012) et

en même temps, constitue un des principaux vecteurs pour la contamination des butineuses et de leur colonie. Quand la butineuse est de retour à la ruche, elle régurgite dans les alvéoles, le nectar de son jabot. Une abeille pourrait transporter dans son jabot jusqu'à 75 mg de nectar.

Sur le plan analytique, le nectar constitue une matrice composée principalement d'eau et de sucres (fructose, glucose et, en bien moindre quantité, des sucres complexes tel que le saccharose). La teneur en eau du nectar varie considérablement, de 20 à 95 % selon les espèces végétales nectarifères et les facteurs environnementaux, notamment météorologiques (humidité de l'air, température...). La composition en sucres varie aussi selon les espèces végétales (Nicolson et Thornburg, 2007). Elle est relativement fixe pour une espèce donnée ou même pour une famille donnée. On distingue, selon la nature des sucres et leurs proportions, les plantes à nectar dont le saccharose est dominant, celles où le saccharose est en quantité égale à celle du glucose et du fructose (trèfle blanc) et celles où le glucose et le fructose sont dominants (colza) (Kevan et Shuel, 1991). Le rapport entre le glucose et le fructose est aussi généralement fixe pour une espèce. Par exemple, pour le colza, la teneur en glucose est supérieure au fructose et peut provoquer la cristallisation rapide.

La méthode de dosage de ces six insecticides toxiques pour l'abeille (**Tableau 2**) repose sur une extraction par dissolution. L'échantillon de nectar obtenu est dilué dans l'eau ultra pure afin d'être injecté et analysé en chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-ESI-MS/MS). Cette méthode d'analyse multirésidus permet de quantifier et d'identifier les résidus de néonicotinoïdes dans la matrice « nectar ». La limite de quantification (LQ) est de 0,3 pg/µl pour tous les pesticides sauf pour le dinotéfuran dont la LQ est de 0,6 pg/µl.

#### Appareillage et réactifs

L'appareillage spécifique consiste en (1) une propipette pour extraire les échantillons de nectar des micro-capillaires; (2) une centrifugeuse (Centrifuge 5810R, Eppendorf); (3) un chromatographe en phase liquide (HPLC) avec un injecteur automatique et un compartiment colonne thermostatés (UltiMate 3000, Thermo Scientific) couplé à un spectromètre de masse triple quadripôle (TSQ Vantage, Thermo Scientific) équipé d'une sonde HESI-II (Heated Electrospray Ionization Source).

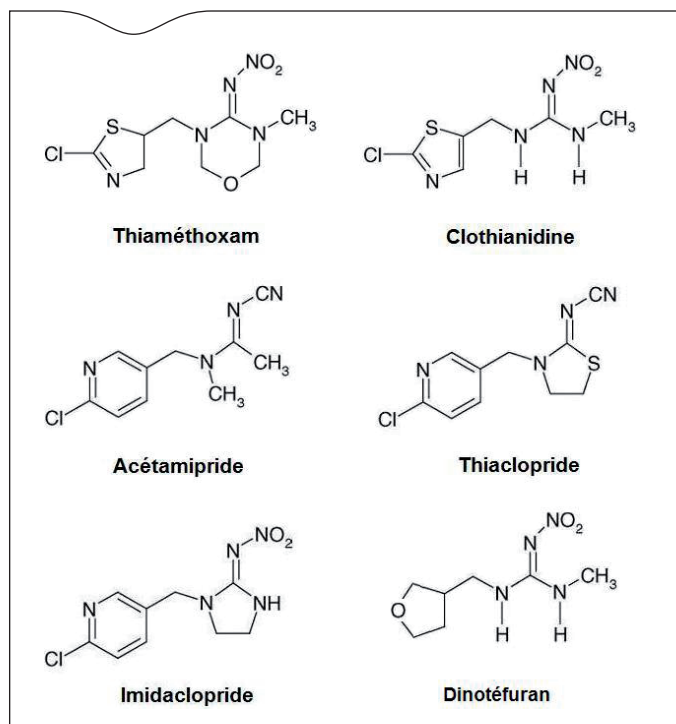


Figure 1: Formules des pesticides étudiés.



## Méthodes

Tableau 1: Les usages des néonicotinoïdes en agriculture (Agritox, 2013; Index phytosanitaire, 2013; Mitsui Chemicals America, 2013)

Pesticide	Solubilité dans l'eau (g/l)	Type d'application	Cultures traitées	Noms commerciaux
Imidaclopride*	0,613	Traitement des semences, plants	Betterave, avoine, blé, orge, seigle	Ferial Gaucho 350 Imprimo Nuprid 70
		Traitement des parties aériennes	Abricotier, pêcher, prunier, rosier, conifères de forêt	Confidor Merit Forest Nuprid 200
Clothianidine*	0,304	Traitement des parties aériennes	Mais, sorgho, pommier	Cheyenne Dantop 50 WG
Acétamipride	2,95	Traitement des parties aériennes	Arbres fruitiers ( <i>abricotier, agrumes, cerisier, figuier, pêcher, poirier, pommier, prunier</i> ), grandes cultures ( <i>pomme de terre, crucifères oléagineuses, avoine, blé</i> ), cultures légumières ( <i>asperge, aubergine, choux, concombre, courgette, laitue, persil, poivron, tomate, betterave</i> ), rosier, cultures florales diverses, cultures porte-graine	Suprême Suprême 20SG Polysect Ultra
Thiaclopride	0,186	Traitement des parties aériennes	Arbres fruitiers ( <i>abricotier, groseillier, amandier, cassissier, cerisier, châtaignier, figuier, framboisier et autres rubus, noisetier, noyer, olivier, pêcher, poirier, pommier, prunier</i> ), grandes cultures ( <i>colza, moutarde, pomme de terre</i> ), cultures porte-graine	Biscaya Calypso Ecaïl Proteus
		Traitement des sols	Arbres et arbustes d'ornement, cultures florales diverses	Exemptor
Thiaméthoxam*	4,1	Traitement des semences, plants	Betterave, maïs, pois	Cruiser 350 Cruiser FS Cruiser SB
		Traitement des parties aériennes	Pomme de terre, pommier, aubergine, concombre, laitue, piment, poivron, tomate, arbres et arbustes d'ornement, chrysanthème, cultures florales diverses, rosier, toutes espèces florales (sous serres)	Actara Flagship Pro
		Traitement des sols	Arbres et arbustes d'ornement, cultures florales diverses (sous serres), rosier (sous serres)	Flagship Pro
Dinotéfuran**	39,83	Traitement des parties aériennes	Riz, choux, laitue, poivron, tomate, concombre, melon, céleri, agrumes, pommier, pêcher, pomme de terre, coton	Safari 20SG Safari 2G

\* L'Union européenne a annoncé en avril 2013 qu'elle suspendra pour deux ans, à compter du 1<sup>er</sup> décembre, l'utilisation de l'imidaclopride, de la clothianidine et du thiaméthoxam sur quatre grandes cultures (maïs, colza, tournesol et coton).

\*\* Le dinotéfuran est interdit en Europe sur toutes cultures.

Tableau 2: Toxicité des pesticides étudiés vis-à-vis des abeilles (Agritox, 2013, EPA, 2004)

Pesticide	DL <sub>50</sub> (contact)	DL <sub>50</sub> (orale)
Imidaclopride	81 ng/abeille	3,7 ng/abeille
Clothianidine	44,26 ng/abeille	3,79 ng/abeille
Acétamipride	8,09 µg/abeille	14,53 µg/abeille
Thiaclopride	38,82 µg/abeille	17,32 µg/abeille
Thiaméthoxam	24 ng/abeille	5 ng/abeille
Dinotéfuran	47 ng/abeille	23 ng/abeille

Pour l'analyse en LC-MS/MS, le méthanol de qualité LC-MS et l'acide formique (98 %) sont utilisés. Les étalons sont préparés à partir des matières actives certifiées commandées chez CIL Cluzeau Info Labo: imidaclopride (98 % de pureté), clothianidine (99,5 %), acétamipride (99 %), thiaclopride (99,5 %), thiaméthoxam (99 %) et dinotéfuran (99 %). La solution certifiée de diméthoate-D6 (99,8 % de pureté, 100 mg/l dans l'acétone) provient également de CIL Cluzeau Info Labo.

### Mode opératoire

#### 1. Extraction

L'échantillon de nectar est extrait de la fleur par capillarité à l'aide d'un micro-capillaire (5 µl). Ce prélèvement est extrait du micro-capillaire en laboratoire à l'aide d'une propipette. Dans un

vial à insert, sont ajoutés l'eau ultra pure, 10 µl d'étalon interne (diméthoate-D6) et 10 µl d'échantillon de nectar. L'échantillon de nectar est ensuite homogénéisé à l'aide d'un vortex puis centrifugé à 500 t/min pendant cinq minutes. Le volume de l'extrait final est de 100 µl.

### 2. Dosage

#### 2.1. Chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC)

La séparation chromatographique est réalisée sur colonne chromatographique Pursuit PFP (pentafluorophenyl) 100 x 3 mm (3 µm) (Agilent). La phase mobile est composée d'eau ultra pure (A) et de méthanol (B), chaque solution étant acidifiée avec 0,02 % d'acide formique. Les insecticides sont séparés à l'aide d'un gradient d'élution dont le programme est le suivant : gradient linéaire de 80 % A (à t=0 min) à 0 % (à t=13 min), puis gradient linéaire de 0 % A (à t=13 min) à 80 % (à t=13,5 min) et palier à 80 % A pendant 4,5 min. La colonne et le passeur d'échantillons sont thermostatés à 25°C, le débit est de 0,4 ml/min et le volume d'injection est de 15 µl.

#### 2.2. Spectrométrie de masse

La source d'ionisation utilisée est l'electrospray en mode positif (HESI-II +). La vanne de dérivation (divert valve) est réglée pour laisser passer la phase mobile dans la source entre 2,50 min et 12 min. L'analyseur de masse est un triple quadripôle et le gaz de collision est de l'argon. Le mode d'acquisition mis en



## Méthodes

œuvre est le mode SRM (Selected Reaction Monitoring). Les transitions ainsi que les temps de rétention (à titre indicatif) sont présentés dans le **tableau 3**.

**Tableau 3: Transitions des pesticides étudiés et temps de rétention (à titre indicatif)**

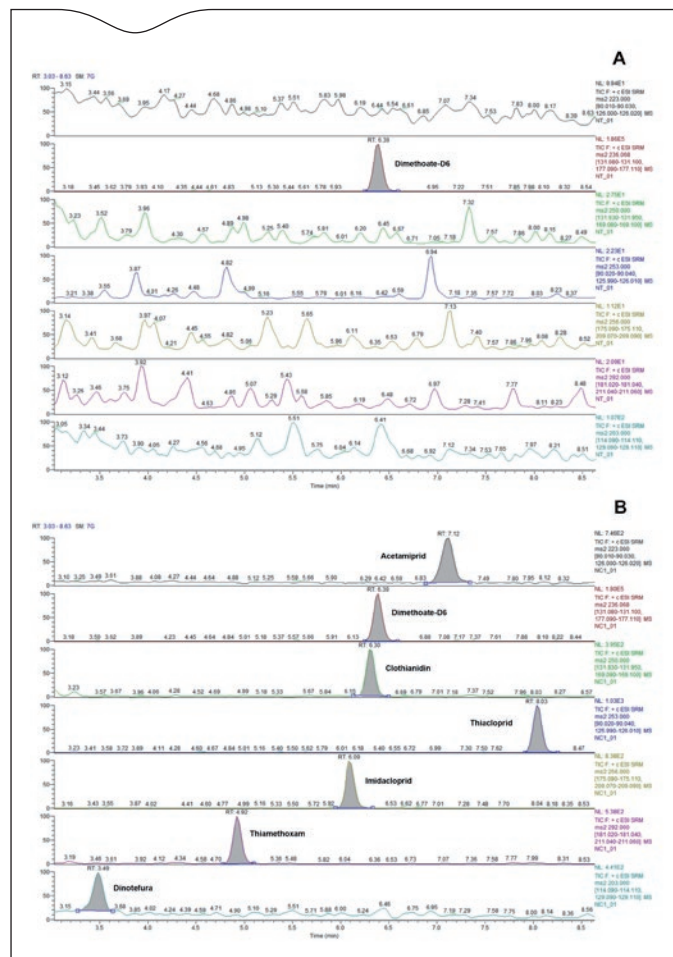
Pesticide	Temps de rétention (min)	Ion précurseur (m/z)	Ions produits (m/z)	Energie de collision (V)	S-Lens
Dinotéfuran	3,49	203,0	114,1 129,1	13 13	43 43
Thiaméthoxam	4,92	292,0	211,0 181,0	13 24	57 57
Imidaclopride	6,09	256,0	209,1 175,1	18 20	65 65
Clothianidine	6,30	250,0	169,1 131,9	15 19	54 54
Diméthoate-D6	6,39	236,0	177,1 131,0	16 22	43 43
Acétamipride	7,12	223,0	126,0 90,0	21 34	53 53
Thiaclopride	8,03	253,0	126,0 90,0	22 39	71 71

### Résultats et conclusion

Pour le dosage, l'étalonnage est effectué à l'aide d'une gamme extraite dans la matrice « nectar » (échantillons témoin et supplémentés). Ne disposant pas toujours de nectar témoin, une solution sucrée représentative d'un nectar est préparée pour cet étalonnage. Cette solution composée à 36 % de sucres (p/v) est préparée en mélangeant 6 g de glucose et 3 g de fructose dans 25 ml d'eau ultra pure. Le domaine de linéarité est défini comme étant le domaine d'étalonnage et a été validé jusqu'à 15 pg/µl pour chaque pesticide.

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont respectivement de 0,1 pg/µl et 0,3 pg/µl pour l'imidaclopride, la clothianidine, le thiaclopride et le thiaméthoxam. La LD et la LQ sont respectivement de 0,2 pg/µl et 0,6 pg/µl pour le dinotéfuran (**Figure 2**).

En l'absence de matériau de référence, la justesse est estimée par le taux de récupération qui est déterminé à l'aide d'un échantillon témoin (blanc matrice) supplémenté avec les



**Figure 2: Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour (A) l'échantillon témoin (solution sucrée à 36 %) et pour (B) l'échantillon chargé à la LQ.**

analytes à doser à trois niveaux de concentration (LQ, 5LQ et 10LQ). Pour chaque niveau de concentration, trois échantillons de solutions sucrées ont été extraits et analysés. Pour caractériser la méthode, cinq séries de trois échantillons ont

**Tableau 4: Données de caractérisation de la méthode (Norme AFNOR V03-110).**

Pesticide	Solution sucrée représentative d'un nectar														
	1 <sup>er</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois)					2 <sup>e</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois)					3 <sup>e</sup> niveau de supplémentation (n=3, répété 5 fois)				
	T (pg/µl)	Rendement moyen (%)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>Fi</sub> (%)	Incertitude (%)	T (pg/µl)	Rendement moyen (%)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>Fi</sub> (%)	Incertitude (%)	T (pg/µl)	Rendement moyen (%)	CV <sub>r</sub> (%)	CV <sub>Fi</sub> (%)	Incertitude (%)
Imidaclopride	0,3	106,7	8,6	12,5	26,6	1,5	95,8	6,6	8,2	17,4	3,0	98,3	4,5	6,6	14,0
Clothianidine	0,3	99,8	7,5	11,5	24,6	1,5	95,2	6,7	8,4	17,7	3,0	97,3	5,1	5,9	12,4
Acétamipride	0,3	106,8	7,3	9,0	18,9	1,5	96,5	6,1	7,0	14,7	3,0	98,7	5,2	6,8	14,5
Thiaclopride	0,3	110,2	6,4	9,2	19,5	1,5	96,6	6,0	7,4	15,6	3,0	99,7	5,2	6,9	14,7
Thiaméthoxam	0,3	98,9	9,4	16,3	35,1	1,5	93,0	7,4	10,4	22,2	3,0	92,6	5,5	9,6	20,7
Dinotéfuran	0,6	105,5	7,4	14,0	30,2	3,0	93,5	6,5	9,7	20,7	6,0	94,7	5,1	7,0	15,0

T: teneur en pesticide, CV<sub>r</sub>: répétabilité, CV<sub>Fi</sub>: fidélité intermédiaire



## Méthodes

été effectuées pour chaque niveau de concentration. Les taux d'extraction moyens obtenus sont satisfaisants car, à la LQ, ils sont compris entre 98,9 % et 110,2 %, compris entre 93,0 % et 96,6 % et entre 92,6 % et 99,7 % pour les échantillons supplémentés à 5LQ et 10LQ respectivement (norme V03-110). La méthode est répétable car le coefficient de variation (CV) est  $\leq 20\%$  pour chaque niveau de concentration. La méthode est également reproductible ( $CVFI \leq 22\%$ ) pour tous les pesticides étudiés (Tableau 4).

Par conséquent, cette méthode permet de quantifier des résidus à très faibles teneurs et peut ainsi être appliquée sur des échantillons de nectar prélevés directement dans les fleurs (Figure 3) ou dans les jabots d'abeilles pour suivre l'exposition des butineuses aux contaminants de l'environnement.

### Remerciements

Nous remercions le Cetiom et l'Inra d'Avignon (UMT PrADE) qui nous ont fourni des nectars de colza.

### Références bibliographiques

AGRITOX, 2013, *Base de données sur les substances actives phytopharmaceutiques*. [consulté en 2013] <http://www.agritox.anses.fr/php/fiches.php>

Index phytosanitaire, 2013. ACTA, 49<sup>e</sup> édition, 984 p.

Mitsui Chemicals America, Inc.: Dinotefuran Field Performance [consulté en 2013] <http://www.mitsuichemicals.com/dinotefuran-field-performance.htm>

Goulson D. 2013. An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4): 977-987.

Dively GP, Kamel A. 2012. Insecticide residues in pollen and nectar of a cucurbit crop and their potential exposure to pollinators. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(18): 4449-56.

Stoner KA, Eitzer BD. 2012. Movement of soil-applied imidacloprid and thiaméthoxam into nectar and pollen of squash (*Cucurbita pepo*), *PLoS ONE*, 7(6): e39114.

Nicolson SW, Thornburg RW. Nectar Chemistry. 2007 [consulté en 2013] [http://www.bb.iastate.edu/~thorn/www/Publications/pdfFiles/12\\_Nectar\\_Chemistry\(Proof\).pdf](http://www.bb.iastate.edu/~thorn/www/Publications/pdfFiles/12_Nectar_Chemistry(Proof).pdf)

Kevan PG, Lee H, Shuel RW. 1991. Sugar ratios in nectars of varieties of canola (*Brassica napus*), *Journal of Apicultural Research*, 30(2): 99-102.

EPA, Pesticide Fact Sheet: Name of Chemical: Dinotefuran - Reason for Issuance: Conditional Registration - Year Issued: September 2004, United States Environmental Protection Agency, Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances (7501C). [consulté en 2013] [http://www.epa.gov/opp00001/chem\\_search/reg\\_actions/registration/fs\\_PC-044312\\_01-Sep-04.pdf](http://www.epa.gov/opp00001/chem_search/reg_actions/registration/fs_PC-044312_01-Sep-04.pdf)

Normalisation française. *Analyse des produits agricoles et alimentaires: protocole de caractérisation en vue de la validation d'une méthode d'analyse quantitative par construction du profil d'exactitude*, Norme Anfor V03-110 (Mai 2010).

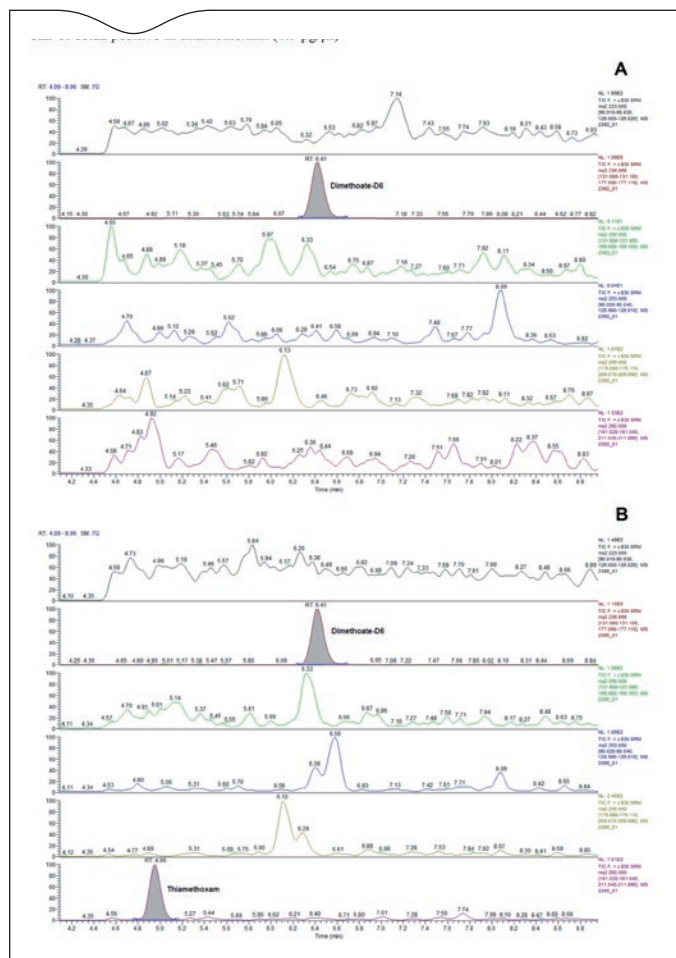


Figure 3: Chromatogrammes obtenus en LC-MS/MS pour (A) un échantillon témoin de nectar de colza et pour (B) un échantillon de nectar de colza positif en thiaméthoxam (0,5 pg/µl).





## Recherche

### Modélisation de la contamination par *Listeria monocytogenes* pour l'amélioration de la surveillance dans les industries agro-alimentaires

Natalie Commeau (natalie.commeau@gmail.com)

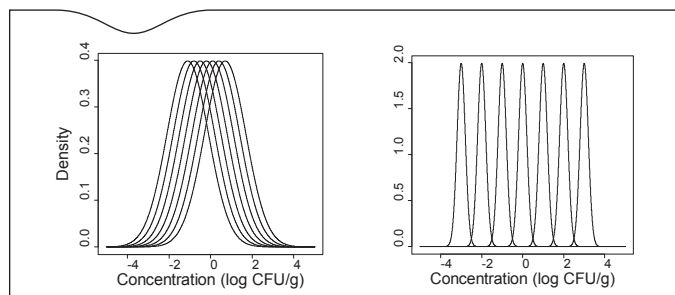
Inra/AgroParisTech, UMR 518 MIA, Paris, France

Anses, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

Les industriels du secteur agro-alimentaire sont responsables de la qualité des produits mis sur le marché. Un moyen de vérifier cette qualité consiste à déterminer la distribution de la contamination. Un outil utile est le plan d'échantillonnage. Nous proposons une approche basée sur la théorie de la décision en sortie usine pour déterminer la taille optimale de l'échantillon à prélever par lot de manière à minimiser le coût moyen supporté par le fabricant. Dans cet article, nous utilisons des données portant sur *L. monocytogenes* durant la fabrication de lardons. Nous avons élaboré des modèles pour décrire la concentration en prenant ou non en compte diverses variabilités, nous avons estimé les paramètres par inférence bayésienne, puis comparé leur capacité à simuler des données proches des observations. Enfin, nous présentons une application de minimisation des coûts moyens de l'entreprise pour le couple *L. monocytogenes*/lardons.

#### Échantillonnage intra- et inter-lots

La connaissance des différentes contaminations par des pathogènes dans une usine est nécessaire à l'industriel afin qu'il puisse mettre en place des actions adaptées pour réduire la contamination. Pour acquérir cette connaissance, des analyses sont nécessaires (par exemple dénombrement ou recherche) sur des produits alimentaires ou sur des surfaces. Comment effectuer les prélèvements à une étape donnée de la production : en tirant au sort dans la production ou en tirant au sort dans des lots ? Cette question n'est pas anodine car, selon le produit fabriqué et le procédé, la variabilité de contamination au sein d'un lot ou entre plusieurs lots peut être très différente. Ainsi, la **figure 1** présente les distributions de contamination au sein de plusieurs lots. La variabilité inter-lots (1a) est bien plus faible que la variabilité intra-lot donc échantillonner en tirant au sort dans la production totale sans se préoccuper d'une appartenance à un lot suffit. En revanche, si les distributions sont celles de la figure 1b, alors l'échantillonnage par lot est déterminant pour savoir si un lot est peu contaminé ou non. La variabilité inter et intra-lot a fait l'objet de publications récentes (ILSI, 2010 ou Gonzales-Barron et Butler, 2011).



**Figure 1: Représentation de la variabilité inter et intra-lots.** Chaque courbe représente la distribution de contamination d'un lot (log ufc/g). Pour la figure 1a (gauche), l'écart-type (e.t.) de la contamination dans un lot est de 1 log ufc/g et l'e.t. inter-lot est de 0,3 log ufc/g/. Pour la figure 1b (droite) l'e.t. inter-lots est égal à 1 log ufc/g et l'e.t. intra-lot est de 0,2 log d'ufc/g.

Avant de poursuivre, définissons le terme de « lot ». C'est un terme fréquemment utilisé dans le langage courant mais pas si simple à définir. D'après le règlement N° 2073/2005 (CE) (article 2), un lot est « un groupe ou une série de produits identifiables obtenus par un procédé donné dans des conditions pratiquement identiques et produits dans un endroit donné et au cours d'une période de production déterminée ». La définition donnée par l'ICMSF (ICMSF, 2002) commence par énoncer que c'est une quantité d'aliments fabriqués et manipulés dans des conditions uniformes, mais elle va plus loin car il est précisé que cette définition implique qu'il y a une homogénéité au sein du lot, par exemple que le logarithme de la concentration suit une loi normale. Cependant, les auteurs remarquent que cette condition d'homogénéité n'est pas toujours vérifiée dans un lot pour la concentration microbienne car celle-ci peut être très hétérogène. Il est donc suggéré d'adapter la taille du lot en fonction du procédé. L'homogénéité est indispensable au statisticien pour qu'il puisse concevoir une distribution décrivant la contamination de la production. Le lot défini par l'industriel repose sur des contraintes de traçabilité et d'organisation.

#### Détermination de la structure de la contamination dans une usine de lardons

Afin de déterminer la structure de la contamination, nous avons effectué des prélèvements de poitrines de porc après malaxage dans une usine fabriquant des lardons nature et non avons analysé la présence et la concentration en *L. monocytogenes*. Le lot a été défini comme l'ensemble des poitrines de porc contenues dans un malaxeur, première étape du procédé de fabrication. Au total, 8 ou 9 poitrines de porc ont été prélevées sur 12 lots différents. Pour chaque poitrine, 100 cm<sup>2</sup> de chair étaient prélevés et analysés pour détection et dénombrement de *L. monocytogenes*. Avec les protocoles utilisés, la limite de détection était de 0.01 UFC/cm<sup>2</sup> (unités formant colonie) et la limite de quantification de 0.2 UFC/cm<sup>2</sup>. Les données brutes (présence ou absence pour la détection, nombre de colonie dénombrées pour le dénombrement) sont présentées au **Tableau 1**.



## Recherche

**Tableau 1: données brutes de détection (0=absence, 1=présence) et de dénombrement (nombre d'UFC comptées sur boîte de Pétri) de *L. monocytogenes* sur les échantillons de 100 cm<sup>2</sup> de poitrine de porc après malaxage, c.a.d. la première étape du processus de production de lardons, durant laquelle les poitrines de porc sont malaxées avec de la saumure pendant plusieurs heures. Le même échantillon était utilisé pour la détection et le dénombrement.**

Nombre de lots	Détection	Dénombrement (UFC)
1	0-1-1-1-0-1-1-1-1	0-0-0-0-0-0-0-0-0
2, 8, 9 & 10	0-0-0-0-0-0-0-0-0	0-0-0-0-0-0-0-0-0
3	0-0-0-0-1-0-0-0-0-1	0-0-0-0-0-1-0-0-0-0
4	0-1-0-0-1-0-0-0-0-0	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0
5	0-0-0-0-0-1-0-0-0-0	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0
6	0-0-0-0-0-0-0-0-0	0-0-0-0-0-0-0-0-0
7	0-0-0-1-1-0-0-0-0-1	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0
11	1-1-1-1-1-1-1-1-1	11-9-6-5-12-29-16-3
12	0-0-1-0-0-0-0-0-0-0	0-0-0-0-0-0-0-0-0-0

Les résultats ont été injectés dans quatre modèles de contaminations :

- avec une structure d'unités et de lots (modèle REF) ;
- avec une structure de lots (modèle B) ;
- avec une structure d'unités (modèle U) ;
- sans structure (modèle NS).

L'unité est ici la poitrine de porc, car nous nous demandons si les variabilités inter et intra-unités existent au même titre que les variabilités inter et intra-lots. L'approche retenue est l'approche bayésienne, qui présente l'avantage d'incorporer de l'information autre que les données dans le modèle. Tous les modèles combinent les distributions binomiales, Poisson et normales. Les modèles NS, B et U sont inclus dans le modèle REF.

Le modèle REF est le suivant : soit  $x_{ijk}$  le résultat de détection (1 si le résultat est positif, 0 s'il est négatif) du lot  $i$ , de la poitrine de porc  $j$  et de la portion test  $k$ , et  $y_{ijkl}$  le résultat de dénombrement du lot  $i$ , de la poitrine de porc  $j$ , de la prise d'essai  $k$  et une fraction  $l$ . Une prise d'essai est l'échantillon de chair sur laquelle les expériences sont réalisées (ici 100 cm<sup>2</sup>). La fraction est le volume de la solution formée par la portion diluée dans le liquide de culture approprié qui est versée sur la boîte de Pétri pour dénombrement de *L. monocytogenes*.

La variable  $x_{ijk}$  suit une distribution binomiale et la variable  $y_{ijkl}$  suit une distribution de Poisson :

$$x_{ijk} \sim \text{Bin}(1, 1 - \exp(-10^{\theta_{ij}} S_k))$$

$$y_{ijkl} \sim P(10^{\theta_{ij}} S_k d_l)$$

où  $\theta_{ij}$  est le logarithme en base 10 de la concentration de *L. monocytogenes* dans une poitrine de porc  $j$  appartenant au lot  $i$ ,  $S_k$  est la surface de la prise d'essai  $k$  et  $d$  est la dilution de la fraction  $l$ . Le logarithme de la concentration  $\theta_{ij}$  suit une distribution normale :

$$z_i \sim N(\mu, \sigma^2)$$

où  $z_i$  est le log de la concentration de *L. monocytogenes* dans un lot  $i$  et  $\lambda^2$  est la variance de logarithme de concentration entre poitrines de porc. Le logarithme de la concentration  $z_i$  suit aussi une distribution normale :

$$\theta_{ij} \sim N(z_i, \lambda^2)$$

où  $\mu$  est le logarithme de la concentration moyenne et  $\sigma^2$  est la variance du logarithme de la concentration entre lots. Pour les distributions *a priori*, le paramètre  $\mu$  suit une distribution normale et  $\sigma^2$  et  $\lambda^2$  suivent toutes deux une distribution inverse gamma.

Il n'y a pas d'effet unité dans le modèle B, donc  $\lambda=0$ . Inversement, il n'y a pas d'effet lot dans le modèle U, donc  $\sigma=0$ . Le modèle NS n'a aucun des deux effets mentionnés ci-dessus, donc  $\lambda=\sigma=0$ . Les modèles B, U et NS sont décrits dans le **Tableau 2**.

**Tableau 2: Description des modèles B, U et NS. Les indices  $i, j, k$  et  $l$  font référence respectivement à un lot, une poitrine de porc, une portion test et à la fraction analysée.**

Model B	Model U	Model NS
$x_{ik} \sim \text{Bin}(1, 1 - \exp(-10^{\theta_i} S_k))$ $y_{ikl} \sim P(10^{\theta_i} S_k d_l)$ $z_i \sim N(\mu, \sigma^2)$	$x_{jk} \sim \text{Bin}(1, 1 - \exp(-10^{\theta_j} S_k))$ $y_{jkl} \sim P(10^{\theta_j} S_k d_l)$ $\theta_j \sim N(\mu, \lambda^2)$	$x_k \sim \text{Bin}(1, 1 - \exp(-10^{\mu} S_k))$ $y_{kkl} \sim P(10^{\mu} S_k d_l)$

Pour déterminer les paramètres de la distribution *a priori*, des résultats d'auto-contrôles pratiqués par différentes entreprises du secteur ont été utilisés. Les distributions *a posteriori* des paramètres ont été estimées grâce au logiciel OpenBugs (Thomas *et al.* 2006). Dans le protocole utilisé pour les données décrites au Tableau 1,  $S_k=100$  cm<sup>2</sup> et  $d_l=0,05$ . Les quantiles des distributions *a posteriori* pour les quatre modèles sont indiqués dans le **Tableau 3**.

**Tableau 3: Statistiques descriptives des distributions postérieures des modèles REF, B, U et NS.**

Modèle	Paramètres	Statistiques descriptives des distributions postérieures				
		Moyenne	E.t.	2.5 <sup>ème</sup> perc.	50 <sup>ème</sup> perc.	97.5 <sup>ème</sup> perc.
REF	$\mu$	-3,09	0,53	-4,25	-3,05	-2,15
	$\sigma$	1,55	0,49	0,89	1,45	2,77
	$\lambda$	0,38	0,08	0,25	0,36	0,57
B	$\mu$	-3,12	0,51	-4,21	-3,09	-2,18
	$\sigma$	1,72	0,47	1,06	1,63	2,86
U	$\mu$	-3,51	0,15	-3,81	-3,51	-3,21
	$\lambda$	1,99	0,24	1,59	1,97	2,51
NS	$\mu$	-0,94	0,005	-0,95	-0,94	-0,93

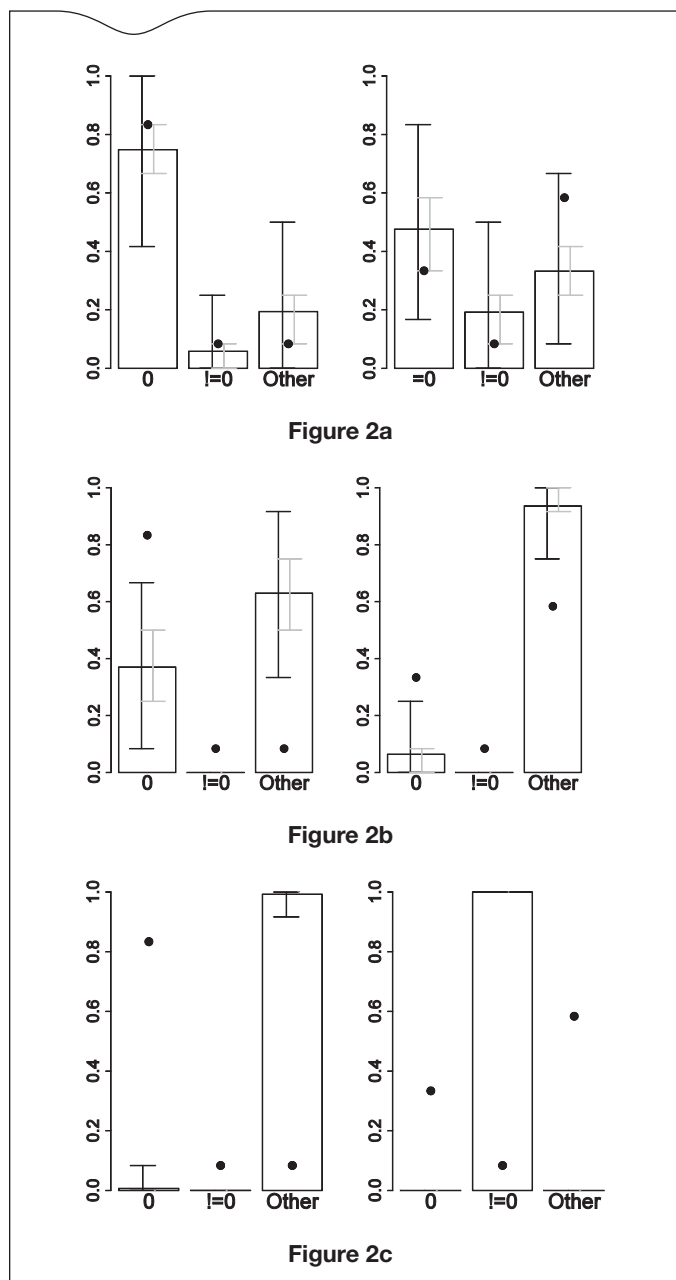
"E.t." = écart-type, et "perc." = percentile.

Nous avons étudié la capacité des modèles à répliquer les données réelles à partir d'un critère visuel basé sur des données simulées. Les données de détection ont été simulées à partir des distributions *a posteriori* des paramètres (même nombre de données par lot et même nombre de lots que pour les données observées), puis les proportions de lots avec (1) uniquement des présences, (2) uniquement des absences ou (3) un mélange de présences et d'absences ont été décomptés. Ce processus a été répété  $n$  fois pour calculer la médiane et les intervalles de crédibilité à 50 % et 95 % des proportions de lots dans chacune des catégories. Un intervalle de crédibilité à  $x$  % signifie que  $x$  % des données simulées sont comprises dans l'intervalle. Le même procédé a été utilisé pour les données de dénombrement. Les résultats sont présentés à la **Figure 2**. Le modèle répliquant le mieux



## Recherche

les données est le modèle B. Le modèle REF réplique un peu moins bien les données (données non montrées). Le modèle B est donc le meilleur des quatre modèles.



**Figure 2: Données de contamination de poitrines de porc en sortie malaxage simulées et observées pour (a) le modèle B, (b) le modèle U et (c) le modèle NS. Chaque figure de gauche représente les données de détection et chaque figure de droite les données de dénombrement. Les histogrammes représentent la moyenne de chaque groupe ("=0" : proportion de lots ne comportant que des données nulles, "!=0" : proportion de lots ne comportant que des données non nulles, "Other" : tous les autres lots). Les segments de droite représentent les intervalles de crédibilité à 50 % et les segments de gauche les intervalles de crédibilité à 95 %. Les points sont les données observées.)**

### Exemple illustrant la détermination de la taille optimale de l'échantillon pour la minimisation des coûts.

Connaître la distribution de la contamination permet de définir une stratégie pour les plans d'échantillonnage. Néanmoins, pour cette dernière, il faut également tenir compte des pratiques de l'industriel et des raisons de l'échantillonnage. Il existe plusieurs types de plans d'échantillonnage dans l'industrie agro-alimentaire, on se limitera ici au plan par attribut à deux classes. Le principe est le suivant :  $n$  produits sont prélevés et des analyses de recherche sont menées (généralement dans 25 g de produit). Si le nombre d'analyses positives  $y$  dépasse un certain nombre  $c$ , alors le lot est rejeté (détruit ou vendu dans une autre filière par exemple), sinon, le lot est livré. Ce type de plan suppose que la marchandise soit encore dans l'usine lorsque les résultats sont disponibles, ce qui n'est pas toujours le cas. Pour nous adapter à notre application, nous avons un peu modifié la définition du plan d'échantillonnage. Nous avons discuté avec un expert du secteur et nous sommes arrivés au plan suivant :

- l'échantillonnage ne porte pas sur un lot de production mais sur une période (1 semaine ou 1 mois par exemple) ;
- en fonction de la valeur de  $x$ , 3 décisions possibles sont prises par l'entreprise (ne rien faire, entreprendre une action corrective mineure car la prévalence en *L. monocytogenes* durant la période de production est jugée moyenne, entreprendre une action corrective majeure car la prévalence est jugée élevée).

Notre intention était de déterminer les valeurs optimales de la taille  $n$  de l'échantillon ainsi que des seuils  $c_1$  et  $c_2$ , respectivement les valeurs de  $x$  au-delà desquelles l'action corrective mineure et l'action corrective majeure sont prises. Pour  $y$  parvenir, nous avons utilisé la théorie bayésienne de la décision. L'objectif de cette théorie est de déterminer la meilleure solution pour un opérateur en situation d'incertitude. Ceci est obtenu par différentes étapes :

- déterminer l'ensemble  $\mathcal{D}$  de toutes les décisions possible (soit ici les 3 décisions décrites ci-dessus) ;
- déterminer toutes les valeurs de  $\mathcal{S}$  des états de la nature (ici, la contamination par *L. monocytogenes* des poitrines de porc) et les distributions *a priori* ;
- déterminer la série de toutes les observations  $\mathcal{o}$  (ici la détection et le dénombrement) et leurs distributions ;
- définir la fonction de perte  $L$  définie pour  $\mathcal{D} \times \mathcal{S} \times \mathcal{o}$  en  $\mathbb{R}^+$  (voir ci-dessous) ;
- déterminer la meilleure règle de décision (fonction qui à un ensemble d'observation  $\mathcal{o}$  associe une décision  $d$ ), obtenue en minimisant l'espérance de la fonction  $L$  sur les états de la nature et les observations.

Pour plus d'informations sur cette théorie, voir Berger, 1985 ; Parent, 2007 et Robert, 2006.

En fonction de la prévalence de la production sur une période, le client (ici un distributeur) peut appliquer une pénalité pour non-respect du cahier des charges et imposer des contrôles supplémentaires pendant une certaine période de temps. Le montant des pénalités dépend de la prévalence (plus la prévalence est forte et plus la pénalité est élevée) mais est modulé par l'éventuelle action corrective faite par l'entreprise (si l'entreprise a mis en place une action corrective, la pénalité diminue). Pour simplifier, la prévalence a été répartie en trois classes : faible, moyenne et forte. Nous avons demandé à notre expert d'estimer les coûts des pénalités et des actions correctives. Ces derniers sont résumés au **Tableau 4**.

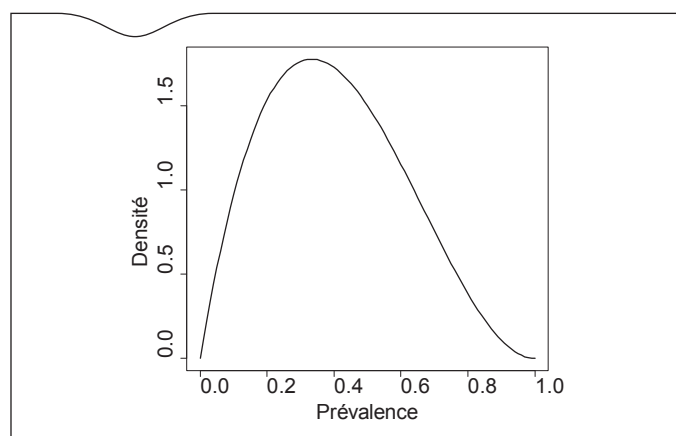


## Recherche

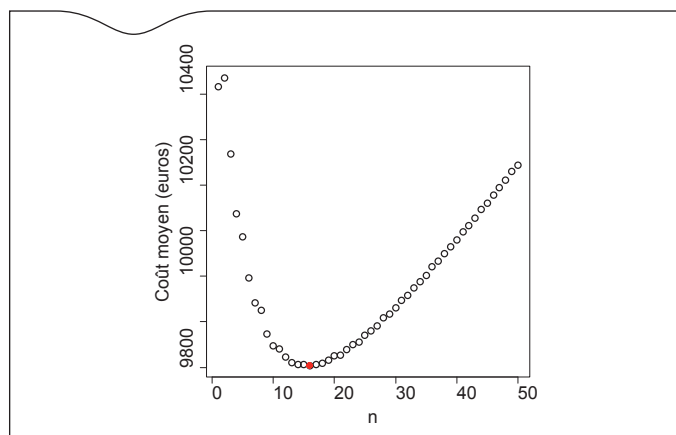
**Tableau 4: Coût supporté en euros par l'entreprise en fonction de la prévalence de la production et de la décision prise.**

		Décision prise		
		Ne rien faire	a.c. mineure nécessaire	a.c. majeure nécessaire
Situation réelle	Prévalence faible	0	4 250	14 000
	Prévalence moyenne	6 200	6 110	14 930
	Prévalence forte	92 050	31 900	27 800

À tous ces coûts, il convient d'ajouter le coût d'échantillonnage, estimé à 20 euros par l'expert. Afin de mener le calcul à son terme, nous avons déterminé les seuils de prévalence: en dessous de 0,2, la prévalence est considérée comme faible et au-dessus de 0,6, elle est forte. Enfin, la distribution Beta de paramètres 2 et 3 a été utilisée pour décrire la prévalence (voir **figure 3**). Une distribution beta de paramètres  $\alpha$  et  $\beta$  a une fonction de distribution de probabilité égale à  $\frac{\Gamma(\alpha+\beta)}{\Gamma(\alpha)\Gamma(\beta)} x^{\alpha-1} (1-x)^{\beta}$ ,



**Figure 3: Distribution de la prévalence entre les différentes périodes de production.**



**Figure 4: Coût moyen en euros supporté par l'entreprise en fonction de la taille  $n$  de l'échantillon. Le coût minimal est atteint pour  $n=16$ ,  $c_1=4$  et  $c_2=11$  (point rouge).**

où  $\Gamma t = \int_0^{\infty} z^{t-1} e^{-z} dz$ . Avec toutes ces informations, nous pouvons calculer la fonction de perte qui associe un coût à un ensemble d'observation et une valeur de contamination. La décision ne dépend que de la valeur des observations; leur connaissance déterminera automatiquement la décision à prendre.

Munis de ces informations, nous avons calculé le coût moyen, selon la prévalence et les résultats des analyses, par période de production pour l'entreprise en fonction de la taille de l'échantillon. En faisant varier cette taille, nous pouvons déterminer quelle valeur minimise le coût moyen. Avec les valeurs numériques choisies, les différents coûts moyens sont présentés à la **figure 4**. Le minimum est atteint pour  $n=16$ ,  $c_1=4$  et  $c_2=11$ .

D'autres valeurs pour la distribution et les seuils de la prévalence ont été testés pour étudier leur impact sur le plan d'échantillonnage. Ainsi, lorsque la distribution beta a pour paramètres 2 et 20 et que les seuils de prévalence sont de 0,05 et 0,1, alors le coût moyen supporté par l'entreprise est atteint pour  $n=48$ ,  $c_1=1$  et  $c_2=6$ , ce qui est très différent du résultat précédent. Si les coûts varient, les résultats du plan d'échantillonnage varient également.

L'application de la théorie bayésienne de l'information permet d'apporter une aide au décideur en univers incertain. Elle nécessite de définir la population sur laquelle on travaille (définition du lot), de modéliser de la prévalence, de définir l'ensemble des décisions et des conséquences possibles, de déterminer les coûts et enfin d'effectuer des calculs probabilistes. Les valeurs finales sont très dépendantes du modèle employé et des coûts, ce qui signifie que toutes les entrées des modèles doivent être définies avec attention. Pour plus d'information sur ce travail, voir Commeau (2012).

### Références

- Berger J. 1985. Statistical decision theory and Bayesian analysis. Springer Verlag, New York, second edition : 617 pp.
- Commeau N, (2012). Modélisation de la contamination par *Listeria monocytogenes* pour l'amélioration de la surveillance dans les industries agro-alimentaires. PhD thesis, AgroParisTech. [http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?alsid=3°uus0iet62q4s4jff39p0°935&iw\\_this\\_doc=pastel-00770790&version=1](http://tel.archives-ouvertes.fr/index.php?alsid=3°uus0iet62q4s4jff39p0°935&iw_this_doc=pastel-00770790&version=1)
- Gonzales-Barron U, Butler F. 2011. Characterisation of within-batch and between-batch variability in microbial counts in foods using Poisson-gamma and Poisson-lognormal regression models. *Food Control*, 22:1268–1278.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2002. Microorganisms in Foods 7: microbiological testing in food safety management. New-York, Kluwer academic/Plenum Publisher: 375 pp.
- International Life Science Institute (ILSI). 2010. Impact of microbial distribution on food safety. 1-68.
- Parent E, Bernier J. 2007. Le raisonnement bayésien. Springer Verlag, France: 327 pp.
- Règlement (CE) N°2073/2005 de la Commission européenne concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *Journal officiel de l'Union européenne*, L338:1–26.
- Robert C. 2006. Le choix bayésien. Springer-Verlag, France: 639 pp.
- Thomas, A., O'Hara, B., Ligges, U. and Sturtz, S. (2006). Making BUGS open. *R News*, 6:12–17.



## Agenda

### EURL on Antimicrobial and Dye Residues in Food

#### Workshops

**October 2013, EURL Fougères, France**

Workshop organised by the ANSES Fougères Laboratory, EURL for Antibiotic and Dye Residues, and intended for analysts and managers from the EU's network of NRLs (32 participants): the workshop addressed issues on control of veterinary antibiotic drug residues in foods of animal origin and it also included a technical training session on the analysis by LC-MS/MS of antibiotic residues in honey products (Fougères, France).  
**Contact: Éric Verdon (eric.verdon@anses.fr)**

#### Proficiency Testing Studies

**December 2013, EURL Fougères, France**

Provision of a Proficiency Testing Study to the attention of the EU-NRLs and to several Official Labs in Third Countries Worldwide.

Dedicated to the confirmatory control of Dye Residues in Aquaculture Products (Naturally Incurred Prawns)

**Contact: Éric Verdon (eric.verdon@anses.fr) and Regine Fuselier (regine.fuselier@anses.fr)**

**March-May 2014, EURL Fougères, France**

Provision of a Proficiency Testing Study to the attention of the EU-NRLs and to several Official Labs in Third Countries Worldwide is dedicated to the control of Chloramphenicol Residues, a banned substance in the EU, in Porcine Meat and Urine (naturally incurred testing materials)

**Contact: Éric Verdon (eric.verdon@anses.fr) and Regine Fuselier (regine.fuselier@anses.fr)**

### EURL for Milk and Milk Products

Since **October 3, 2013**, the new website is open at <https://eurl-milk.anses.fr>

#### Workshops

**October 2-3, 2013**, Training session on AP determination in cheese (fluorimetric method)

**October 3-4, 2013**, Workshop dedicated to pasteurization tracers in milk & milk products

**Contact: Bertrand Lombard (bertrand.lombard@anses.fr)**

**September/October, 2014**, NRL-Workshop for milk and related products

### Proficiency Testing Studies

**October 7-18, 2013**, PT trial on the counting of somatic cells in milk

**November 27, 2013**, PT trial on the determination of alkaline phosphatase in cheese

### EURL for *Listeria monocytogenes*

#### Workshops

**November 26-28, 2013**, Training on *L. monocytogenes* PFGE-Typing

**Contact: Adrien Assere (adrien.assere@anses.fr)**

**April 9-11, 2014**, NRL-Workshop on *L. monocytogenes*, Teramo (Italy)

### Proficiency Testing Studies

**October 7, 2013**, Proficiency Testing Trial dedicated to enumeration of *L. monocytogenes*

### EURL for coagulase-positive Staphylococci

#### Workshops

**November 5-7, 2013**, Training session dedicated to CPS PFGE typing

**June 4-6, 2014**, NRL-Workshop on coagulase-positive Staphylococci, Maisons-Alfort (France)

### Proficiency Testing Studies

**November 19, 2013**, detection of staphylococcal enterotoxins in food matrices

**November 25-27, 2013**, enumeration of coagulase-positive staphylococci in powdered infant formulae.

**Contact: Bertrand Lombard (bertrand.lombard@anses.fr)**

### EURL for equine diseases

#### Workshops

In 2014, two workshops will be organized, one on Glanders, another on Equine infectious anaemia

### Proficiency Testing Studies

In 2014, two ring trials will be organized, one for CFT for Glanders, another for AGID test for Equine infectious anaemia

All detailed information will be given on <http://www.ansespro.fr/eurl-equinediseases/>

#### Réalisation graphique et éditoriale

**Directeur de la publication:** Marc Mortureux

**Rédacteur en chef:** Paul Martin

**Rédacteur en chef adjoint:** Barbara Gouget

**Comité de rédaction:** Maria Laura Boschioli (Anses, France), Sabine Delannoy (Anses, France), Bertrand Lombard (Anses, France), Stefano Morabito (ISS, Italie), Françoise Petter (OEPP), Elisabeth Repérant (Anses, France), Hélène Gayon (SCL, France), Thierry Van Den Berg (Coda Cerva, Belgique), Eric Verdon (Anses, France)

**Création/réalisation:** Julien Vigneron, Céline Leterq, Fabrice Coutureau, Parimage

**ISSN** 2110-5294



Agence nationale de sécurité sanitaire  
de l'alimentation, de l'environnement et du travail  
27-31 avenue du général Leclerc  
94701 Maisons-Alfort Cedex  
[www.anses.fr](http://www.anses.fr)