



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Hiver 2015

Numéro 13



anses

agence nationale de sécurité sanitaire
alimentation, environnement, travail



*Euro*Reference

Les cahiers de la Référence

Cahier numéro 13

Hiver 2015

Éditorial

Ce numéro d'Euroreference se penche plus particulièrement sur le virus de l'hépatite E, HEV, avec trois articles qui sont consacrés à ce sujet.

Un point de vue sur les défis que représentent, pour la référence et la surveillance sanitaire, l'évolution des systèmes alimentaires (de la fourche à la fourchette) vient compléter cette approche.

Enfin, le focus sur H2020 tente de démêler pour vous la philosophie et le fonctionnement des programmes H2020 susceptibles d'intéresser les activités de recherche pour la référence. C'est une analyse pratique, une vraie marche à suivre, qui vous sera utile, nous l'espérons!

Bonne lecture.

La rédaction

Au sommaire



Actualités

Liens utiles sur les sites de l'InVS et l'EFSA. *Page 2*

Planning des EILA – LRUE. *Page 3*

Essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) en France *Page 4*

Comment, selon quelle approche, et où trouver des fonds européens pour financer ses activités de recherche ? *Page 5*



Point de vue

S'adapter aux évolutions des systèmes alimentaires, des défis scientifiques à relever. *Page 8*

Le virus de l'hépatite E: un virus zoonotique d'origine alimentaire qui menace la santé du patient immunodéprimé. *Page 11*



Recherche

Cas autochtones d'hépatite E: d'où vient le virus ? Impact des traitements des lisiers de porcs sur la réduction de la charge virale et estimation de la prévalence du virus dans les matrices alimentaires. *Page 14*



Méthodes

Détection du virus de l'hépatite E dans les aliments à base de foie cru de porc par une méthode de RT-PCR quantitative. *Page 20*



Actualités

Liens utiles sur les sites de l'InVS et l'EFSA

Voici quelques sites et liens sur lesquels vous pouvez trouver des informations intéressantes concernant le thème auquel ce numéro est consacré.

Site de l'InVS (Institut de veille sanitaire)

- Virus alimentaires: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Risques-infectieux-d-origine-alimentaire/Gastro-enterites-aigues-virales/Aide-memoire>
- Hépatites virales à transmission par les aliments: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatitis-virales/Hepatitis-virales-Generalites>
- Hépatite A: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatitis-virales/Hepatitis-A>
- Hépatite E: <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Hepatitis-virales/Hepatitis-E>

Site de l'EFSA: publications récentes sur les virus alimentaires (juillet 2014- janvier 2015):

- Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella, Yersinia, Shigella and Norovirus in bulb and stem vegetables, and carrots): <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3937.pdf>
- Flavivirus - tick-borne encephalitis virus (TBEV) in raw drinking milk: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3940.pdf>
- Risk of transmission of Ebola virus (EBOV) via the food chain: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3884.pdf>
- Risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 2 (Salmonella and Norovirus in tomatoes): <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3832.pdf>
- Tracing of food items in connection to the multinational hepatitis A virus outbreak in Europe: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3821.pdf>
- The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2012 (Calicivirus et rotavirus): <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3547.pdf>
- The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/3991.htm> ou sur le site de l'ECDC : <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/EU-summary-report-trends-sources-zoonoses-2013.pdf>



Actualités

Planning des EILA – LRUE

Mandat LRUE	Projets 2015		
	EILA	Workshops	Formations
<i>Staphylocoques à coagulase positive, y compris le staphylocoque doré (S. aureus)</i>	- Détection des entérotoxines de staphylocoques (avril) - Dénombrement des SCP (novembre)	28-29 mai	- 1 session sur détection des entérotoxines staphylococciques - 2 sessions sur la quantification des entérotoxines staphylococciques - 1 session sur la caractérisation des SCP par PCR ou typage des SCP par PFGE ou spa-typing
<i>Listeria monocytogenes</i>	- Dénombrement de <i>Listeria monocytogenes</i> - Typage <i>Listeria monocytogenes</i> par PFGE	25-27 mars	- 1 session sur typage par PFGE (Maisons-Alfort) + 2 formations sur site (LNR) - 1 session sur tests de croissance et étude de vieillissement relatifs à <i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Lait et produits laitiers</i>	- Comptage des cellules somatiques (2 ^e trimestre) - Activité de la phosphatase alcaline (novembre)	Octobre	- 1 session sur le comptage des cellules somatiques
<i>Brucellose</i>	- Brucellose ELISA lait	15-16 octobre	- 1 session bactériologie et biologie moléculaire (1 ^{er} sem.) - 1 session sérologie (2 nd sem.)
<i>Résidus de certaines substances visées à l'annexe VII, section I, point 12 b), du règlement (CE) 882/2004</i>	- Control of group A6 banned substances, nitrofurans, in foods from animal origin (1 ^{er} semestre) - Control of group B1 authorized antimicrobials in meat: at the screening step and confirmatory step (2 nd semestre)	"State-of-the-art in microbiological control of antibiotic inhibitory residues in various foods from animal origin and relevant issues behind this type of control including usage of rapid testing methods" (octobre)	
<i>Rage/Sérologie rage</i>	- Diagnostic (4 techniques) (juin)	27-28 mai Zagreb (Croatie)	Selon résultats aux EIL précédents (automne)
<i>Maladies équine (autres que la peste équine)</i>	- Dourine : recherche des anticorps de <i>Trypanosoma equiperdum</i> dans le sérum par technique de fixation du complément (printemps) - Métrite contagieuse : recherche de <i>Taylorella equigenitalis</i> par méthode de culture ou PCR (printemps)	Dourine et Métrite contagieuse (début octobre)	
<i>Santé des abeilles</i>	- Quantification du virus CBPV par PCR quantitative en temps réel (janvier-février) - Identification des espèces de <i>Nosema</i> par PCR (mai-juin)	Septembre	- Epilobee (juin) - 1 session sur le diagnostic des maladies de l'abeille (septembre)



Actualités

Essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) en France

Afin de s'assurer de la fiabilité des analyses effectuées par le réseau de laboratoires qu'il fédère, le laboratoire de référence organise des formations sur les nouvelles méthodes développées et réalise des essais inter-laboratoires d'aptitude (EILA) qui permettent de tester l'efficacité des analyses officielles.

Ces essais inter-laboratoires d'aptitude sont organisés à une fréquence définie par le laboratoire de référence en fonction de la difficulté de la méthode à mettre en œuvre et de la maturité du réseau de laboratoires. Cette fréquence oscille entre un et quatre essais sur une période de deux ans.

En pratique, le laboratoire de référence adresse aux laboratoires agréés des échantillons à analyser dont le contenu est connu de lui seul. Les laboratoires agréés mettent en œuvre la méthode officielle et rendent leurs résultats au laboratoire de référence. Tout résultat non conforme fait l'objet d'un dialogue avec le ou les laboratoires dont les résultats sont erronés, afin d'identifier les ajustements à apporter.

Les EILA sont organisés pour les domaines santé animale, sécurité sanitaire des aliments ou santé des végétaux, tous mandats de LNR confondus, y compris les mandats hors Anses.

<i>Santé animale</i>	> Calendrier prévisionnel 2015 (pdf)
<i>Santé des végétaux</i>	> Calendrier prévisionnel 2015 (pdf)
<i>Sécurité sanitaire des aliments – microbiologie</i>	> Calendrier prévisionnel 2015 (pdf)
<i>Sécurité sanitaire des aliments - résidus et contaminants</i>	> Calendrier prévisionnel 2015 (pdf)



Actualités

Comment, selon quelle approche, et où trouver des fonds européens pour financer ses activités de recherche ?

Arnaud Callegari, Direction des affaires européennes et internationales, Anses, France (arnaud.callegari@anses.fr)

Qu'est-ce qu'Horizon 2020 ?

Horizon 2020, ou encore H2020 est le 8^e programme-cadre de la recherche-développement et de l'innovation financé par l'Union européenne entre 2014 et 2020. Participer à Horizon 2020 est une excellente opportunité pour étendre son réseau, améliorer sa visibilité parmi les équipes de recherche européennes et internationales et trouver des sources de financement alternatives permettant de compléter des activités de recherche entreprises par ailleurs grâce aux financements de l'État.

Quelle est la philosophie d'H2020 ?

À la différence des précédents programmes-cadre européens de recherche, Horizon 2020 a une finalité beaucoup plus tournée vers l'innovation (maître-mot depuis quelques années dans le monde de la recherche-développement), afin de contribuer à ramener l'économie européenne à un niveau compétitif mondial, en créant plus de valeur ajoutée, se basant sur l'utilisation des résultats innovants de la recherche. À cette fin Horizon 2020 est structuré entre autres pour stimuler et faciliter le passage de la recherche finalisée à la mise au point et la commercialisation de nouveaux produits. Il s'agit de ce que les anglo-saxons appellent la « vallée de la mort », le moment dans la chaîne de valeur, où il faut mobiliser des moyens suffisants pour financer le risque induit par la mise au point et la commercialisation d'un produit dont on ne sait pas par avance, s'il sera accueilli favorablement par la société et si les investissements consentis seront rentabilisés et profitables.

Pour accroître leurs chances de succès à trouver des financements H2020, il est donc nécessaire pour les chercheurs de penser leurs projets en termes d'innovation et dans un cadre global, c'est-à-dire où les résultats de leurs activités de recherche doivent pouvoir avoir comme effet de créer des leviers permettant à la société européenne d'être plus présente et compétitive sur le marché mondial. En ce qui concerne les activités de référence et de recherche concernant la détection des agents pathogènes et des contaminants, les méthodes de pointe comme les Next Generation Sequencing (NGS) ou la PCR haut-débit, sont des méthodes qui permettent de gagner en temps et en moyens financiers et humains. À ce titre des projets de recherche basés sur ces technologies ont bien plus de chances d'être financés que d'autres plus traditionnels.

Comment fonctionne H2020 ?

H2020 est composé d'une multitude d'appels à projets qui peuvent être soit génériques (dits « blancs ») soit thématiques. En ce qui concerne les appels à projet thématiques, les programmes de travail sont établis pour deux ans avec une révision à mi-parcours et sont établis en s'appuyant sur une comitologie éprouvée, faisant intervenir l'ensemble des acteurs de la recherche, du laboratoire de recherche public ou privé, à la Commission européenne, en passant par les ministères des

États Membres et Associés à H2020 (Norvège, Turquie, Israël... liste non exhaustive).

La définition des sujets de recherche contenus dans les différents programmes de travail d'H2020, s'appuie sur la base juridique d'H2020 (http://ec.europa.eu/research/participants/data/ref/h2020/legal_basis/sp/h2020-sp_en.pdf), ainsi que sur la définition d'une matrice croisant des orientations stratégiques avec des domaines d'intérêt transversaux (focus areas) et des appels à projet spécifiques (calls). Ces orientations stratégiques, focus areas et calls sont redéfinis à chaque nouveau programme de travail biennal.

H2020 se veut lui aussi résolument innovant, même en ce qui concerne son contenant, puisque désormais, l'ensemble des aspects d'H2020 est dématérialisé et passe par le portail du participant (*participant portal*) (<http://ec.europa.eu/research/participants/portal/desktop/en/home.html>), qui regroupe toute l'information sur les programmes de travail et appels à projet passés, en cours ou à venir, ainsi que tous les outils permettant de soumettre et gérer un projet de recherche.

Marche à suivre pour accéder aux différents programmes de travail des différents appels à projet d'H2020 :

- 1. Cliquer sur le lien suivant : *Appels à projet H2020* ;
- 2. Dans le cadre principal listant l'ensemble des sous-programmes d'H2020, sélectionner le sous-programme désiré dans l'un des six thèmes principaux d'H2020 (à noter que le dernier thème Euratom est un sous-programme indépendant du reste d'H2020) ;
- 3. Apparaissent alors en résultat du filtre appliqué, les appels ouverts dans le cadre du sous-programme sélectionné ;
- 4. Cliquer alors sur l'appel souhaité, puis sur l'onglet call documents où se trouve le document programme de travail intitulé sous la forme : « WP H2020 suivi de la référence de l'appel ».

En termes de veille sur les appels à projet, pour chaque sous-programme il y a un appel à projet par an. Cependant les dates d'ouverture et de fermetures des appels à projets des différents sous-programmes ne sont pas synchronisées entre elles. De plus, elles ne sont pas publiées à des dates identiques d'une année à l'autre. Il est donc nécessaire de visiter régulièrement le *participant portal* et de noter les appels à projets en cours ou à venir. Ces derniers sont cependant notifiés sur le participant portal au moins trois mois avant leur ouverture : **une fréquence trimestrielle de veille** devrait donc être suffisante pour détecter les futurs programmes.

Il est cependant possible de s'abonner au flux RSS relatifs aux appels à projet d'H2020 en cliquant sur le logo RSS dans la partie gauche de la page des appels à projet, ou encore en cliquant sur l'icône calendrier à côté du logo RSS, de



Actualités

télécharger dans MS-outlook, le calendrier des appels à projets d'H2020, qui vous permettra de programmer des rappels pour l'ouverture et la fermeture des appels à projet d'intérêt que vous aurez sélectionnés.

Dans la partie gauche de la page des appels à projet, il existe une fonctionnalité de recherche des appels à projets passés, en-cours ou à venir, qui permet de trouver les appels pertinents selon des mots-clés, pour cela cliquez sur le bouton « search topics ».

Dans l'optique de faire gagner du temps aux porteurs de projet et éviter un investissement inutile de leur part, désormais **les candidatures en deux temps se généralisent** sous H2020, avec une première étape courte nécessitant un investissement minimum de la part des candidats. Si la première phase de candidature est un succès, alors une deuxième phase plus complète s'ouvre où l'ensemble du projet est explicité (consortium, activités détaillées, budget associé, livrables).

Enfin, H2020 a été pensé dans un sens de simplification pour les chercheurs et les gestionnaires des projets de recherche. À la différence des programmes-cadres précédents où les bénéficiaires devaient se frayer un chemin dans une véritable jungle réglementaire inextricable, où chaque sous-programme avait des règles de fonctionnement spécifiques, l'ensemble des programmes qui composent H2020 fonctionnent selon des règles identiques, et il n'y a que très peu d'exception qui cependant perdurent de-ci de-là, mais trouvent alors une justification sensée et acceptable de la part des bénéficiaires.

H2020 se décline en trois piliers :

• Le premier pilier, « l'excellence scientifique », qui, pour ce qui concerne les financements d'intérêt pour la recherche dans les domaines de la référence, regroupe :

- la formation initiale et continue par la recherche, au travers des Actions Marie Skłodowska Curie, pour le financement de cursus de master ou de doctorat, mais aussi de la mobilité de chercheurs dans le cadre de la formation continue tout au long de la vie;
- des infrastructures de recherche (le programme infrastructures);
- ainsi que de l'alignement des capacités de recherche des États Membres les moins avancés par rapport aux plus avancés (le programme « spreading excellence and widening participation »).

Les appels à projet des différents programmes du premier pilier sont des appels blancs, ils ne répondent donc à aucun critère thématique, et chacun est libre de proposer un projet sur le thème de son choix. Cependant ces programmes de financement souffrent d'une extrême compétitivité qui implique de présenter des dossiers de candidature d'une excellente qualité, donc nécessitant un investissement sensible de la part des porteurs de projet lors de leur préparation.

À noter que sur le *participant portal*, les appels à projet du premier pilier s'inscrivent dans les en-têtes « Excellent Science »

principalement, mais aussi sous les en-têtes « Spreading excellence and widening participation » et « Science with and for Society ».

• Le deuxième pilier traite de la « primauté industrielle », et donc a pour objet le financement de la mise au point et de la commercialisation de produits utilisant les résultats de la recherche. Ce pilier s'adresse en priorité aux industries privées et est de peu d'intérêt pour les activités de recherche pour la référence en santé animale, santé végétale et santé alimentation.

Cependant une exception au sein de ce second pilier, le programme LEIT (Leadership in Enabling and Industrial Technologies), qui regroupe en son sein le financement de la recherche sur les biotechnologies. Les appels à projet de ce sous-programme sont thématiques. Une part du financement de la recherche sur les biotechnologies peut inclure des aspects de métagénomique et de bioinformatique au service du traitement de l'ensemble des données « omiques », ce qui est d'intérêt en amont des activités de recherche et référence.

• Le troisième pilier s'intéresse à sept grandes questions sociétales (*societal challenges*), des sujets qui sont traités par une approche globale dans le cadre d'une recherche collaborative entre au moins trois partenaires distincts d'au moins trois États Membres ou associés, distincts. Cependant, comme c'était le cas dans les précédents programmes-cadre, au lieu par exemple de s'intéresser à un pathogène ou un groupe de pathogènes précis d'une espèce animale/végétale ou d'un groupe d'espèces animales/végétales précis pour une ou des raisons sanitaires et/ou économiques précises, selon une priorisation des problèmes ayant fait l'objet d'une mûre réflexion entre experts en amont, les appels à projet du troisième pilier d'H2020 sont thématiques et vont plutôt tenter de répondre aux questions concernant par exemple les perspectives de la production alimentaire dans l'Union européenne : dans ce thème la place, le rôle et l'efficacité des productions animales sont des questions qui incluent un volet sanitaire important, où les scientifiques concernés par la recherche et référence trouveront leur place.

Les appels à projets du troisième pilier ont ainsi un périmètre beaucoup plus large que les appels à projets en recherche collaborative des précédents programmes-cadres. Les consortiums formés pour répondre aux appels à projets sont par conséquent plus grands et il est commun sous H2020 de voir des consortiums de plus de vingt partenaires, ce qui était peu courant dans les programmes-cadre précédents. Les projets financés sont censés contribuer à répondre à des grandes questions sociétales. Les réponses apportées par la recherche doivent permettre de créer des leviers améliorant la compétitivité européenne sur le marché mondial et ayant ainsi un effet positif sur la croissance économique européenne et donc en bout de course sur la qualité de vie des Européens.



Actualités

Dans ce troisième pilier, deux défis sociétaux sont tout particulièrement en phase avec les activités de recherche et référence, il s'agit des :

- défi 1 sur la santé humaine qui aborde notamment des problématiques de santé publique liées à l'exposition aux contaminants chimiques via l'environnement, ainsi qu'à la résistance aux antibiotiques ;
- défi 2 sur les problématiques de sécurité alimentaire, agricoles, forestières et maritimes, où sont adressées toutes les problématiques liées à la santé et au bien-être animal, à la santé des végétaux ainsi qu'à la santé publique en lien avec l'alimentation.

Dans ces deux défis les actions de recherche menées peuvent notamment être de la recherche méthodologique sur la détection et le contrôle des pathogènes et autres contaminants chimiques.



Point de vue

S'adapter aux évolutions des systèmes alimentaires, des défis scientifiques à relever

Laurent LALOUX (laurent.laloux@anses.fr), Anses, directeur du laboratoire de sécurité des aliments, Maisons-Alfort, France

Face à l'évolution constante et rapide des systèmes alimentaires dans l'ensemble de ses composantes (production, transformation, distribution, consommation), les acteurs de la sécurité sanitaire des aliments (pouvoirs publics et professionnels) doivent disposer des outils analytiques pertinents pour une meilleure prévention et maîtrise des risques pour le consommateur.

Les systèmes alimentaires, c'est-à-dire l'ensemble des acteurs, des institutions et des dispositifs techniques qui mettent en relation la production primaire d'une biomasse à destination alimentaire et le consommateur des produits, connaissent régulièrement et rapidement des transformations. Ces transformations ont un impact non seulement sur la qualité des denrées alimentaires offertes aux consommateurs mais également sur la nature et les caractéristiques des dangers (agents biologiques ou chimiques) qui contaminent l'aliment. Le consommateur change également, au regard de l'évolution de la société (vieillesse des populations, sous-populations immunodéprimées, désacralisation du repas) et ces transformations l'amène à modifier ses pratiques de consommation.

Des facteurs de risques en constante évolution

Les modes de production agricoles sont passés depuis un demi-siècle d'un modèle de culture maraîchère à une agriculture moderne et intensive. D'une production de proximité consommée localement et rapidement, nous sommes passés à une production de masse à consommation large et différée. Dans ce cadre, un incident de production aura des conséquences potentiellement plus graves au regard de la taille de la population de consommateur qui va être touchée. Ainsi, en 2001, les États-Unis sont touchés par une intoxication alimentaire due à des melons contaminés par la bactérie *Listeria monocytogenes*. Cette toxi-infection est responsable de treize morts et plus de soixante autres personnes affectées. Les enquêtes épidémiologiques ont montré une source unique de contamination à la ferme dans le Colorado mais un impact sans précédent par une distribution de masse dans plus de dix-sept états américains.

Les modes de transformation des produits ont également fortement évolué. Nouveaux procédés, automatisation, sont autant d'évolutions qui imposent des adaptations de nos dispositifs de sécurité. La mise en œuvre de procédés de cuisson haute température de certains aliments tels que les frites, chips de pomme de terre ou céréales pour petit-déjeuner peuvent générer des composés comme l'acrylamide qui est une molécule reconnue par le Centre international de recherche sur le cancer (Circ) comme cancérigène avéré pour l'animal et possible pour l'Homme. En 2013, une surveillance de la contamination de certaines denrées alimentaires par

l'acrylamide a été effectuée en France par la Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF). Cette étude a montré que plusieurs types de produits présentaient une teneur en acrylamide supérieure aux valeurs indicatives recommandées. En 2008, la Chine a dû faire face à un scandale de grande ampleur touchant le lait de consommation courante et le lait infantile, contaminés par de la mélamine. Même si cet épisode tenait plus de la fraude que de l'incident, cette pratique de transformation a rendu plus de 94 000 personnes malades. Enfin, l'usage intensif de nettoyant et de désinfectant en industries agro-alimentaires ou la généralisation de la réfrigération dans les procédés alimentaires contribuent à la sélection d'agents microbiologiques plus résistants. Bactéries psychrotrophes, ou au contraire résistantes aux hautes températures, résistantes aux antibiotiques, résistantes aux produits de nettoyage « persisters » sont autant de préoccupations pour les acteurs de l'alimentaire. Depuis dix ans, en France, le laboratoire national de référence (LNR) des *Salmonella* de l'Anses constate une augmentation importante du nombre de *Salmonella Kentucky* multi-résistantes, isolées de la chaîne alimentaire, en particulier aux fluoroquinolones, antibiotiques d'intérêt thérapeutique en médecine humaine.

L'organisation mondiale du commerce ou encore le marché unique européen permettent aujourd'hui la libre circulation des denrées alimentaires. Les importations alimentaires et les exportations de l'UE ont doublé depuis 2005 et les conséquences de la globalisation des échanges de matières premières et de denrées alimentaires pour la sécurité alimentaire sont énormes. La fraude à la viande de cheval de 2013 faisant passer de la viande de cheval pour de la viande de bœuf montre toute la complexité des circuits d'approvisionnement, d'acheminement, de transformation et de commercialisation qui au regard de différences législatives et réglementaires entre les états constituent des facteurs de risques avérés. En 2012, également, l'approvisionnement des cantines d'écoles en Allemagne par des fraises en provenance de Chine a causé l'infection de plus de 11 000 écoliers par des norovirus.

L'évolution rapide des modes de production et de transformation des denrées, la globalisation du commerce ont considérablement modifié les habitudes de consommation des produits alimentaires. Les modifications des habitudes alimentaires concernent aussi bien les procédés de préparation des aliments « prêts à consommer », que le développement de la restauration collective et/ou rapide. Un exemple flagrant est l'apparition et la croissance exponentielle de consommation de produits crus comme les sushis, les carpaccios ou végétaux crus. Ces nouveaux modes de consommation ne sont pas sans risque sanitaire car la cuisson est un moyen de maîtrise pour éliminer les contaminations microbiennes. Cela concerne notamment les poissons crus pour lesquels des prévalences



Point de vue

de contamination en *Anisakis* (parasite spécifique des produits de la pêche) varie de 7 à 75 % en fonction de l'espèce. En 2003, l'Institut de veille sanitaire estimait l'incidence de cas d'anisakiase à huit par an en France (constat basé sur des données de 1985 à 1987). Considérant l'augmentation de la consommation de poisson cru en France, cette parasitose, bien que rare, a une forte probabilité d'augmentation et doit être surveillée.

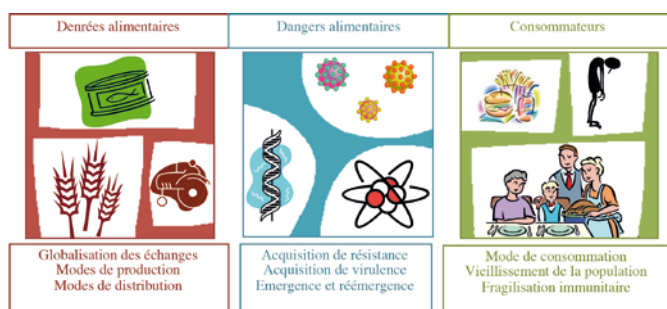


Figure 1 : Typologie de l'évolution des facteurs de risques en sécurité sanitaire des aliments

L'ensemble des évolutions des facteurs de risques, résumé dans la **Figure 1**, est parfaitement caractérisé par l'une des plus importantes crises sanitaires en Europe de ces dernières années. En 2011, l'Allemagne est touchée par une grave épidémie d'une maladie d'origine alimentaire qui cause l'infection de près de 4000 personnes, dont plus de cinquante décès. Cette crise a eu des impacts sanitaires de grande ampleur mais également économique avec la perte de plus de un milliard d'euros pour la filière des fruits et légumes injustement incriminée dans cette crise. Cette épidémie est principalement due à :

- des graines de fenugrec produites en Égypte, exportées en Europe et commercialisées majoritairement en Allemagne (12 cas ont été identifiés également en France suite à la consommation de ces graines);
- la contamination des graines par une nouvelle souche d'*Escherichia coli* O104: H4 qui était à l'origine une souche non virulente (*E. coli* entéro-adhérent) mais qui a acquis des facteurs de virulence et de résistance (*E. coli* entéro-hémorragique);
- l'apparition d'un nouveau mode de consommation de graines germées crues qui a touché majoritairement les consommateurs adultes, féminins et jeunes, sensibles à ce mode de consommation.

Face à ces évolutions, quelles adaptations de nos outils ?

Comment faire face à l'émergence de dangers de plus en plus virulents et/ou résistants, à l'application en production agricole d'intrants de plus en plus complexes, à une diversité d'origine et de qualité des matières premières pour les denrées alimentaires transformées, à des facteurs d'évolution dans les pratiques de consommation qui viennent perturber nos systèmes de gestion et de maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments.

Pour permettre de minimiser l'impact de ces évolutions sur l'efficacité de nos systèmes de prise en compte des facteurs de risques, il faut en particulier faire évoluer nos systèmes de surveillance. Une détection anticipée de signaux d'alerte et une traçabilité efficace sont des objectifs louables mais ces dispositifs doivent dépasser le périmètre des nations pour se conforter dans des systèmes internationaux d'échanges d'informations et de contacts rapides entre les pays. La nature des informations générées et échangées doit également évoluer afin de permettre de mieux décrire les caractéristiques des dangers et les situations épidémiologiques. Ces informations, qu'elles proviennent d'une surveillance des environnements, des animaux, des maladies humaines, des effets indésirables (toxicovigilance, nutrivigilance...), des toxico-infections alimentaires collectives ou des aliments (observatoire de la qualité des aliments, plan de surveillance et de contrôle), doivent être rapprochées entre-elles et « meta »-analysées pour en extraire toute la connaissance au service de la maîtrise du risque sanitaire.

Les technologies analytiques nous offrent des évolutions spectaculaires. Les approches de génomiques haut débit ou de spectrométrie haute résolution nous permettent d'obtenir rapidement une grande quantité d'information, précise jusqu'à la molécule ou l'atome, et en biologie cette masse de données enrichit la surveillance de l'évolution des souches pathogènes, de leurs facteurs de virulence ainsi que des molécules chimiques et de leurs pouvoirs toxiques.

Les sciences « omiques », en référence à la génomique, transcriptomique, protéomique, métabolomique (voir encadré) permettent une analyse précise des effets d'une substance xénobiotique (d'origine infectieuse ou toxique) sur l'organisme. Ces techniques permettent notamment l'étude de la réponse du génome à l'exposition d'agents toxiques (toxicogénomique) mais s'avèrent également d'excellents moyens de diagnostic.

La génomique regroupe toutes les analyses de la structure des génomes c'est-à-dire le séquençage et l'identification des gènes.

La transcriptomique et la protéomique s'intéressent au fonctionnement du génome notamment de sa transcription et de la production de protéines.

L'analyse spectrale par des techniques de spectroscopie RMN ou de spectrométrie de masse dites de « haute résolution » permet d'obtenir des informations de plus en plus précises sur la présence d'un composé toxique dans un aliment ou un prélèvement humain. Ces recherches peuvent se faire de manière aussi bien ciblée (la substance xénobiotique est connue) que non ciblée (la substance xénobiotique n'est pas connue). Elles permettent également d'avoir une vision globale du métabolome d'un échantillon biologique et des modifications de celui-ci sous l'action d'un contaminant exogène.



Point de vue

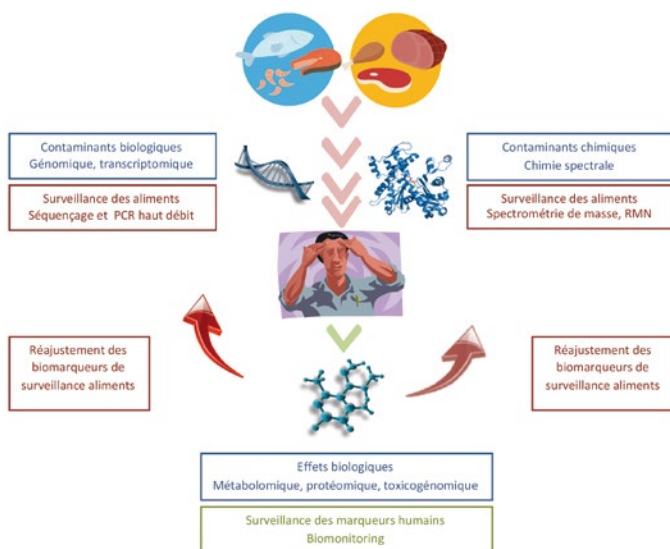


Figure 2: Apports des outils analytiques à la surveillance

L'identification et la quantification précises d'un agent pathogène, d'une substance chimique, des produits de l'expression des gènes d'une cellule ou d'un tissu, des métabolites contribuent à obtenir une véritable « empreinte infectieuse ou toxicologique » d'une denrée alimentaire ou d'un contaminant alimentaire par criblage de bio-marqueurs pertinents.

Les données s'obtiennent de plus en plus vite, de plus en plus nombreuses, mais elles doivent s'accompagner de la compréhension et de l'interprétation des informations qu'elles apportent pour l'objectif recherché : contrôle des produits, évaluation des risques ou surveillance de risques émergents. Un nouveau défi est lancé à la bio-informatique pour l'analyse simultanée d'un très grand nombre de données, ou « big data », issues de ces différentes approches. L'interprétation de ces nombreuses données nécessite de faire appel à des moyens bioinformatiques puissants qui sont maintenant disponibles et permettent une caractérisation des systèmes biologiques d'une grande profondeur. Des avancés sont encore attendues pour construire des systèmes experts qui permettent d'expliquer les relations entre une empreinte génétique ou moléculaire, un biomarqueurs et une toxicité.

Les technologies de communication, d'échanges et d'analyse de données sont en évolution constante ces dernières années. Le rythme d'évolution de ces technologies peut être qualifié de révolution au regard de celui des facteurs de risque. Cependant, nous constatons que les dispositifs mis en place à l'échelle nationale, européenne ou internationale sont encore très cloisonnés, informatifs et peu interactifs.

Certes, il existe des systèmes d'échanges d'information RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed) au niveau européen ou INFOSAN (The International Food Safety Authorities Network) au niveau international, qui permette de diffuser rapidement des informations sur la présence de dangers dans une denrée

alimentaire exportée ou sur l'apparition de nouveaux risques pour le consommateur, mais ils s'appuient majoritairement sur des dangers réglementés, connus et détectables. Dans le cas de notre exemple de crise à *Escherichia coli* O104: H4, ils ne sont pas d'une grande efficacité pour lever les incertitudes sur un danger que l'on n'arrive pas à caractériser.

Des initiatives commencent à prendre forme en Europe pour mieux échanger et mieux analyser les informations nécessaires à la prévention des risques sanitaires alimentaires. Sous l'impulsion de la Commission européenne, l'EFSA (European Food Safety Authority) réfléchit à la mise en place de bases de données de caractérisation génotypique et phénotypique des souches bactériennes issues des aliments en Europe. Les premières bases de données concerneront *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* et *E. coli* enterohémorragique. Ces bases seront en connection avec celles de l'ECDC (European Centre for Disease prevention and Control, afin de mettre en relation les souches cliniques humaines et alimentaires. Espérons que cet outil puisse permettre de prévenir la diffusion de clones bactériens émergents et virulents, de mettre en place les outils de contrôle adaptés et de traiter l'origine de l'agent pathogène le plus rapidement possible.

Une autre initiative est à souligner, celle de l'unité des risques émergents de l'EFSA (EMRISK) qui a mis en place depuis 2010 un réseau d'échange sur les risques émergents avec les organisations partenaires des États membres et des pays tiers. L'EMRISK a pour mandat d'évaluer et de développer des outils pour détecter les risques émergents en alimentation humaine et animale. Elle s'attache à développer un outil informatique de collecte et d'analyse de meta-données disponibles sur le web. Cette approche holistique s'appuie sur des informations relatives à des déclarations de malades et des contaminations d'aliments mais aussi de différents domaines et disciplines comme l'économie, le commerce international, les changements climatiques et les facteurs humains, ou encore des connaissances spécifiques sur les chaînes d'approvisionnement, les zones de distribution, les chaînes de production et les connaissances sur l'élevage et sur les plantes. Les premières analyses réalisées avec cet outil ont montré sa capacité à détecter des signaux très précocement mais des développements doivent être poursuivis pour couvrir plus de médias, de zones géographiques et de bases de données « expert ».

Face aux évolutions des systèmes alimentaires, acteurs publics et privés, gestionnaires et scientifiques disposent d'un arsenal d'outils innovants et puissants. Les sciences « omiques », l'analyse spectrale, la méta-analyse de données de plus en plus nombreuses et précises doivent permettre d'adapter nos outils de surveillance et de faire évoluer nos systèmes de gestion et de maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments. Les dispositifs techniques et les compétences associées se mettent en place progressivement mais, à l'image de la globalisation des échanges, l'efficacité des systèmes de surveillance ne sera optimisée que si le partage des informations et des données s'intensifie, ce qui laisse une belle place aux projets collaboratifs du futur.



Point de vue

Le virus de l'hépatite E : un virus zoonotique d'origine alimentaire qui menace la santé du patient immunodéprimé

F.M. Ruggeri, Dept. Veterinary public health and food safety, Istituto Superiore di Sanità, Rome

L'hépatite E est une forme aiguë de maladie du foie due au VHE, un virus à ARN qui infecte l'espèce humaine et un grand nombre d'espèces animales dont une notamment, le porc, pourrait en être le principal réservoir. Le génotype 1 du VHE, transmis par voie hydrique, est responsable de grandes épidémies dans les régions en développement, mais la transmission zoonotique et alimentaire de souches appartenant au génotype 3 est signalée en augmentation croissante dans les pays développés, où l'hépatite aiguë se caractérise par des symptômes bénins et une faible mortalité. Depuis peu, le VHE de génotype 3 apparaît comme une menace importante pour les sujets immunodéprimés, notamment les patients ayant subi une transplantation d'organe solide, chez lesquels une évolution vers l'infection chronique du foie et la cirrhose est possible, avec une mortalité élevée. Le mode de transmission chez ces patients reste mal connu.

Le virus et son épidémiologie

Le virus de l'hépatite E (VHE) est un virus à ARN simple brin de la famille des *Hepeviridae* (Meng, 2010; Smith *et al.*, 2014), et présente une capsid non enveloppée constituée d'une seule protéine codée par le cadre ouvert de lecture 2 (ORF2). L'ORF1 code pour les protéines du complexe de réplication virale, qui sont clivées par un mécanisme post-traductionnel, tandis que la protéine ORF3 est toujours orpheline d'une fonction bien définie.

Comme pour d'autres virus à ARN, le taux élevé de mutations au cours de la réplication virale est la principale cause de la grande diversité génomique du VHE, à partir de laquelle il est possible de classer les souches sauvages en au moins sept génotypes établis. Quatre d'entre eux, les génotypes g1 à g4, infectent l'espèce humaine, les souches g3 et g4 étant également connues pour infecter plusieurs espèces animales, notamment le porc, le sanglier, les cervidés, le lapin, et d'autres espèces sauvages. Le regroupement de ces génotypes viraux pour former le nouveau genre *Orthohepevirus A* (Smith *et al.*, 2014) a récemment été proposé. La séquence d'acides aminés d'ORF2 déduite et la forte réactivité croisée constatée dans les essais en laboratoire permettent de supposer que malgré des différences génétiques, les souches de VHE g1 à g4 appartiennent toutes à un seul et même sérotype. Toutefois, l'absence de test de séroneutralisation *in vitro* n'a pas permis d'obtenir une caractérisation antigénique entièrement concluante des souches de VHE.

Chez les animaux tels que le porc, le VHE provoque une infection asymptomatique ou infraclinique du foie, bien que des lésions focales du tissu hépatique puissent être décelées en histologie et en immunohistochimie. L'infection chez les êtres humains se passe différemment : elle peut entraîner une hépatite aiguë de gravité variable, mais dans la plupart des cas la maladie régresse et disparaît en quelques semaines sans avoir causé de lésions permanentes du foie (Aggarwal, 2011). Alors que le taux de létalité de l'hépatite E humaine est compris entre 0,5 et 3 %, chez la femme enceinte le taux d'issues fatales peut approcher 30 % des cas, une atteinte qui semble limitée aux génotypes g1 et g2 du VHE. Cette forme grave a été décrite dans les pays d'endémie ayant un faible niveau d'hygiène et d'assainissement en Afrique, en Asie et en Amérique centrale, où se sont produites à maintes reprises de grandes flambées épidémiques d'origine hydrique dues aux génotypes g1 et g2

du VHE, impliquant plusieurs centaines à plusieurs milliers de cas (Aggarwal, 2011).

Aucun foyer épidémique majeur d'infection à VHE d'origine alimentaire (non hydrique) chez l'homme n'a été signalé à ce jour, bien que l'infection par le VHE g3 soit fréquente chez les porcs d'élevage à l'échelle mondiale, et que la présence d'ARN génomique viral dans le foie et d'autres produits dérivés du porc ait été décrite dans plusieurs études. Néanmoins, la transmission par voie alimentaire a été à l'origine de quelques cas sporadiques et de petits foyers épidémiques d'hépatite E, qui sont pour la plupart associés à des souches de VHE g3 génétiquement apparentées aux souches infectant les porcs. Le regroupement, ou « co-clustering », de séquences nucléotidiques d'origine animale et d'origine humaine d'une même zone géographique, va également dans le sens de la transmission zoonotique de ces virus. Outre le rôle joué par les aliments d'origine porcine, des études spécifiques récentes ont montré une augmentation du risque de contracter une hépatite E aiguë chez les populations côtières du Royaume-Uni et d'autres pays, qui mettent en avant les fruits de mer comme facteur de risque éventuel supplémentaire par transmission alimentaire, sans écarter l'implication possible de l'usage récréatif accru de l'eau de mer.

Le diagnostic de l'infection

La réplication limitée du VHE dans les systèmes *in vitro* a été rapportée aussi bien en culture classique qu'en culture tridimensionnelle, mais l'adaptation des souches virales sauvages pour la production efficace de descendants viraux est encore imparfaite ; le porcelet nouveau-né reste donc le seul modèle animal fiable, bien que problématique, de propagation du VHE *in vivo*. Le diagnostic de l'infection chez l'homme ou chez l'animal repose habituellement sur une épreuve sérologique à la recherche d'anticorps sériques IgM ou IgG spécifiques, au moyen de tests du commerce basés sur des antigènes de la capsid virale g1 ou g3 recombinants. Les tests utilisant des protéines virales recombinantes peuvent être facilement adaptés à l'analyse d'espèces animales différentes, et sont largement indépendants de la souche de VHE infectante en raison de la très large réactivité croisée antigénique intergénomique. Les tests de RT-PCR (transcriptase inverse-amplification génique) et, notamment, de RT-qPCR, sont également largement utilisés pour la détection rapide du virus à la fois dans les laboratoires



Point de vue

de recherche et en pratique hospitalière, bien que la durée limitée de la phase virémique chez l'Homme et chez l'animal et la grande variation nucléotidique au sein des souches de VHE posent un problème pour le diagnostic moléculaire. L'excrétion virale dans les selles a été largement documentée chez le porc, et plus de 30 % des excréments de porcs sont généralement détectés positifs pour le VHE à tout moment dans la plupart des élevages porcins en Europe. Toutefois, l'excrétion du VHE n'a aucune signification pronostique chez le porc, et peut difficilement servir d'indicateur de risque pour l'exposition professionnelle ou pour la chaîne alimentaire. Même si l'hépatite E semble toujours avoir une faible prévalence dans l'espèce humaine dans les pays industrialisés, les tests de sérodiagnostic, plus sensibles, récemment mis sur le marché ont détecté une séroprévalence beaucoup plus élevée chez les Hollandais, les Français et d'autres populations de pays occidentaux : entre 30 et 50 % des donneurs de sang en bonne santé (Slot *et al.*, 2013). Ceci amène à émettre l'hypothèse selon laquelle il existerait une infection silencieuse ou des formes infracliniques de la maladie largement répandues dans les régions « non endémiques » du globe, ce qui cadrerait bien avec le risque élevé de transmission alimentaire que laisse présager la prévalence de l'infection à VHE g3 chez le porc, mis en lumière par les indicateurs cliniques chez l'homme.

Si l'on veut recueillir des données permettant d'évaluer les risques, il est souhaitable d'optimiser encore les méthodes déjà très sensibles de détection de la contamination par le VHE dans les denrées alimentaires consommées crues, notamment les fruits de mer, les légumes et les baies, en plus du porc et du gibier, ou dans l'eau de surface. De même, il faudrait que les systèmes de surveillance de l'hépatite aiguë mis en place intègrent la recherche de marqueurs du VHE à une fréquence régulière, comme c'est le cas pour d'autres virus de l'hépatite.

La maladie chez le patient en bonne santé

Dans les régions développées du globe et notamment les pays européens, les formes cliniques de l'infection à VHE de génotype 1 sont toujours prédominantes et surviennent en cas sporadiques, essentiellement chez des sujets ayant récemment séjourné en pays d'endémie dans d'autres continents, mais un nombre croissant de cas d'infection aiguë par le VHE g3 ont été décrits ces dernières années. Ces derniers sont considérés comme des cas autochtones, et un lien possible avec les aliments à risque, en particulier les produits dérivés du porc, a été évoqué à plusieurs reprises.

Même si l'on connaît des patients pédiatriques atteints d'hépatite E, la maladie et les infections touchent plus particulièrement les hommes adultes, ce qui apparaît de manière plus évidente dans les populations des pays industrialisés et laisse à penser que les facteurs de risque d'infection ne sont normalement pas présents chez les enfants. Les raisons de la fréquence plus élevée de la maladie dans la population masculine ne sont pas connues, mais les activités professionnelles et/ou le mode de vie et des facteurs physiologiques liés au sexe pourraient jouer un rôle.

Tout comme l'infection par le génotype g1 dans les populations occidentales, l'hépatite humaine due aux souches g3 est généralement une affection spontanément résolutive qui dure quelques jours à quelques semaines chez

le patient immunocompétent (Kamar *et al.*, 2012). La période d'incubation est normalement de deux à six semaines et les principaux symptômes vont des nausées et de la fièvre aux vomissements, douleurs abdominales, malaise, voire jusqu'à une hépatomégalie, une asthénie et un ictère qui touchent entre 40 et 75 % des patients. Le taux d'alanine aminotransférase (ALT) varie fortement, mais est plus fréquemment compris entre 1 000 et 3 000 UI/ml de sang, et aucune variation particulière du taux d'ALT ne semble associée au génotype viral infectant. Sur le plan clinique, l'hépatite E peut être mal diagnostiquée et confondue avec une lésion hépatique d'origine médicamenteuse, en particulier chez les personnes plus âgées, et il faut prêter attention à la concomitance possible entre l'apparition des symptômes et l'administration d'une polythérapie pharmacologique.

Les biopsies ne sont généralement pas accessibles, compte tenu de l'évolution bénigne de la maladie chez l'homme dans la plupart des cas, et l'on ne dispose toujours pas de description détaillée des atteintes pathologiques et des mécanismes pathogéniques. Les détails sur l'évolution de l'infection proviennent essentiellement du modèle porcin d'infection expérimentale par le VHE dans quelques études menées chez l'animal ces dix dernières années, mais leur importance est quelque peu limitée par l'absence de symptômes cliniques chez le porc.

Chez la femme enceinte, l'infection par les souches de VHE g1 ou g2 est particulièrement agressive, et pour ces sujets par ailleurs en bonne santé, l'insuffisance hépatique fulminante est une cause majeure de décès, avec un risque particulièrement élevé au cours du dernier trimestre de grossesse, sans compter les complications obstétricales. Les raisons d'une fréquence aussi élevée d'issues négatives sont encore incertaines, mais pourraient être liées d'une part au statut de la tolérance immunitaire à l'égard du fœtus, qui s'accompagne d'une activité réduite des lymphocytes T et d'une diminution de la production de cytokines pendant une bonne partie de la grossesse, et d'autre part à la régulation à la baisse de la présentation de l'antigène, ces deux facteurs pouvant se traduire par des modifications significatives du profil hormonal, en particulier la progestérone et les œstrogènes ainsi que la gonadotrophine chorionique (Kamar *et al.*, 2014).

L'hépatite E chez le patient immunodéprimé

Les cas d'hépatites E fatales et fulminantes sont plus fréquents chez les sujets souffrant de maladie sous-jacente chronique du foie, ou chez les patients ayant une infection active à VIH. Ces dernières années, il a été montré que l'infection par le VHE pouvait également évoluer vers l'hépatite chronique et la cirrhose chez les sujets dont l'état de santé est affaibli, en particulier les personnes ayant reçu une transplantation d'organe (rein, cœur, foie, rein-pancréas, moelle osseuse), les patients ayant une hémopathie traitée par chimiothérapie, et les patients co-infectés par le VIH (Kamar *et al.*, 2012). Dans des circonstances similaires, l'infection par le VHE g3 peut entraîner un excès de mortalité par insuffisance hépatique aiguë ou subaiguë, touchant jusqu'à 10 % des cas. Dans tous ces cas, on peut observer une diminution significative des paramètres du statut immunitaire, qui serait due soit au mécanisme pathogénique de l'agent co-infectant, soit à l'immunosuppression induite par



Point de vue

les agents pharmacologiques. En fait, l'hépatite E chronique est rare chez les patients atteints du Sida sous traitement antirétroviral combiné, très vraisemblablement parce que la thérapie maintient la réponse immunitaire anti-VHE à un niveau efficace.

Il est à remarquer que jamais il n'a été fait état d'infections chroniques associées à des génotypes de VHE autres que g3. Les mécanismes de transmission du VHE chez les patients ayant subi une transplantation d'organe ou une transfusion sanguine ne sont pas complètement élucidés, mais la transmission par consommation d'aliments à haut risque de contamination par le VHE, notamment la viande ou les produits à base de porc crus ou mal cuits, semble aussi importante que dans le cas de l'hépatite E aiguë dans la population en bonne santé (Legrand-Abravanel *et al.*, 2010). Même s'il est peu probable que les aliments présentant un risque supérieur de contamination par le VHE, tels que le porc insuffisamment cuit ou l'eau contaminée, fassent partie du régime du patient transplanté, les nouvelles informations obtenues sur la longue durée d'excrétion du VHE, l'état contagieux prolongé probable des sujets sains, et la grande circulation apparente du VHE parmi les sujets asymptomatiques peuvent, à elles toutes, conforter l'idée qu'une primo-infection par le VHE serait la cause de l'hépatite E aiguë symptomatique et de son évolution vers la chronicité dans cette fraction de la population.

Au vu de la séroprévalence élevée récemment démontrée chez les donneurs de sang, le rôle éventuel de la transfusion sanguine et de l'administration de produits dérivés du sang dans la transmission du VHE ne peut être exclu, même si cette voie de transmission n'a pas encore été clairement mise en évidence. L'infection chronique par le VHE, définie comme la persistance d'ARN viral dans le sérum ou les selles du patient pendant au moins six mois (c'est-à-dire pendant > trois mois après l'infection par le virus) chez les sujets transplantés, évolue vers une maladie chronique du foie et une cirrhose respectivement chez environ 60 % et 10 % des cas, généralement trois à cinq ans après une primo-infection par le VHE. Par conséquent, la survenue d'une hépatite E aiguë chez les transplantés d'organes est considérée comme un facteur de risque majeur de maladie hépatique grave qui doit être soigneusement analysé, et appelle à identifier des mesures de prévention et de lutte efficaces dans cette catégorie de patients.

À l'avenir, la vaccination contre le VHE pourrait devenir un préalable indispensable à un pronostic plus favorable de la

transplantation d'organes, ou un moyen de lutte contre l'hépatite E chez les patients présentant des troubles hépatiques ou immunologiques concomitants. Devant la faible prévalence actuelle de l'infection symptomatique aiguë dans la population saine, il est difficile d'imaginer qu'un large recours à la vaccination contre le VHE serait accepté. Des essais cliniques de phase III portant sur un vaccin recombinant contre l'hépatite E ont été conduits en Chine, montrant une sécurité et une efficacité élevées, et ce vaccin a finalement été homologué pour un usage humain, mais pour l'instant limité à ce pays. Les médicaments antiviraux pourraient également être d'une utilisation précieuse pendant le traitement immunosuppresseur des receveurs de greffes ou en cas de survenue d'une hépatite E aiguë. Il est intéressant de noter que dans un petit nombre d'études, des médicaments tels que la ribavirine et l'acide microphénolique se sont révélés efficaces pour juguler l'infection par le VHE et son évolution possible vers la chronicité. Ce résultat signifie que le développement de protocoles chimiothérapeutiques à base d'antiviraux devrait être encouragé et que des mesures en ce sens sont recommandées.

Références bibliographiques

- Aggarwal R. (2011). Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.* 161: 15-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2011.03.017>.
- Kamar N, Bendall R., Legrand-Abravanel F., Xia N.S., Ijaz S., Izopet J., Dalton H.R. (2012). Hepatitis E. *Lancet.* 379: 2477-2488. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)61849-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)61849-7).
- Kamar N., Dalton H.R., Abravanel F., Izopet J. (2014). Hepatitis E virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 27: 116-138. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.00057-13>.
- Legrand-Abravanel F., Kamar N., Sandres-Saune K., Garrouste C., Dubois M., Mansuy J.M., Muscari F., Sallusto F., Rostaing L., Izopet J. (2010). Characteristics of autochthonous hepatitis E virus infection in solid-organ transplant recipients in France. *J. Infect. Dis.* 202: 835-844. <http://dx.doi.org/10.1086/655899>.
- Meng X.J. (2010). Recent advances in Hepatitis E virus. *J. Viral Hepat.* 17: 153-161. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01257.x>.
- Slot E., Hogema BM, Riezebos-Brilman A, Kok TM, Molier M, Zaaijer HL. (2013). Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Euro Surveill.* 18.
- Smith D.B., Simmonds P., Jameel S., Emerson S.U., Harrison T.J., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H., Purdy M.A. (2014). Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95: 2223-2232. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.068429-0>.



Recherche

Cas autochtones d'hépatite E : d'où vient le virus ? Impact des traitements des lisiers de porcs sur la réduction de la charge virale et estimation de la prévalence du virus dans les sept matrices alimentaires

Fabienne Loisy-Hamon^{1,2} (fabienne.loisy@ceeram.com), Géraldine Leturnier¹

1. Ceeram, La Chapelle-sur-Erdre, France

2. BioMérieux Industry, Marcy L'Étoile, France.

Résumé

Au cours des dernières années, plusieurs cas autochtones d'hépatite E et une forte séroprévalence ont été rapportés. Une source potentielle de contamination est la consommation de produits de porc ou d'aliments contaminés par une source environnementale. L'objectif de l'étude était d'évaluer la prévalence de VHE dans les échantillons alimentaires, et non seulement l'évaluation des produits de porc considérés plus à risque ainsi que l'évaluation des lisiers de porcs comme source potentielle de contamination de l'environnement.

Une vaste étude de prévalence a été menée sur 440 échantillons d'aliments collectés chez des industriels de l'agro-alimentaire à l'échelle internationale en 2011 dans le cadre de la prise en compte du risque viral dans leur plan HACCP, comprenant des mollusques bivalves, des fruits, des légumes, des herbes et des épices, de l'eau de process, des plats préparés et des saucisses de foie de porc. Le kit hepatitisE@ceeramTools™ a été utilisé pour la détection par RT-PCR en temps réel. Les échantillons ont également été testés pour norovirus GI, GII et le virus de l'hépatite A. Une étude a également été menée sur les lisiers de porc recueillis auprès de trois élevages porcins positifs pour le VHE afin d'évaluer la persistance du virus dans le lisier après différents traitements.

Les résultats obtenus pour le VHE montrent une prévalence de 0,9 % avec deux échantillons de saucisse de foie de porc positifs, un de poivre et un de poudre de laurier. Sur ces 440 échantillons, les niveaux de prévalence de norovirus GI, GII et VHA étaient de 2,95 %, 8,6 % et 0,45 % respectivement. En ce qui concerne les lisiers de porc non traité, 67 % des prélèvements étaient positifs pour le VHE. Après traitement, 27 % de lisier de porc était encore positifs pour le VHE. Parmi ces prélèvements positifs, 30 % provenaient de lisiers de porc traités par compostage, 50 % après déshydratation et seulement 5,6 % après traitement par digestion anaérobie. Les niveaux de contamination étaient faibles.

À notre connaissance, cette étude est la première menée sur la prévalence du VHE dans des échantillons alimentaires aussi divers pour essayer de comprendre l'origine de cas autochtones d'hépatite E et l'origine possible de la contamination dans les échantillons alimentaires. Nos résultats démontrent que la prévalence du VHE dans les échantillons alimentaires est du même ordre que celle observée pour le VHA. L'épandage de lisier de porc traité ne semble pas être une pratique agricole à risque pour le VHE. Tous ces résultats démontrent que les types d'aliments autres que les produits à base porc ne semblent pas être une source potentielle de contamination. Cette étude pourrait être utile pour évaluer l'origine des cas d'hépatite E humaine, et mieux prévenir les cas autochtones de VHE.

Introduction

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'épidémies d'hépatites aiguës à transmission entérique chez l'Homme, assez similaires à l'hépatite A mais généralement plus sévères (Emerson and Purcell, 2003). Bien que dans la plupart des cas l'hépatite guérisse spontanément, des cas mortels peuvent survenir (un à deux pour cent des cas). Le risque d'hépatite fulminante chez les femmes enceintes peut atteindre 25 % même si de tels cas ont jusqu'ici été décrits uniquement dans les pays émergents (Smith, 2001). Des hépatites chroniques sont aussi de plus en plus fréquemment rapportées, et tout particulièrement chez les patients immunodéprimés (Bihl and Negro, 2009; Gerolami *et al.*, 2008; Kamar *et al.*, 2008). Récemment, de nombreux cas sporadiques d'hépatite E, non liés à des voyages en zone d'endémie, ont été rapportés dans des pays industrialisés. En France, le centre national de référence des hépatites entéro-transmissibles décrit un accroissement important du nombre de cas humains d'hépatite E entre 2002 (9 cas, création du CNR) et 2011 (249 cas), apparenté en partie à un meilleur diagnostic de ce pathogène (Nicand *et al.*, 2011; Roque-Afonso, 2011).

En 1997, Meng *et al.* ont mis en évidence des similitudes génétiques entre un nouveau virus porcin (i.e. VHE porcin) et une souche de VHE humaine (Meng *et al.*, 1997). Cette découverte a suggéré l'implication potentielle de souches de VHE porcins dans les cas humains autochtones. De nombreuses études ont ainsi été conduites dans différentes populations animales et ont montré que le VHE est susceptible d'infecter de nombreuses espèces animales, dont le porc, son réservoir principal (Cooper *et al.*, 2005; de Deus *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 1997). Un lien direct entre la consommation de produits infectés et des hépatites E humaines autochtones a été rapporté à la suite de consommation de viande de cerf crue (Tei *et al.*, 2003), de viande de sanglier crue (Tamada *et al.*, 2004) ou de saucisses de foie crues dénommées figatelli (Colson *et al.*, 2010).

Les mollusques bivalves peuvent concentrer les particules virales au cours du processus de filtration qui accompagne leur mode de nutrition. Le virus de l'hépatite E a été détecté dans des coquillages collectés dans différentes régions d'Europe ou en Asie (Crossan *et al.*, 2012; Donia *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2007). Maunula *et al.* (2013), ont décrit la présence de VHE dans les framboises.

Les porcs infectés par le VHE excrètent le virus pendant trois à quatre semaines en quantité importante. Les pratiques d'élevage porcin permettent donc l'exposition des animaux à de fortes doses de VHE (Kasorndorkbua *et al.*, 2005). Le statut du VHE dans le fumier de lisier de porc stocké dans les installations, telles que les fosses en béton et des bassins de terre, reste à étudier, ainsi que l'impact du traitement des lisiers sur l'élimination du virus de l'hépatite.



Recherche

Les objectifs de cette étude étaient les suivants :

- évaluer la prévalence de VHE, en comparaison avec les prévalences observées pour les norovirus et le virus de l'hépatite A dans des matrices alimentaires diverses prélevées chez des industriels dans le cadre d'un plan HACCP en incluant un minimum de produits à base de foie de porc ;
- déterminer si l'épandage des produits issus des traitements de lisiers de porcs présentait une pratique à risque pouvant conduire à la contamination de végétaux.

Matériels et méthodes

Virus de l'hépatite E, Mengo virus et échantillons

Les développements et validations de la méthode de détection du virus de l'hépatite E ont été réalisés avec le standard international WHO existant pour ce virus. Ce standard correspond à un plasma positif en VHE et titré en unité internationale à 250 000 UI/mL. Des selles de porcs positives en VHE fournies par l'Anses (Dr Nicolas Rose, unité Épidémiologie et bien-être du porc, Laboratoire de Ploufragan-Plouzané, France) ont permis de compléter ces validations.

Le Mengo virus VMC0, utilisé comme contrôle de process, provient du kit ceeramTools® Mengo Extraction Control (Ceeram, La Chapelle/Erdre, France). En accord avec l'ISO/TS 15216, un rendement de 1 % en Mengo virus valide le process. La recherche de virus alimentaire tels que Norovirus (NV), virus de l'hépatite A et E (VHA et VHE) par RT-PCR en temps réel a été réalisée sur 441 échantillons de matrices alimentaires variées (**Tableau 1**) soumises à analyse virale dans le cadre des plans HACCP d'entreprises agro-alimentaires établies en Europe permettant d'établir des données de prévalence.

Les matrices analysées lors de cette étude sont les suivantes : 230 échantillons d'herbes et épices variées, 77 fruits variés, 62 eaux de process, 36 coquillages (huîtres et moules), 20 plats préparés (ne contenant pas de porcs), 12 légumes et 4 figatelles.

Ces matrices analysées ont majoritairement une origine européenne mais également asiatique ou africaine (pour les épices par exemple). Les informations précises sur la provenance des échantillons sont cependant difficiles à obtenir et ne sont pas détaillées dans cet article.

122 échantillons de selles et lisiers de porcs et 44 échantillons de composts issus d'une étude sur le terrain ont été récoltés pour évaluer l'impact des différentes méthodes de traitement du lisier de porc (épandage, compostage, méthanisation, déshydratation). Deux réseaux de collectes ont été utilisés : un réseau privé de laboratoires vétérinaires du Morbihan et l'Anses (Dr Nicolas Rose). Les prélèvements ont été réalisés à différentes étapes de traitement du lisier dans des fermes porcines situées en Bretagne. Le procédé de traitement a été évalué par prélèvement d'échantillons aux différentes étapes en fonction du traitement appliqué : matières fécales, compost, eaux brutes et traitées, et eaux boueuses semi-liquides issues de lagunage.

Elution / concentration des particules virales dans les matrices alimentaires et extraction des ARN viraux

Pour les échantillons de coquillages, fruits/légumes et herbes/épices, la méthode développée dans la norme ISO/TS 15216 a été appliquée. Brièvement, après ajout de Mengo virus

VMC0, un traitement à la protéinase K est réalisé sur 2g de tissus digestifs de coquillages par incubation 1h à 37°C puis 15 min à 60°C. Après centrifugation à 3000 g à température ambiante pendant 5 min, le surnageant est collecté. La lyse des capsides virales est réalisée sur 500 µL de surnageant en utilisant le tampon de lyse NucliSens® (BioMérieux) par incubation à 56°C pendant 30 min. Les ARNs sont ensuite extraits et purifiés avec les réactifs NucliSens® (BioMérieux) selon les recommandations du fournisseur.

À 25 g d'échantillons de fruits ou légumes et 5 g d'herbes séchées ou d'épices sont ajoutés 40 mL de tampon TGBE (tampon Tris Glycine, extrait de bœuf, pH 9,5) et le contrôle d'extraction Mengo virus VMC0. Les sacs sont mis sous agitation constante 20 minutes à température ambiante. Le surnageant obtenu est centrifugé 20 min à 10000 g à 4°C. Le pH est ajusté à 7,2 +/- 0,2. Les particules virales sont précipitées avec du polyéthylène glycol (PEG) (1/4 Vol) sous agitation pendant 1h à 4°C puis centrifugés 30 min à 10000 g. Le culot est ensuite mis en suspension dans 500 µL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est conservée pour la lyse. Les acides nucléiques sont extraits comme décrit précédemment.

Pour les échantillons d'eau de process majoritairement chargés en particules, une méthode alternative, plus adaptée que la norme ISO/TS 15216, a été appliquée. Un litre est concentré par filtration tangentielle sur cassette de filtration (Sartorius) après ajout de Mengo virus VMC0. Après rinçage de la cassette avec 20 mL de tampon glycine, un concentrat de 40 mL est obtenu. Une concentration secondaire est ensuite réalisée par incubation en PEG 50 % pendant une heure à 4°C puis centrifugation à 11000 g à 4°C pendant 20 min. Le culot est ensuite mis en suspension dans 1 mL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est collectée et les virus lysés puis les acides nucléiques extraits comme décrit précédemment.

En ce qui concerne les figatelles (saucisse de foie de porc cru), le process développé par le laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort, unité Virus entériques (Martin-Latil *et al.* 2015, EuroRéférence, ce numéro) a été appliqué. Brièvement, 30 mL d'eau distillée est ajoutée à 3 g de la matrice qui est broyée au Stomacher (2 min, 260 rpm). L'élution est réalisée à température ambiante sous agitation pendant 10 minutes après ajout de Mengo virus VMC0. L'homogénat est clarifié par centrifugation (8000 g, 15 min, 4°C) puis les particules virales sont précipitées avec du polyéthylène glycol (PEG) (1/4 Vol) pendant 2h à 4°C et concentrées par centrifugation à 8000 g pendant 30 min. L'éluat est récupéré pour la lyse.

Elution / concentration des particules virales dans les selles/lisiers et composts de porcs et extraction des ARN viraux

Une suspension de selles ou de lisiers de 10 à 50 % est préparée en PBS. La suspension est ensuite clarifiée par centrifugation à 4°C pendant 30 min à 3000 g. Le surnageant est collecté puis clarifié par une seconde centrifugation à 4°C de 15 min à 10000 g. Si le surnageant obtenu n'est pas clair, la seconde étape de centrifugation est répétée. La lyse et l'extraction des ARNs sont réalisées sur 500 µL de suspension avec les réactifs NucliSens® (BioMérieux) comme décrit précédemment.



Recherche

Pour les échantillons « solides » (exemple de compost sur sciure), 5 g d'échantillon ont été prélevés et transférés dans un sac à filtre contenant 40 mL de tampon TGEB (tampon Tris Glycine, extrait de bœuf, pH 9,5). Les sacs sont mis sous agitation constante 20 min à température ambiante. À travers le filtre, le surnageant est récupéré puis centrifugé 20 min à 10 000 g à 4°C. Le pH du surnageant obtenu est ajusté à 7,2 +/- 0,2. Ensuite, 10 mL de PEG-NaCl 5X sont ajoutés à 40 mL de surnageant et mis sous agitation pendant 1h à 4°C puis centrifugés 30 min à 4°C à 11 000 g. Le culot est ensuite mis en suspension dans 1 mL de PBS1X puis clarifié par chloroforme/butanol. Après 15 min de centrifugation à 13 500 g à 4°C, la phase aqueuse supérieure est collectée et les virus lysés puis les acides nucléiques extraits.

Pour les échantillons « semi-liquides » (prélèvements dans bassin de décantation et bassin de lagunage), un protocole proche de celui réalisé pour l'extraction du VHE dans des selles ou des lisiers est appliqué. 3 mL d'échantillons sont prélevés pour suivre le protocole décrit précédemment.

RT-PCR quantitative

Les extraits d'acides nucléiques obtenus sont testés avec le kit de RT-PCR en temps réel HepatitisE@ceeramTools™ en suivant les recommandations fournisseur sur les appareils SDS7300 ou SDS7500 (Applied biosystems). Sur les extraits d'ARN issus de matrice alimentaire ont également été recherchés les NoVGI et GII et le VHA avec les kits de RT-PCR en temps réel norovirusGI@ceeramTools™, norovirusGII@ceeramTools™ et HepatitisA@ceeramTools™ (ceeram, La Chapelle/Erdre, France). Des contrôles positifs contenant des ARN extraits de suspensions de virus et un contrôle négatif contenant tous les réactifs en dehors de l'extrait d'ARN ont été inclus dans chaque série d'expériences. Le contrôle interne d'amplification (IPC) contenu dans le kit HepatitisE@ceeramTools™ permet de valider chaque réaction. De plus, chaque extrait d'ARN est testé non dilué et dilué au 1/10^e en duplicat. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de cycle seuil (cycle threshold) (Ct). Une courbe standard pour chaque cible virale a été produite en utilisant une gamme de dilutions de suspension virale. Les rendements d'extraction du Mengo virus ont été calculés pour chaque échantillon à partir de la courbe standard correspondante.

Résultats

Evaluation de la prévalence du VHE dans les aliments

Le plan d'échantillonnage réalisé pour l'étude de prévalence comprend l'ensemble des matrices à risque décrit dans l'ISO/TS 15216 et dans la directive sur l'application des principes généraux d'hygiène alimentaire à la maîtrise des virus dans les aliments. Ces échantillons ont été analysés dans le cadre d'autocontrôle pour la prise en compte du risque viral dans un plan HACCP. Le nombre d'échantillons par type de matrice alimentaire a cependant été dépendant des activités de production des entreprises agro-alimentaires liées à cette étude.

Sur les 441 échantillons analysés, sept types de matrice étaient représentés. Les analyses ont été réalisées en 2011. Pour l'ensemble de ces échantillons, un rendement minimum de 1 % du Mengo virus vMCO a été obtenu permettant de valider les résultats obtenus.

Parmi les 441 échantillons analysés, la présence de génomes du VHE a été trouvée dans deux figatelles sur quatre et dans deux herbes et épices sur 230, ce qui correspond à une prévalence d'environ 0,9 % d'aliments contaminés par le VHE. La prévalence pour l'ensemble des échantillons analysés ne comprenant pas de porcs est de 0,46 % et de 0,9 % pour les échantillons d'herbes et épices uniquement contre 50 % pour les échantillons de figatelles à base de foie de porc. Les Ct obtenus pour les échantillons de figatelles sont de 31,23 correspondant à une quantité de 4 775 copies de génomes/g et 30,18 correspondant à 9 603 copies de génomes/g. Les Ct des échantillons de poivre et de poudre de laurier sont de 36,4 et 37,2 respectivement. La charge virale de ces échantillons n'est pas quantifiable, elle est inférieure à 500 copies de génome/prise d'essai, ce qui correspond à la limite de quantification de la méthode.

Le génotypage des échantillons identifiés positifs n'a pas été effectué car la charge virale trop faible ne permet pas d'obtenir suffisamment de matériel pour un résultat exploitable.

Sur les mêmes échantillons, les taux de prévalence pour Norovirus GI, Norovirus GII et le virus hépatite A étaient de 2,95 %, 8,6 % et 0,45 % respectivement. Le nombre d'échantillons positifs et la prévalence par matrice analysée est détaillé dans le **Tableau 1**.

Pour la matrice la plus représentée dans cette étude, les herbes et épices, le taux de prévalence pour VHE, VHA et NoVGII est du même ordre (<1 %). Pour NoVGI, 8 échantillons ont été identifiés positifs sur 230 analysés, correspondant à une prévalence, plus élevée que pour les autres virus, de 3,5 %.

Tableau 1. Données de prévalence sur les matrices alimentaires analysées

Type de matrice	Nombre d'échantillons analysés	Nombre de positifs VHE	Prévalence HEV (en %)	Autres virus alimentaires Nombres d'échantillons positifs (prévalence en %)		
				NoVGI	NoVGII	VHA
Herbes et épices	230	2	0,9	8 (3,50)	1 (0,45)	1 (0,45)
Fruits	77	0	0	0 (0)	2 (2,60)	0 (0)
Eaux de process	62	0	0	0 (0)	3 (4,85)	0 (0)
Coquillages (huîtres, moules)	36	0	0	5 (13,9)	32 (88,9)	0 (0)
Plats préparés	20	0	0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Légumes	12	0	0	0 (0)	0 (0)	1 (8,3)
Figatelles	4	2	50	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Total	441	4	0,9	13 (2,95)	38 (8,6)	2 (0,45)



Recherche

Evaluation des traitements des lisiers de porc sur l'abattement en charge virale du VHE

Parmi les 20 élevages sélectionnés initialement, trois élevages (a, b et c) se sont révélés positifs à des taux de VHE suffisamment élevés pour réaliser l'étude. Un total de 123 échantillons de lisiers bruts prélevés dans les fosses ou sous les animaux dans différentes salles a été analysé. La présence d'acides nucléiques du VHE a été identifiée dans 82 échantillons, soit 67 % d'échantillons de lisiers positifs. Les résultats obtenus sur les lisiers pour les différents élevages sont présentés dans le **Tableau 2**.

Tableau 2. Échantillons de lisiers et lisiers traités analysés par élevage

	Nombre échantillons	Nombre lisiers	Nombre lisiers positifs	Nombre d'échantillons issus traitement	Nombre d'échantillons issus traitement positifs
Élevage a	58	48	26	10	3
Élevage b	70	54	43	16	11
Élevage c	38	20	13	18	1
Total	166	122	82	44	12

Parmi ces échantillons positifs, la concentration en virus est cependant variable. Pour l'élevage a, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités observés s'échelonnent entre absence de détection et $1,46 \cdot 10^6$ copies de génomes/g avec une moyenne plus faible sur l'ensemble de l'élevage à $2,26 \cdot 10^4$ copies de génomes/g. Concernant l'élevage b, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités observés s'échelonnent entre absence de détection à $3,97 \cdot 10^5$ copies de génomes/g avec une moyenne de $2,53 \cdot 10^4$ copies de génomes/g pour l'ensemble de l'élevage. Pour l'élevage c, les niveaux de contamination dans les lisiers non traités varient entre une absence de contamination et $7,74 \cdot 10^3$ copies de génomes/g avec une moyenne de $1,5 \cdot 10^3$ copies de génomes/g pour les échantillons positifs, pour l'ensemble de l'élevage.

Chacun des élevages possédant un système de traitement propre, trois types de traitements ont été évalués. L'élevage a sélectionné utilise un traitement des lisiers par compostage sur sciure.

L'élevage b utilise une station de traitement de déshydratation des lisiers conduisant à trois types de produits pouvant être exploités : compost fermenté, surnageant de bassin de décantation, eau de lagunage.

L'élevage c utilise également une station de traitement de digestion anaérobie du lisier conduisant à trois types de produits pouvant être exploités : lisier brut, lisier traité et eau de lagunage. Les résultats obtenus dans les différents élevages figurent dans le **Tableau 3**.

Sur les 166 échantillons analysés, 122 sont des échantillons de lisiers et 44 sont des échantillons issus de traitement des lisiers. Sur ces 122 échantillons, 82 (67 %) ont été identifiés comme positifs en VHE avec des niveaux de contamination allant de 118 copies de génome/g à $1,46 \cdot 10^6$ copies de génomes/g.

Pour les échantillons issus des traitements, la présence du VHE a été identifiée dans 12 échantillons soit 27 % des échantillons issus de traitement à des niveaux de concentration allant de 85 copies de génome/g à $3,34 \cdot 10^4$ copies de génomes/g.

Dans l'élevage a traitant les lisiers par compostage sur sciure, sur les dix composts analysés, trois ont été trouvés positifs en VHE avec des niveaux de contamination faible de 17 à 740 copies de génomes/g

Dans l'élevage b utilisant une station de traitement des lisiers, sur les six échantillons de compost testés, trois ont été trouvés négatifs. Pour les trois autres, des contaminations de 100 à 6 680 copies de génomes/g ont été détectées. Quatre échantillons de bassins de décantation ont été testés : tous présentaient une contamination positive en VHE allant de 80 000 à 600 000 copies de génomes/mL. Pour l'échantillon de bassin de lagunage testé, 1 030 copies de génome/mL ont été détectées.

Dans l'élevage c, pour les six échantillons de lisier brut prélevés dans la station, un seul a été identifié comme positif à 416 copies de génome/g. Pour les douze autres échantillons prélevés dans la station correspondant au lisier traité ou bassin de lagunage, aucun échantillon n'a été identifié positif.

En moyenne, la quantité de VHE détectée dans les échantillons de lisiers traités est plus faible que dans les échantillons de lisiers non traités.

De manière plus détaillée, les niveaux d'abattement en VHE sont décrits dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Bilan de l'impact des traitements

	Lisier brut charge virale		Type de traitement	Traitement		Abattement logarithmique de la charge virale (charge initiale - charge après traitement)
	Copies/g	Log10		Charge virale après traitement		
			Copies/g ou mL	Log10		
Élevage a	$2,26 \cdot 10^4$	4,35	compostage	294	2,47	1,88
compost fermenté			4 117	3,61	0,79	
Élevage b	$2,53 \cdot 10^4$	4,4	surnageant de décantation	$2 \cdot 10^4$	4,3	0,1
			bassin de lagunage	1 030	3,01	1,39
Élevage c	$1,5 \cdot 10^3$	3,17	lisier brut après traitement anaérobie	416	2,62	0,56
			lisier traité	0	0	3,17
			bassin de lagunage	0	0	3,17



Recherche

Dans l'élevage a traitant les lisiers par compostage sur sciure, un abattement logarithmique de la charge virale de 1,88 est observé.

Dans l'élevage b utilisant une station de traitement, l'abattement moyen sur l'ensemble des échantillons traités est de 0,76. L'abattement est de 0,79 dans le compost fermenté, 0,1 dans le surnageant de décantation et de 1,39 dans le bassin de lagunage.

Dans l'élevage c, un abattement moyen de 3,29 a été calculé. L'abattement est de 0,56 dans le lisier brut et de 3,17 dans le lisier traité comme dans le bassin de lagunage.

Discussion

La première partie de l'étude avait pour objectif d'évaluer la prévalence du VHE dans différentes matrices alimentaires et non seulement les produits identifiés à risque à base de porc. Cette vaste étude sur 441 échantillons a mis en évidence une prévalence de 0,9 % de VHE dans l'ensemble des matrices alimentaires. Ce taux de prévalence est inférieur à celui observé pour les norovirus dans ces mêmes échantillons. Cependant, il est du même ordre que celui trouvé pour le virus de l'hépatite A. Dans les travaux réalisés par Maunula *et al.* (2013), une prévalence de 0,98 % du VHE est décrite dans les framboises. Ces données sur la framboise sont en corrélation avec le taux de prévalence global identifié dans cette étude.

La prévalence de VHE dans la matrice la plus représentée de cette étude, 230 échantillons d'herbes et épices est identique au taux de prévalence retrouvé dans l'ensemble des échantillons. Par ailleurs, le taux de prévalence de VHA et NoVGII de 0,45 % est comparable aux données retrouvées pour VHE contre 3,5 % pour NoVG1. Ces herbes et épices sont principalement produites dans des zones tropicales d'Afrique, d'Amérique du Sud et d'Asie, le plus souvent de manière traditionnelle. Ces produits sont exposés à de nombreuses sources de contamination, notamment microbiologique: irrigation avec de l'eau de qualité sanitaire insuffisante, contact avec la terre et avec des amendements biologiques non traités, manipulation par des agriculteurs/cueilleurs potentiellement vecteurs de contamination. Le caractère zoonotique du VHE peut également laisser supposer une contamination animale contrairement au VHA et aux Norovirus qui ne possèdent pas de réservoirs animaux. L'analyse des données bibliographiques relatives à la qualité microbienne de ces matières premières montre que les échantillons présentent une contamination extrêmement diversifiée avec la présence de bactéries d'origine entériques, de levures et de moisissures en quantités importantes notamment dans les produits non traités (McKee *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 2001; Omafuvbe *et al.*, 2004; Hara-Kudo *et al.*, 2006; Choo *et al.*, 2007). Les données obtenues dans notre étude confirment le caractère potentiellement à risque de ces matrices par la présence de virus entériques. Ces données doivent cependant être relativisées, la charge virale de ces échantillons est très faible et doit être mise en corrélation avec la dose infectieuse humaine.

Concernant les autres matrices, Serracca *et al.* (2012) n'ont pas démontré la présence de VHE dans les plats préparés

(110 échantillons). Ces résultats confirment ceux de notre étude sur ce même type de matrice alimentaire. Aucun échantillon de mollusques testés n'a été trouvé positif en VHE. A contrario, sur 153 échantillons de mollusques testés, Diez-Valcarce *et al.* (2012) ont démontré un taux de positivité en VHE de 3 %. Ces données soulignent que les mollusques bivalves peuvent constituer des matrices plus à risque pour le VHE comme pour les norovirus GI et GII et le virus hépatite A en raison de leur caractère filtreur pouvant concentrer les virus présents dans un environnement contaminé. Dans notre étude, deux des échantillons de produits à base de foie de porc cru (figatelle) sur quatre présentaient une contamination en virus de l'hépatite E. Ces données sont en accord celles de Martin-Latil *et al.* (EuroRéférence, 2015, ce numéro) pour lesquelles un produit à base de foie de porc sur trois présentait une contamination en VHE. Les données de cette étude ont permis de mettre en évidence un taux de prévalence de VHE équivalent au VHA ainsi qu'une variabilité de la présence du virus en fonction des matrices analysées.

L'évaluation des lisiers de porcs comme source potentielle de contamination de l'environnement et des aliments a fait l'objet de la deuxième partie cette étude. Trois élevages de porcs ont été identifiés comme positifs avec l'avantage de posséder trois systèmes de traitement du lisier distincts. Les niveaux moyens d'ARN de virus de l'hépatite E retrouvés dans les différents élevages sont relativement constants (10^4 copies de génome par gramme de lisier) sauf pour l'élevage c où une charge virale inférieure a été détectée (10^3 copies de génome par gramme de lisier). Les charges retrouvées dans les produits finaux issus des traitements sont relativement faibles voire très faibles pour l'élevage c, où la charge virale était initialement plus faible. Ces données sont en corrélation avec les études publiées (Kasordorkbua *et al.*, 2005; McCreary *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2013).

Le traitement par compostage utilisé pour l'élevage a semblé relativement efficace puisqu'une très faible concentration d'ARN viral est retrouvée dans le produit final. Garcia *et al.* (2013) ont démontré qu'après compostage, le produit final ne présentait pas de contamination en VHE et suggère une utilisation sans risque en tant que fertilisant agricole. Le traitement utilisé pour l'élevage c semble efficace puisqu'une très faible contamination a été retrouvée dans un seul produit final. Pour l'élevage b, les niveaux de contamination retrouvés dans les différents produits de traitement semblent plus à risque. Les résultats retrouvés dans le surnageant du bassin de décantation et dans le bassin de lagunage sont en accord avec l'étude de Kasordorkbua *et al.* (2005). Dans leur étude, les auteurs ont montré que le VHE retrouvé dans les fosses et les lagunes était infectieux après inoculation à des cochons. L'utilisation du surnageant de bassin de décantation pour un usage agricole de type production de fruits et légumes pourrait éventuellement conduire à une contamination des végétaux. Cette dernière pourrait donc constituer un risque potentiel pour l'homme en cas de consommation. La question de la dose infectieuse humaine reste cependant posée.



Recherche

En conclusion, nos résultats démontrent que la prévalence du VHE dans les échantillons alimentaires est du même ordre que le VHA pour des matrices telles qu'herbes et épices. L'origine des contaminations avec le VHE n'a pas pu être mise en évidence, les activités humaines (directe ou indirecte avec de l'eau contaminée) ou animales (épardage, vie sauvage) pouvant être à l'origine de ces contaminations. Le suivi réalisé sur les lisiers de porcs et les produits résultant de son traitement démontre cependant que l'épardage de lisier de porc traité ne semble pas être une pratique agricole à risque pour le VHE.

Remerciements

La partie de l'étude concernant l'impact du traitement des lisiers porcins sur l'élimination du virus de l'hépatite E a été financée par l'Agence nationale de la recherche (projet HEVECODYN ANR-2010-CESA-010).

Références bibliographiques

Bihl, F., F. Negro. 2009. Chronic Hepatitis E in the Immunosuppressed: A New Source of Trouble? *J Hepatol*, 50: 435-37.

Choo, E., S.S., Jang, K., Kim, K.G., Lee, S., Heu, S., Ryu. 2007. Prevalence and genetic diversity of *Bacillus cereus* in dried red pepper in Korea. *J Food Prot*, 70: 917-922.

Colson, P., P. Borentain, B. Queyriaux, M. Kaba, V. Moal, P. Gallian, L. Heyries, D. Raoult, R. Gerolami. 2010. Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *J Infect Dis*, 202: 825-34.

Cooper, K., F. F. Huang, L. Batista, C. D. Rayo, J. C. Bezanilla, T. E. Toth, et X. J. Meng. 2005. Identification of Genotype 3 Hepatitis E Virus (HEV) in Serum and Fecal Samples from Pigs in Thailand and Mexico. Where Genotype 1 and 2 HEV Strains Are Prevalent in the Respective Human Populations. *J Clin Microbiol*, 43, : 1684-88.

Crossan, C., P. J. Baker, J. Craft, Y. Takeuchi, H. R. Dalton, L. Scobie. 2012. Hepatitis E Virus Genotype 3 in Shellfish, United Kingdom. *Emerg Infect Dis*, 18: 2085-87.

De Deus, N., M. Casas, B. Peralta, M. Nofrarias, S. Pina, M. Martín, J. Segalés. 2008. Hepatitis E Virus Infection Dynamics and Organic Distribution in Naturally Infected Pigs in a Farrow-to-Finish Farm. *Vet Microbiol*, 132: 19-28.

Diez-Valcarce, M., P. Kokkinos, K. Söderberg, M. Bouwknecht, K. Willems, A.6M. de Roda-Husman, C.-H. von Bonsdorff, et al. 2012. Occurrence of Human Enteric Viruses in Commercial Mussels at Retail Level in Three European Countries ». *Food Environm Virol*, 4: 73-80.

Donia, D., M. C. Dell'Amico, A. R. Petrinca, I. a Martinucci, M. Mazzei, F. Tolari, M. Divizia. 2012. Presence of Hepatitis E RNA in Mussels Used as Bio-Monitors of Viral Marine Pollution. *J Virol Met*, 186: 198-202.

Emerson, S.U., R. H. Purcell. 2003. Hepatitis E Virus. *Revi Med Virol*, 13: 145-54.

García, M., S. Fernández-Barredo, M. T. Pérez-Gracia. 2014; Detection of Hepatitis E Virus (HEV) through the Different Stages of Pig Manure Composting Plants. *Microb Biotechn*, 7 : 26-31.

García S., F., Iracheta, N., Heredia. 2001. Microbiological Survey of retail herbs and spices from Mexican markets. *J Food Protect*, 64: 99-103.

Gérolami, R., V. Moal, C. Picard, P. Colson. 2009. Hepatitis E Virus as an Emerging Cause of Chronic Liver Disease in Organ Transplant Recipients. *J Hepatol*, 50: 622-24.

Hara-Kudo, Y., L.K., Ohtsuka, Y., Onoue, Y., Otomo, I., Furukawa, A., Yamaji, Y., Segawa, K., Takatori. 2006. *Salmonella* prevalence and total microbial and spore populations in spices imported to Japan. *J Food Prot*, 69: 2519-2523.

ISO/TS_15216-2, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

ISO/TS_15216-2, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

Kamar, N., J. Selves, J.-M. Mansuy, L. Ouezzani, J.-M. Péron, J. Guitard, O. Cointault, et al. 2008. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*, 358: 811-17.

Kasorndorkbua, C., T. Opriessnig, F. F. Huang, D. K. Guenette, P. J. Thomas, X.-J. Meng, P. G. Halbur. 2005. Infectious Swine Hepatitis E Virus Is Present in Pig Manure Storage Facilities on United States Farms, but Evidence of Water Contamination Is Lacking. *Appl Environm, Microbiol*, 71: 7831-37.

Martin-Latil, S., C. Hennechart-Colette, S. Perelle. 2014. Method for HEV detection in raw pig liver products and its implementation for naturally contaminated food. *Euroreference*, this issue.

Maunula, L., A. Kaupke, P. Vasickova, K. Söderberg, I. Kozyra, S. Lazić, W. H.M. van der Poel, et al. 2013. Tracing enteric viruses in the European berry fruit supply chain. *Intern J Food Microbiol*, 167: 177-85.

McCreary, C., F. Martelli, S. Grierson, F. Ostanello, A. Nevel, M. Banks. 2008. Excretion of Hepatitis E Virus by pigs of different ages and its presence in slurry stores in the United Kingdom. *Vet Rec*, 163: 261-65.

McKee L.H. 1995. Microbial contamination of spices and herbs: A review. *Food Sc. Tech*. 28: 1-11

Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, S. U. Emerson. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human Hepatitis E Virus. *PNAS*, 94: 9860-65.

Nicand, E., Enouf, V., Caron, M., 2005. Hépatite E, bilan d'activité du Centre national de référence des hépatites entéro-transmissibles, France, 2002-2004. *BEH*, 33, 167-168.

Omafuvbe, B.O., D.O., Kolawole. 2004. Quality Assurance of Stored Pepper (*Piper guineense*) Using Controlled Processing Methods. *Pakistan J Nutr*, 3: 244-249.

Roque-Afonso, A.M., 2011. Rapport d'activité du CNR des virus des hépatites à transmission entérique A et E. 36 pp.

Serracca, L., I. Rossini, R. Battistini, M. Goria, S. Sant, G. De Montis, C. Ercolini. 2012; Potential Risk of Norovirus Infection due to the Consumption of "Ready to Eat" Food. *Food Environm Virol*, 4: 89-92.

Smith, J. L. 2001. A Review of Hepatitis E Virus. *J Food Protect*, 64: 572-86.

Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsuhashi, O. Inoue, F. Mawatari, H. Ishibashi. 2004; Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J Hepatol*, 40: 869-70.

Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, S. Mishiro. 2003. Zoonotic Transmission of Hepatitis E Virus from Deer to Human Beings. *Lancet*, 362, 9381: 371-73.

Tian-Cheng, L., T. Miyamura, N. Takeda. 2007. Detection of Hepatitis E Virus RNA from the Bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula Japonica*) in Japan. *Am J Trop Med Hyg*, 76: 170-72.



Méthodes

Détection du virus de l'hépatite E dans les aliments à base de foie cru de porc par une méthode de RT-PCR quantitative.

Sandra Martin-Latil, Catherine Hennechart-Collette, Sylvie Perelle

Université Paris-Est, Anses, Laboratoire de sécurité des aliments de Maisons-Alfort et Boulogne-sur-Mer, Unité Virologie des aliments et de l'eau, 14 rue Pierre et Marie Curie, Maisons-Alfort, France

Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable d'épidémies d'hépatites aiguës dans les pays à faible niveau d'hygiène. Plus récemment, il a été clairement défini comme responsable de cas sporadiques d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés chez des patients n'ayant jamais séjourné en zone d'endémie. Entre 2007 et 2009, des produits alimentaires à base de foie de porc cru ont été suspectés, à plusieurs reprises, d'être à l'origine de cas d'infections autochtones d'hépatite virale E en France. Dans le cadre du plan de surveillance (DGAL/SDSSA/N2010-8330) de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc au stade de la production mené en 2011, une méthode de détection quantitative du génome viral de l'hépatite E (VHE) dans les matrices carnées a été développée et utilisée pour analyser 70 échantillons. Cette méthode est basée sur une détection quantitative du génome viral de l'hépatite E par RT-qPCR et sur l'utilisation d'un contrôle de processus (norovirus murin, MNV-1) pour valider l'analyse. Nos résultats montrent qu'environ un tiers des figatelles et des saucisses à base de foie de porc contiennent du génome viral du VHE et que la charge virale retrouvée dans les échantillons positifs est > 103 copies génomes de VHE par gramme dans 55 % des échantillons.

Mots-clés: RT-qPCR, détection quantitative, virus de l'hépatite E, norovirus murin, contrôle de processus, aliments avec du foie cru de porcs.

Introduction

Le virus de l'Hépatite E (VHE) se transmet essentiellement par voie digestive après ingestion d'eaux ou d'aliments contaminés. Le VHE est reconnu comme l'agent principal d'hépatites aiguës dans les pays à faible niveau d'hygiène où il évolue selon un mode endémo-épidémique. Les génotypes 1 et 2 sont présents chez l'homme dans les régions d'endémie alors que le génotype 3 et moins fréquemment le 4 sont responsables de cas sporadiques d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés. En 2009, l'Afssa a émis deux rapports (saisines 2009-SA-0101 ; 2009-SA-0146) soulignant le risque d'infection par le VHE suite à l'ingestion de figatelles (saucisses crues à base de foie de porc). Les recommandations issues de ces travaux et la mise en cause de produits à base de foie de porc dans les cas d'infections autochtones d'hépatite E ont souligné l'importance de disposer d'une technique sensible et fiable pour la détection du VHE dans les aliments.

La mise en place de méthodes de détection dans le domaine du diagnostic viral en hygiène alimentaire est fondée sur la détection des ARN viraux par des méthodes de RT-qPCR sensibles et spécifiques. Les deux principales difficultés rencontrées pour cette détection sont liées à la faible concentration des virus dans les aliments et à la présence de substances inhibitrices de la réaction de PCR dans les échantillons. En 2013, la spécification technique relative à la détection des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les aliments a été publiée (ISO/TS_15216-1, 2013; ISO/TS_15216-2, 2013). Le virus de l'hépatite E, encore considéré comme émergent, n'avait pas été identifié comme prioritaire lors de l'initiation du travail de normalisation des méthodes de détection en virologie alimentaire. Cependant, les recommandations générales du Comité Européen de normalisation (CEN/TC275/WG6/TAG4) concernant le diagnostic viral en hygiène des aliments prévoient une série de contrôles (contrôle négatif d'extraction, contrôle du processus d'extraction de virus, contrôle positif et négatif de RT-PCR, contrôle d'inhibition de RT-PCR). L'ajout d'un contrôle de processus à chacun des échantillons à analyser

est primordial, car il permet de mesurer l'efficacité de leur traitement et d'évaluer la présence d'inhibiteurs des réactions d'amplification par PCR. La connaissance du rendement moyen obtenu pour le contrôle de processus dans une matrice donnée permet également de définir le niveau de rendement acceptable pour valider l'analyse de l'échantillon.

Dans le cadre du plan de surveillance réalisé en 2011, l'objectif de cette étude était de développer/valider une méthode d'extraction et de détection du génome viral du VHE par RT-PCR quantitative dans des matrices alimentaires contenant du foie de porc cru (figatelles et saucisses de foie) et d'analyser 70 échantillons répartis dans les quatre catégories d'aliments potentiellement à risque pour le consommateur (figatelles, saucisse de foie, foies de porcs salés et séchés, quenelles).

Matériels et méthodes

Virus de l'hépatite E, norovirus murin et échantillons du plan de surveillance

Pour développer et valider la méthode de détection du génome viral du VHE, des contaminations artificielles ont été réalisées avec la suspension virale de VHE (génotype 3f; numéro d'accès Genbank: JF718793) obtenue à partir d'un échantillon fécal de porc infecté, fourni par le laboratoire de santé animale (Anses, Maisons-Alfort). L'échantillon fécal a été suspendu dans du tampon PBS à 10 mM pH 7.4 (10 % finale (w/v)) et centrifugé à 4000 g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contenant les particules virales de VHE a été aliquote et conservé à -80°C. Le nombre de copies d'ARN de VHE dans la suspension virale a été déterminé par RT-qPCR en utilisant une courbe standard obtenue avec des ARN de VHE transcrits *in vitro*.

Le norovirus murin MNV-1 (CW1) a été amplifié puis titré dans les cellules RAW 264.7 (lignée de macrophages murins, ATCC TIB-71).

Dans le cadre du plan de surveillance de la contamination par le VHE (PS-VHE) des produits de charcuterie à base de foie cru de porc (DGAL/SDSSA/N2010-8330) regroupant 400 échantillons



Méthodes

(Nicole Pavio, 2013), 70 échantillons ont été choisis de manière à conserver la répartition initiale des 400 échantillons en termes d'origine géographique et de type de produits (figatelles, saucisses de foie, foies salés séchés, pâtes à quenelles) puis analysés par RT-PCR quantitative.

Méthode de détection quantitative du VHE dans les matrices à base de foie de porc cru Elution / concentration des particules virales et extraction des ARN viraux

La matrice alimentaire (3 g) est découpée en morceaux à l'aide d'un scalpel et mise dans un sac Stomacher®. Après avoir ajouté le MNV-1 utilisé comme contrôle de processus (50000 TCID₅₀), 30 mL d'eau distillée est ajoutée à la matrice qui est broyée au Stomacher® (2 min, 260 rpm). L'éluion est réalisée à température ambiante sous agitation pendant 10 min. L'homogénéat est clarifié par centrifugation (8000 g, 15 min, 4°C) puis les particules virales sont précipitées avec du polyéthylène glycol (PEG) (1/4 Vol) pendant 2h à 4°C et concentrées par centrifugation à 8000 g pendant 30 min. Les particules virales sont directement lysées pour extraire les ARN viraux à l'aide de l'extracteur automatique (NucliSens® easyMAG™).

RT-PCR quantitative

Le modèle moléculaire pour la détection du VHE est issu du modèle décrit par (Jothikumar *et al.*, 2006) ciblant la région ORF2/ORF3. Le modèle moléculaire pour la détection de MNV-1 ciblant l'ORF1 a été déterminé en utilisant le logiciel Beacon Designer software (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France). Les sondes Taqman pour la détection du VHE et du MNV-1 ont été respectivement marquées avec le ROX ou 6-FAM en 5', et BHQ2 ou BHQ1 en 3'.

Pour la détection du VHE, les séquences des amorces et sonde TaqMan utilisées sont:

HEV-5260-F: 5'-CGGTGGTTTCTGGGGTGAC-3',
HEV-5330-R: 5'-AGGGGTTGGTTGGATGAATATAG-3'
HEV-5280-T: 5'-ROX-GGGTTGATTCTCAGCCCTTCGC-BHQ2-3'.

Pour la détection du MNV-1, les séquences des amorces et sonde TaqMan utilisées sont:

MNV-3193-F: 5'-CCGCCATGGTCCTGGAGAATG-3',
MNV-3308-R: 5'-GCACAACGGCACTACCAATCTTG-3'
MNV-3227-T: 5'-FAM-CGTCGTGCGCTCGGTCCTTGTCAA-BHQ1-3'.

Tous les essais de RT-PCR quantitative ont été réalisés sur l'appareil CFX96™ de Bio-Rad (Marnes-la-Coquette, France). Les réactions ont été réalisées en utilisant le kit "RNA UltraSense™ One-Step Quantitative RT-PCR System" (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France). Les contrôles positifs contenant des ARN extraits de suspensions de virus et un contrôle négatif contenant tous les réactifs en dehors de l'extrait d'ARN étaient inclus dans chaque série d'expériences. Le programme de thermocyclage pour la RT-qPCR en une étape était de 60 min à 55°C pour la reverse transcription des ARN viraux; une étape de dénaturation de 15 min à 95°C, puis

40 cycles de 15 s à 95°C, 1 min à 60°C et 1 min à 65°C et pour la PCR. Chaque extrait d'ARN est testé non dilué et dilué au 1/10^e en duplicate. Tous les échantillons sont caractérisés par une valeur de cycle seuil (Cycle threshold) (Ct). Les échantillons négatifs n'ont pas de valeur de Ct. Une courbe standard pour chaque cible virale a été produite en utilisant une gamme de dilutions de suspension virale. Les pentes (S) des droites de régression ont été utilisées pour calculer l'efficacité d'amplification (E) des réactions de RT-qPCR, selon la formule: $E = 10^{-1/s} - 1$. Les rendements d'extraction du VHE et du MNV-1 ont été calculés pour chaque échantillon à partir de la courbe standard correspondante.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel MATLAB (version 6.5.1).

Pour l'étude de validation de méthode, l'impact/l'effet de l'ajout du contrôle de processus MNV-1 a tout d'abord été évalué sur les rendements d'extraction du VHE par une analyse univariée de la variance (ANOVA). Puis, une analyse multi-variée a été réalisée pour évaluer l'effet de 5 facteurs expérimentaux sur les rendements d'extraction du VHE: dilution de l'échantillon, le type d'aliment (figatelles, saucisses de foie), la quantité de VHE et la variabilité inter-essai. En ce qui concerne les rendements d'extraction obtenus pour MNV-1, 4 variables ont été testées, à savoir la dilution de l'échantillon, le type d'aliment (figatelles, saucisses de foie) et la variabilité inter-essais.

Résultats

Validation de la méthode de détection du VHE dans les figatelles et saucisses de foie.

La méthode de détection du VHE a été validée sur des figatelles et des saucisses de foie artificiellement contaminées puisqu'elles représentent plus de 75 % des échantillons à analyser dans le cadre du PS-VHE. La limite de détection (LOD) du VHE et les rendements d'extraction moyens du VHE et du contrôle de processus (MNV-1) obtenus à partir de 4 répétitions d'expériences sont reportés sur le **Tableau 1**.

La présence du contrôle de processus MNV-1 n'influence pas les rendements d'extraction du VHE (ANOVA univariée; p-value = 0,10). Les rendements d'extraction moyens obtenus à partir des figatelles sont de 13,1 % pour le MNV-1 et de 18,4 % pour le VHE. Dans les saucisses de foie, les rendements d'extraction moyens sont de 2,9 % pour le MNV-1 et de 3,9 % pour le VHE. Les rendements d'extraction du VHE et du MNV-1 ne sont pas améliorés après la dilution des échantillons d'ARN au 1/10^e (résultats non présentés).

Les résultats ont été analysés par une étude statistique de variance multi-variée qui montre que (i) les rendements d'extraction sont plus élevés dans les figatelles que dans les saucisses, et ce, aussi bien pour le VHE que pour le virus utilisé comme contrôle de processus (MNV-1); et que (ii) l'extraction depuis ces deux types de matrice ne génère pas d'inhibition d'amplification significative par PCR des génomes des deux virus.



Méthodes

Tableau 1: Rendements moyens d'extraction du VHE et du MNV-1

Quatre expériences ont été réalisées et chaque échantillon a été analysé par RT-qPCR en double et le nombre d'essais positifs est indiqué entre parenthèses. La LOD₁₀₀ correspondant à la détection du VHE dans les quatre répétitions d'expériences est surlignée en gris. nd: non détecté.

Inocula / 3 g		Rendements d'extraction dans les figatelli (%) (Ct positif / 8)		Rendements d'extraction dans les saucisses (%) (Ct positif / 8)	
VHE	MNV-1	VHE	MNV-1	VHE	MNV-1
0	0	nd	nd	nd	nd
875	0	43,9 ± 26,9 (2/8)	nd	nd	nd
1750	0	22,8 ± 11,0 (4/8)	nd	9,8 (1/8)	nd
8750	0	14,7 ± 11,3 (7/8)	nd	3,2 ± 2,1 (2/8)	nd
17500	0	9,6 ± 6,5 (7/8)	nd	4,9 ± 2,5 (6/8)	nd
87500	0	8,7 ± 2,5 (8/8)	nd	2,7 ± 2,1 (8/8)	nd
0	50 000	nd (0/8)	11,6 ± 7,0	nd	1,6 ± 0,9
875	50 000	28,6 ± 9,4 (3/8)	13,0 ± 6,6	nd	2,0 ± 1,3
1750	50 000	35,7 ± 33,4 (6/8)	13,4 ± 7,1	nd	1,2 ± 1,1
8750	50 000	7,6 ± 5,6 (5/8)	12,1 ± 4,1	3,0 ± 1,7 (2/8)	3,1 ± 1,2
17500	50 000	5,6 ± 5,7 (6/8)	15,8 ± 7,7	2,9 ± 2,1 (2/8)	3,2 ± 0,4
87500	50 000	6,6 ± 2,0 (8/8)	12,9 ± 3,8	1,1 ± 1,0 (7/8)	6,5 ± 6,5
Rendements d'extraction moyens (%)		18,4	13,1	3,9	2,9

Détection quantitative du VHE dans 70 échantillons du plan de surveillance (DGAI/SDSSA/N2010-8330)

Les résultats de l'analyse des 70 échantillons à base de foie de porc cru sont présentés sur le **Tableau 2**. La présence de génomes du VHE a été trouvée dans douze figatelles sur trente-trois et dans dix saucisses de foie sur vingt-sept, ce qui correspond à une prévalence d'environ 36 % d'aliments contaminés par le VHE. Les données quantitatives de ces échantillons retrouvés positifs pour le VHE sont reportées dans le **Tableau 3**. La charge virale du VHE dans les figatelles et les saucisses de foie est comprise entre 4×10^1 et 2×10^6 copies génome du VHE/g. La quantité de VHE retrouvée est $> 10^2$ copies génomes par gramme dans 95 % des échantillons positifs, $> 10^3$ copies génomes par gramme dans 55 % des échantillons positifs et $> 10^4$ copies génomes par gramme dans 27 % des échantillons positifs.

Le contrôle de processus (MNV-1) a été utilisé pour contrôler toutes les étapes de l'analyse depuis l'extraction du virus de la matrice alimentaire jusqu'à sa détection quantitative par RT-qPCR. Les fourchettes de rendements d'extraction du MNV-1 obtenus pour les 70 échantillons à base de foie de porc cru sont présentées sur le **Tableau 2**.

Le rendement d'extraction du contrôle de process (MNV-1) obtenu à partir de la majorité des figatelles et des saucisses de foie analysées est > 1 %. En revanche, les rendements d'extraction obtenus pour le MNV-1 à partir des deux autres catégories d'aliments (foies salés séchés et quenelles) sont tous < 1 %. Pour 5 échantillons sur 10, le rendement d'extraction du MNV-1 obtenu est même inférieur à 0,1 %.

Tableau 2: Résultats des analyses des 70 échantillons du PS-VHE répartis par type d'aliments

Le nombre d'analyses positives pour le VHE et les rendements d'extraction obtenus pour le contrôle de processus MNV-1 sont indiqués.

Types de produits	Nombre total d'analyses	Nombre d'analyses VHE négatives	Nombre d'analyses VHE positives	Rendements d'extraction du MNV-1 (%)			
				< 0,1%	0,1-1%	1-10%	>10%
Figatelli	33	21	12	0	6	20	5
Saucisse de foie (sèche ou fraîche)	27	17	10	1	4	22	2
Foie salé séché	5	5	0	2	3	0	0
Quenelle et pâte à quenelle	5	5	0	3	2	0	0
Total	70	48	22	6	15	42	7



Méthodes

Tableau 3: Quantités (copies de génomes) du VHE détectées dans les échantillons positifs du PS-VHE

Valeurs de Ct	Copies de génome VHE / 3 g	Nombre de Figatelli	Nombre de saucisses de foie
< 30	> 2E+05	3	1
30 - 36	1,6E+03 - 2E+05	7	2
36,1 - 40	1,2E+02 - 1,6E+03	2	7

Discussion

Dans le cadre du plan de surveillance de la contamination par le virus de l'hépatite E des produits de charcuterie à base de foie cru de porc, au stade de la production, cette étude avait pour objectif de développer et valider une méthode de détection quantitative du génome viral de l'hépatite E (VHE) dans les matrices alimentaires à risque afin d'analyser quantitativement 70 échantillons.

Les expériences préliminaires réalisées lors du développement de la méthode de détection du VHE ont souligné l'importance d'inclure une étape d'éluion/concentration des particules virales par le PEG avant l'extraction des ARN viraux (résultats non présentés). En effet, l'étape de concentration de virus est généralement indispensable dans la mesure où le taux de contamination des aliments par des virus entériques est faible. Ainsi, la concentration des virus entériques (entérovirus, virus de l'hépatite A, norovirus, adénovirus et astrovirus) à partir de produits alimentaires très diversifiés comme les salades de pâtes, viande, crème fouettée et coquillages se fait le plus souvent par la précipitation des virus au polyéthylène glycol (PEG) (Stals *et al.*, 2012). C'est également cette approche qui a été sélectionnée par le groupe de travail européen CEN/TC275/WG6/TAG4 pour détecter les norovirus et virus de l'hépatite A (VHA) dans les végétaux et les fruits rouges (ISO/TS_15216-1, 2013; ISO/TS_15216-2, 2013).

Les expériences de validation de la méthode de détection du VHE réalisées à partir de figatelles et saucisses de foie artificiellement contaminées ont montré que les rendements moyens d'extraction du VHE à partir de figatelles (18,4 %) sont statistiquement plus élevés que ceux obtenus à partir de saucisses de foie (3,9 %). L'ordre de grandeur de ces rendements est en adéquation avec ceux décrits pour la détection du virus de l'hépatite A et des norovirus à partir de végétaux et fruits (Blaise-Boisseau *et al.*, 2010; Martin-Latil *et al.*, 2012a).

Pour valider les diagnostics viraux en hygiène des aliments, il est indispensable d'utiliser un virus témoin de processus (contrôle de processus) comme cela a été décrit dans de nombreux travaux et revues (Baert *et al.*, 2011; Coudray *et al.*, 2013; Martin-Latil *et al.*, 2012b; Stals *et al.*, 2012). Le contrôle de processus est ajouté en quantité définie à l'échantillon analysé

avant l'extraction virale et il est proposé dans les spécifications techniques (ISO/TS_15216-1, 2013; ISO/TS_15216-2, 2013) de valider le diagnostic viral e hygiène alimentaire suite à l'obtention d'un rendement du contrôle de processus $\geq 1\%$. Le virus sélectionné en tant que témoin de processus doit être un virus cultivable, sans enveloppe, à ARNsb (simple brin) de polarité positive, de taille similaire aux virus cibles afin de fournir un modèle morphologique et physico-chimique correct. Il doit également montrer une persistance dans l'environnement semblable aux virus cibles et sa présence dans les aliments à l'état naturel ne doit normalement pas être attendue. Pour cette étude, le norovirus murin (MNV-1) a été sélectionné comme virus témoin de processus comme dans de nombreuses études précédentes (Coudray *et al.*, 2013; Martin-Latil *et al.*, 2012a, b; Stals *et al.*, 2009). Des rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1) supérieurs à 1 % ont été obtenus dans 80 % des figatelles et dans 83 % des saucisses de foie analysées. Pour les quenelles (5 échantillons) et les foies salés séchés (5 échantillons), les rendements d'extraction du contrôle de processus (MNV-1) obtenus sont plus faibles (< 1 %). Ces résultats confirment la nécessité d'utiliser un virus témoin de processus pour valider la méthode de détection du VHE dans chaque type d'aliment et suggèrent que l'amélioration de la détection du VHE dans les quenelles et foie salés séchés doit être poursuivie dans des futurs travaux.

La forte prévalence (un tiers des produits testés sont positifs pour le VHE), associée à des niveaux élevés de contamination (55 % des échantillons positifs ont un niveau de contamination supérieur à 10^3 copies génomes par gramme), supportent la possibilité d'une transmission du VHE à l'homme *via* ces aliments. Bien que la méthode de détection validée repose sur la détection des génomes viraux et ne permet donc pas de se prononcer sur la présence de particules infectieuses du VHE dans les échantillons analysés, l'infectiosité du VHE issus de figatelles a été montrée à l'aide d'un modèle cellulaire (Berto *et al.*, 2013).

En conclusion, le développement de méthodes en routine permettant la mise en évidence du caractère infectieux du VHE est nécessaire pour une meilleure appréciation du risque viral. Néanmoins, il semble utile de mener une surveillance des réservoirs animaux du VHE, de mettre en place des recommandations pour éviter l'entrée du VHE dans les aliments, et de rappeler les bonnes pratiques de cuisson pour limiter le risque de contamination humaine. Il est nécessaire de valider des méthodes de diagnostic du VHE selon les types de denrées alimentaires afin de déterminer la prévalence du VHE dans l'ensemble des matrices à risque de façon fiable. Pour finir, des études complémentaires pour déterminer la probabilité d'infection en fonction de la quantité de copies génomes du VHE présent dans un échantillon seraient nécessaires pour mieux apprécier le risque viral.



Méthodes

Remerciements

Cette étude a été partiellement financée par la Direction générale de l'Alimentation. Les auteurs remercient Julien Santolini (†) qui a organisé le plan de surveillance nationale du VHE et Corinne Danan pour ses conseils avisés et sa revue critique du manuscrit. Nous remercions le Nicole Pavio pour nous avoir fourni l'échantillon de fèces de porc contaminé par le VHE. La souche de norovirus murin MNV-1 (CW1) a été fournie par H. Virgin de l'Université de Washington (USA) au laboratoire de Fougères de l'Anses (France).

References

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

Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., Ulrich, R.G., Pavio, N., Van der Poel, W.H., Banks, M., 2013. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis* 19, 264-266.

Blaise-Boisseau, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2010. Duplex real-time qRT-PCR for the detection of hepatitis A virus in water and raspberries using the MS2 bacteriophage as a process control. *J Virol Methods* 166, 48-53.

Coudray, C., Merle, G., Martin-Latil, S., Guillier, L., Perelle, S., 2013. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in lettuces using the murine norovirus as a process control. *J Virol Methods*.

ISO/TS_15216-1, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

ISO/TS_15216-2, 2013. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.

Jothikumar, N., Cromeans, T.L., Robertson, B.H., Meng, X.J., Hill, V.R., 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J Virol Methods* 131, 65-71.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012a. Comparison of two extraction methods for the detection of hepatitis A virus in semi-dried tomatoes and murine norovirus as a process control by duplex RT-qPCR. *Food Microbiol* 31, 246-253.

Martin-Latil, S., Hennechart-Collette, C., Guillier, L., Perelle, S., 2012b. Duplex RT-qPCR for the detection of hepatitis E virus in water, using a process control. *Int J Food Microbiol* 157, 167-173.

Nicole Pavio, A.T., Thiziri Merba, Bouteiller Laurine, Soline Tabouis Chaumien, Corinne Danan 2013. Prévalence et facteurs de risque du virus de l'hépatite E dans les aliments à base de foie cru de porc. BE Santé animale – alimentation.

Stals, A., Baert, L., Botteldoorn, N., Werbrouck, H., Herman, L., Uyttendaele, M., Van Coillie, E., 2009. Multiplex real-time RT-PCR for simultaneous detection of GI/GII noroviruses and murine norovirus 1. *J Virol Methods* 161, 247-253.

Stals, A., Baert, L., Van Coillie, E., Uyttendaele, M., 2012. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int J Food Microbiol* 153, 1-9.

Réalisation graphique et éditoriale

Directeur de la publication: Marc Mortureux

Rédacteur en chef: Paul Martin

Comité de rédaction: Maria Laura Boschiroli (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), Jan Zmudzki (NVRI, Pologne)

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
14, rue Pierre et Marie Curie
94701 Maisons-Alfort Cedex
www.anses.fr