



Le directeur général

Extrait de la NOTE d'appui scientifique et technique de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif à l'établissement d'un cahier des charges en vue d'une étude épidémiologique relative au risque lié aux *E. coli* entérohémorragiques (et *E. coli* O26 en particulier) dans la filière reblochon

La présente note est un extrait de la note du 22 novembre 2019 après suppression des parties confidentielles qui relèvent du secret industriel non publiable

L'Anses a été saisie le 06 juin 2019 par Direction générale de l'alimentation (DGAI) pour la réalisation de l'appui scientifique et technique suivant : Demande d'appui pour l'établissement d'un cahier des charges en vue d'une étude épidémiologique relative au risque lié aux *E. coli* entérohémorragiques (et *E. coli* O26 en particulier) dans la filière reblochon.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA DEMANDE

Le contexte présenté par la DGAI dans la lettre de saisine est le suivant :

« L'année 2018 a regroupé deux TIAC à EHEC O26 liées à la consommation de reblochon :

- Au printemps, onze enfants ont déclaré un SHU causé par des bactéries EHEC O26 ; l'un est décédé avant que le bilan soit étendu à 14 cas de SHU infantiles ; les investigations ont permis de relier ces cas à des fromages fabriqués [dans le département de la Haute-Savoie] (74) ;

- Le 19 décembre, deux cas de SHU infantiles causés par des EHEC O26 conduisent au rappel de lots de fromages [...] fabriqués [dans le département de la Haute-Savoie] (74) à partir de laits collectés dans des bassins de production différents.

Les comparaisons génétiques réalisées par l'Institut Pasteur en tant que CNR *E. coli* ont conclu à une relative proximité des souches collectées à l'occasion de ces événements ainsi qu'avec une souche déjà prélevée en 2016 et isolée par le LNR. Des informations orales ultérieures évoquent une même similitude de ces souches.

Ces constats interrogent sur le processus par lequel la souche bactérienne a pu se répandre dans la zone d'appellation et sur son expansion actuelle. Cette question intéresse également le syndicat interprofessionnel, qui a déjà élaboré un plan d'actions pour une meilleure maîtrise de ce risque. »

La saisine vise à recueillir l'avis de l'Anses afin d'établir le « cahier des charges d'une étude épidémiologique visant à évaluer l'extension actuelle de la zone contaminée par cette souche bactérienne et à comprendre les mécanismes par lesquels la bactérie s'est répandue dans cette zone et circule peut-être encore. »

Les éléments instruits par l'Anses sont les suivants :

- évaluer qualitativement la proximité génétique des souches d'EHEC O26 collectées dans la zone géographique de la filière concernée, les méthodes liées à leur analyse génétique et leur comparaison ;
- dans le cas d'une proximité génétique avérée, formuler des recommandations pour le recueil de données nécessaire à une future étude épidémiologique.

2. ORGANISATION DES TRAVAUX

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

Après analyse de la saisine, en tenant compte de la demande et du délai attendu, l'Anses a retenu de répondre par un appui scientifique et technique sans mise en œuvre d'une évaluation de risques et sans faire appel à un collectif d'experts. Comme le permet la procédure qualité dans ce cas, le travail a été réalisé par des agents de l'Anses (direction de l'évaluation des risques).

Les travaux ont été présentés, à titre d'information, au comité d'experts spécialisé (CES) « Évaluation des risques biologiques dans les aliments » (CES BIORISK) le 09 septembre et le 16 octobre 2019.

L'expertise s'est appuyée sur :

- les données de génotypage d'*E. coli* (et *E. coli* O26 en particulier) enregistrées dans les bases de données MLST *E. coli* (Enterobase¹) ;
- les informations relatives aux méthodes d'identification des souches, de séquençage et de comparaison génétique collectées auprès du Centre National de Référence (CNR), du CNR associé *E. coli*, du Laboratoire national de référence (LNR) *E. coli* et de Santé publique France lors des auditions tenues le 31 juillet, le 30 août, le 3 septembre et le 14 novembre 2019 ;
- les informations relatives aux matières premières, au processus de fabrication des produits, la répartition des ateliers sur l'aire géographique, transmises par le Syndicat Interprofessionnel du Reblochon, des représentants d'entreprises et ACTALIA, lors de l'audition du 21 août 2019 ;
- les informations transmises au préalable dans le cadre de la saisine liée 2018-SA-0164² ;
- la littérature scientifique (cf. références bibliographiques).

L'analyse des séquences génomiques disponibles sur Enterobase en date du 31 août 2019 a été réalisée par analyse des différences alléliques (cgMLST) et des variants à l'aide des outils disponibles sur Enterobase (Zhou et al. 2018, 2019).

L'Anses analyse les liens d'intérêts déclarés par ses agents, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise. Les déclarations d'intérêts des agents de l'Anses sont publiées sur son site internet (www.anses.fr).

¹ <https://enterobase.warwick.ac.uk/>

² Saisine liée n°2018-SA-0164: Avis de l'Anses du 23 juillet 2018 sur le projet de plan d'échantillonnage proposé par Chabert pour accompagner la reprise de commercialisation des reblochons fabriqués par l'entreprise

3. ANALYSE

3.1. État des connaissances

3.1.1. *Escherichia coli* et EHEC O26:H11

Escherichia coli productrice de shigatoxines (STEC) est normalement présente parmi le microbiote intestinal de l'Homme et des animaux à sang chaud. Les *E. coli* pathogènes ont acquis des facteurs de virulence et sont regroupées en pathovars parmi lesquels les *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (EHEC), établis sur la base des signes cliniques observés chez les malades. Les EHEC sont responsables de troubles variés allant d'une diarrhée aqueuse bénigne à une colite hémorragique pouvant évoluer vers des formes graves : syndrome hémolytique et urémique (SHU), principalement chez le jeune enfant, ou micro-angiopathie thrombotique (MAT) chez l'adulte. L'avis de l'Anses du 18 mai 2017 précise que toute souche de *E. coli* isolée chez l'Homme ou dans les aliments devrait être considérée comme une EHEC si elle possède les gènes de virulence *stx1* et/ou *stx2* et *eae* ou autre gène codant un système d'adhésion au tube digestif de l'Homme (Anses 2017, 2019).

Les EHEC sont des agents zoonotiques. La principale voie de transmission est indirecte par consommation d'aliments d'origine animale ou végétale, ou d'eau de boisson. La transmission directe est possible par contact avec des animaux infectés ou avec leurs déjections, mais aussi de personne à personne (transmission interhumaine féco-orale). Le tube digestif des ruminants domestiques, et plus particulièrement des bovins, est le principal réservoir des EHEC.

Les ruminants sont des porteurs sains, ils participent à la contamination de l'environnement par les bactéries présentes dans leurs fèces. D'autres animaux d'élevage ou des animaux sauvages, dont certains gibiers, peuvent également être porteurs sains (Miko et al. 2009; Mora et al. 2012). La persistance de souches EHEC dans les cheptels est due au portage digestif par les animaux et à la contamination par contact d'animal à animal, mais aussi à la contamination des sols (prairies, champs), de l'herbe et des fourrages, et des eaux superficielles à partir des déjections animales, des fumiers et des lisiers contaminés. Les souches EHEC peuvent survivre pendant plusieurs semaines dans les sédiments d'abreuvoir, les fèces ou le fumier sur le sol.

Il y a peu d'études sur la prévalence globale des bovins excréteurs de souches EHEC : la prévalence des cinq sérotypes majeurs (O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 ou O111:H8) a été estimée en France en 2010 – 2011 à 1,8 %. La prévalence de ces 5 sérotypes est de : 4,5 % chez les jeunes bovins laitiers, 2,4 % chez les jeunes bovins à viande, 1,8 % chez les vaches laitières et 1 % chez les vaches à viande. La prévalence des EHEC O26:H11 a été estimée à 0,3% chez les jeunes bovins laitiers et chez les vaches laitières (Bibbal et al. 2015).

Compte tenu de la gravité des infections liées à ces bactéries, tout lot d'aliment où est détectée une souche EHEC des cinq sérotypes majeurs est considéré comme potentiellement préjudiciable à la santé humaine ce qui conduit à la mise en place de mesures de gestion : traitement thermique ou destruction par l'industriel, retrait et rappel lorsque le produit est mis sur le marché (DGAI 2019).

3.1.2. Surveillance et détection chez l'Homme

Le syndrome hémolytique et urémique chez les enfants de moins de 15 ans est surveillé en France depuis 1996, à travers 32 services hospitaliers, et est coordonné par Santé publique France. Le Centre National de Référence (CNR) des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* (Institut Pasteur, Paris) et le CNR associé (Hôpital Robert Debré, Service de microbiologie, Paris) confirment les infections en isolant et en caractérisant les souches bactériennes en cause.

Depuis 2017, le CNR associé effectue les isollements des souches, la première recherche des facteurs de virulence (la recherche de la présence de gènes *stx1*, *stx2*, *eae*, *ehxA*) ainsi que les antibiogrammes. Quelques souches, principalement des *E. coli* O157 et O26 ; ont été séquencées en 2017. Depuis le 1^{er} janvier 2018, les souches EHEC liées à des SHU sont séquencées systématiquement par l'Institut Pasteur. Le séquençage en génome complet (*Whole Genome Sequencing* – WGS) est réalisé en utilisant la technologie Illumina. Les analyses de génotypage des EHEC O26 sont réalisées à l'aide de banques de données internes ou publiques (Institut Pasteur et CHU Robert Debré 2018).

La surveillance du SHU pédiatrique est complétée par la déclaration obligatoire des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC). Santé publique France met en place une investigation épidémiologique si des cas de SHU ou d'infection à STEC groupés dans le temps et/ou l'espace sont signalés. L'investigation a pour objectif de déterminer si ces infections ont une origine commune.

3.1.3. Surveillance et détection dans les aliments

Le règlement (CE) n°2073/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires, modifié par le règlement (CE) n°1441/2007, ne précise pas de critères microbiologiques réglementaire pour les STEC dans les denrées animales ou d'origine animale. Néanmoins, une denrée alimentaire à consommer en l'état, contaminée par une souche STEC possédant les gènes de virulence *stx* et *eae* et appartenant à l'un des 5 sérotypes O157:H7, O26:H11, O145:H28, O103:H2 ou O111:H8, est considérée en France comme « dangereuse » au sens de l'article 14 du règlement (CE) n°178/2002, car potentiellement préjudiciable pour la santé, et doit donner lieu à la mise en place de mesures de gestion spécifiques (DGAI 2018, 2019).

3.2. Évaluation qualitative de la proximité génétique des souches d'EHEC O26 collectées lors des événements et dans la zone géographique de la filière concernée, les méthodes liées à leur analyse génétique et leur comparaison

3.2.1. Description des méthodes de détection et de comparaison génétique

Les souches bactériennes associées aux cas groupées de SHU (printemps et hiver 2018) sont des *E. coli* O26:H11 avec les facteurs de virulence *stx2+* *eae+* *ehxA+*. Ce profil de virulence *stx2+* *eae+* *ehxA+* est le profil majoritaire dans les souches de sérotype O26 isolées chez des cas humains, soit 40% en 2017 (Institut Pasteur et CHU Robert Debré 2018).

Le CNR associé *E. coli* et Santé publique France ont indiqué que les génotypes des souches isolées lors des deux événements de SHU en 2018 ont été déposés sur la base de données et d'analyse génomique Enterobase¹. Cet outil permet d'analyser les distances alléliques des génomes et d'établir des clusters pour chaque niveau de distance allélique, sous la forme d'un numéro de type « HCX:Y ». Le nombre « X » après la dénomination « HC » présente le nombre maximum de différences permises dans le groupe. Par exemple, les souches d'un même groupe HC10 se connectent entre elles dans un arbre de groupement qui ne possèdent pas plus de 10 différences alléliques (Zhou et al. 2019).

Les souches humaines de ces deux événements se trouvent dans un même cluster HC5 (HC5:65006), c'est-à-dire qu'elles ne possèdent pas plus de 5 différences alléliques. Ce cluster comporte 52 séquences de souches (dont deux doublons). Il rassemble des séquences de souches isolées de cas humain en dehors d'épidémie (entre 2017 et 2019), mais également de souches qui ont été isolées d'échantillons issus de la filière de production reblochon entre 2016 et 2019. D'après les données relatives aux souches disponibles sur Enterobase, le cluster HC5:65006 semble être spécifique à la France. À l'intérieur de ce cluster, certaines

souches sont rassemblées dans des clusters à maximum 2 allèles de différence (HC2), informations utilisées, par exemple, dans le cadre des investigations épidémiologiques.

3.2.2. Comparaison génomique des souches

L'objet de l'analyse suivante est d'évaluer la proximité génétique des souches *E. coli* O26 séquencées en France, en particulier celles alimentaires collectées dans la zone géographique de la filière concernée, ainsi que les souches isolées de cas cliniques. Notre étude ne se substitue pas à l'analyse épidémiologique qui, quant à elle, vise à établir des liens de causalité entre des aliments et des cas cliniques.

La Figure 1A illustre la diversité génétique basée sur l'analyse cgMLST³ des souches *E. coli* O26 (HC100:574) françaises dont les séquences sont déposées par le CNR dans Enterobase (soient 211 séquences). L'algorithme MSTreeV2 a été utilisé pour établir le regroupement génétique des souches (Zhou et al. 2018). L'ensemble des souches (humaines et alimentaires) identifiées dans les enquêtes épidémiologiques liée à la consommation de reblochon appartiennent au groupe HC10:2002 (en bleu foncé dans le cadre dans la Figure 1A), et plus en particulier au sous-groupe HC5:65006 (en bleu foncé sur la Figure 1B). Il est à noter que le groupe HC10:2002 est très distant génétiquement des autres souches impliquées dans l'épidémie des cas de SHU pédiatriques associée aux fromages saint-marcellin et saint-félicien (HC10:75047) en orange sur la Figure 1A (Jones et al., 2019).

³ cgMLST : "core genome multilocus sequence typing"

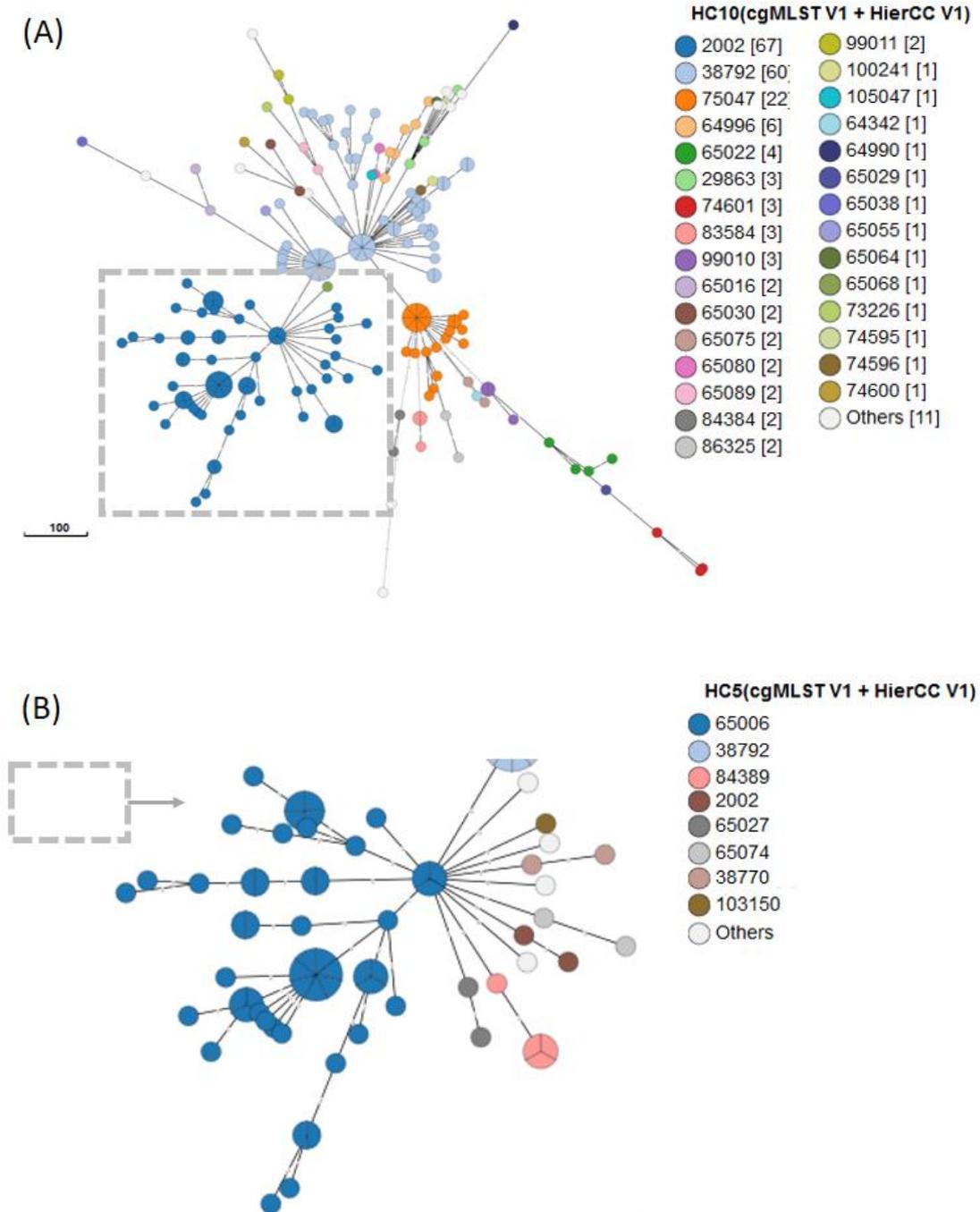


Figure 1 : (A) Arbre GrapeTree (établi sur les résultats cgMLST des souches *E. coli* O26 isolées par le CNR et LNR). En couleur, annotation du groupe HC10 des souches. (B) Focus sur les souches du groupe HC10:2002. En couleur, annotation HC5 des souches.

La Figure 2 montre l'arbre phylogénétique SNP⁴ des souches appartenant au groupe HC10:2002 (et d'une souche externe à ce groupe appartenant au HC10:75047). L'analyse SNP a été utilisée pour investiguer plus finement les proximités génétiques des souches alimentaires et humaines françaises. L'arbre phylogénétique a été établi sur les différences de SNP par la méthode du maximum de vraisemblance (Stamatakis, 2014).

La Figure 2 présente également les métadonnées (année et origine du prélèvement) pour les souches du groupe HC5:65006 (informations collectées lors des auditions).

Comme pour l'analyse cgMLST, l'analyse SNP confirme la proximité génétique des souches. Les résultats de cette analyse sont toutefois à considérer avec précaution, l'approche SNP reste en effet sensible au choix du génome de référence. La mise à disposition d'un génome de référence complet proche des souches HC5:65006 permettrait d'augmenter le pouvoir discriminant de cette comparaison.

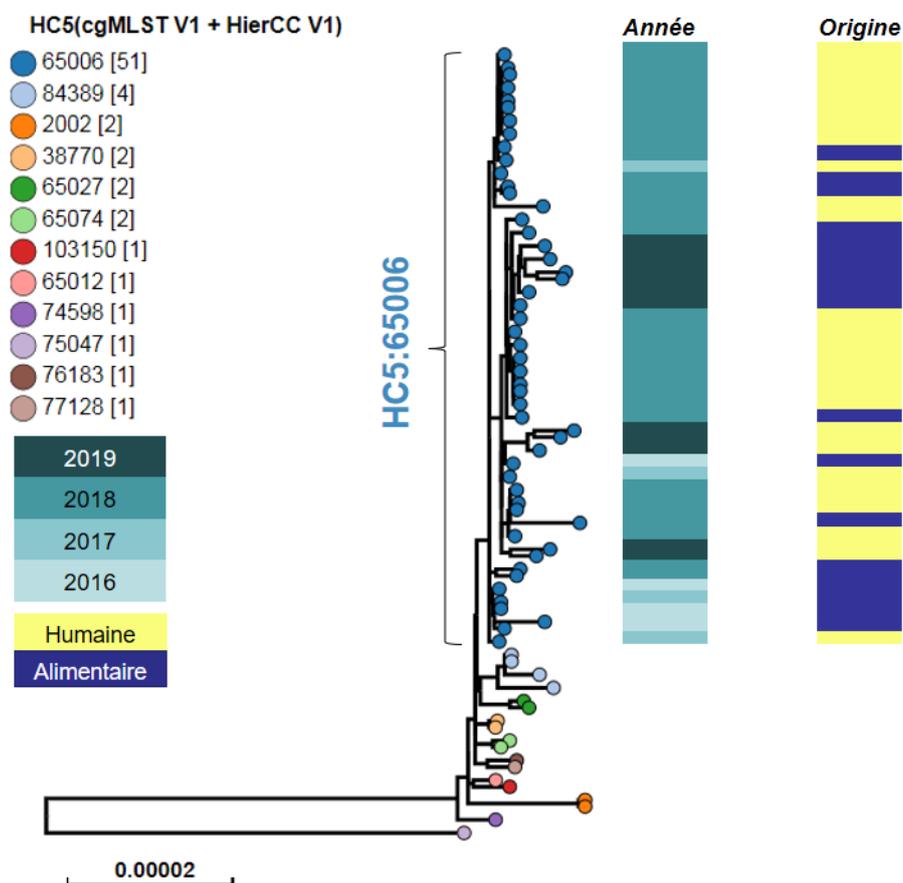


Figure 2 : Arbre phylogénétique SNP de *E. coli* O26 incluant des souches appartenant au HC10:2002, ainsi que les métadonnées du groupe HC5:65006 (année et origine).

Les travaux de Schürch et al. (2018) et Jones et al. (2019) présentent des seuils à 10 allèles de différence pour conclure à une proximité entre deux souches *E. coli* d'après analyse du cgMLST. Abdalhamid et al. (2019) établissent la proximité entre des isolats humains d'*E. coli* O26 et des isolats de bovins avec un seuil de 7 allèles de différence. Toutefois, il n'existe pas de consensus sur la définition d'un seuil unique de

⁴ SNP « *single-nucleotide polymorphism* » variation génétique d'une seule paire de base

différence allélique ou en SNP qui permette de définir la proximité génétique entre les isolats (Stimson et al. 2019). Le contexte épidémiologique (durée de l'épidémie, potentiel d'évolution des souches dans l'hôte ou l'environnement etc.) et microbiologique (diversité génétique au sein du groupe de souches étudiées ou chez un hôte) doivent être pris en compte pour adapter le seuil de différence génétique permettant de distinguer les souches.

En conclusion, les souches d'EHEC O26 collectées lors des deux cas groupés de SHU au printemps et à l'hiver 2018, humaines et alimentaires, ainsi que celles collectées dans la zone géographique de la filière concernée en dehors des épidémies entre 2016 et 2019, sont considérées comme proche génétiquement. De ce fait, on ne peut exclure la présence et la persistance d'un ou plusieurs clones dans la zone géographique considérée.

Seules les informations issues des enquêtes épidémiologiques (étude de traçabilité, enquête alimentaire...) combinées aux résultats issus de l'analyse génomique (analyses cgMLST et/ou l'analyse SNP) peuvent permettre de conclure sur le lien de causalité entre les souches humaines et alimentaires.

Il est recommandé pour l'analyse génomique des souches collectées dans la future étude épidémiologique d'utiliser l'approche la plus discriminante (analyse SNP avec l'utilisation d'un génome de référence complet issu d'une des souches du groupe ciblé, par exemple, HC5:65006).

3.3. Recommandations pour le cahier des charges de l'étude épidémiologique

3.3.1. Description de la filière et de la zone géographique

La zone AOP est clairement définie dans le cahier des charges (INAO 2012), néanmoins la répartition des éleveurs est hétérogène dans la zone : il existe une concentration des élevages de vaches laitières dans la vallée, ce qui peut impliquer une proximité géographique forte (Figure 3).

La production de reblochon est déclinée en deux catégories : reblochon laitier et reblochon fermier, ce qui représente un total de 510 producteurs de lait pour la fabrication de reblochon. La production annuelle représente 115 millions de litres de lait en fabrication laitière, et 21 millions de litres de lait en fabrication fermière. Les fruitières peuvent avoir entre 5 à 90 producteurs de lait. La production de lait se fait à travers un système coopérateur. Les éleveurs sont généralement regroupés pour la livraison du lait, où le ramasseur de lait récupère également le filtre des machines de traite qui est livré en même temps que le lait à la fromagerie.

En fabrication fermière, une majorité de producteurs possèdent un double atelier de fabrication (en vallée et en alpage). La situation géographique de ces ateliers d'alpage (et de vallée) est très limitée géographiquement. En fabrication laitière, la pratique de l'alpage devient marginale au regard du coût de ramassage du lait.

1 - nombre de vaches laitières en 2010 - source : Agreste - Recensement agricole 2010 et estimations pour les communes non diffusibles

2 - nombre moyen de vaches laitières par exploitation en ayant en 2010 - source : Agreste - Recensement agricole 2010 et estimations pour les communes non diffusibles

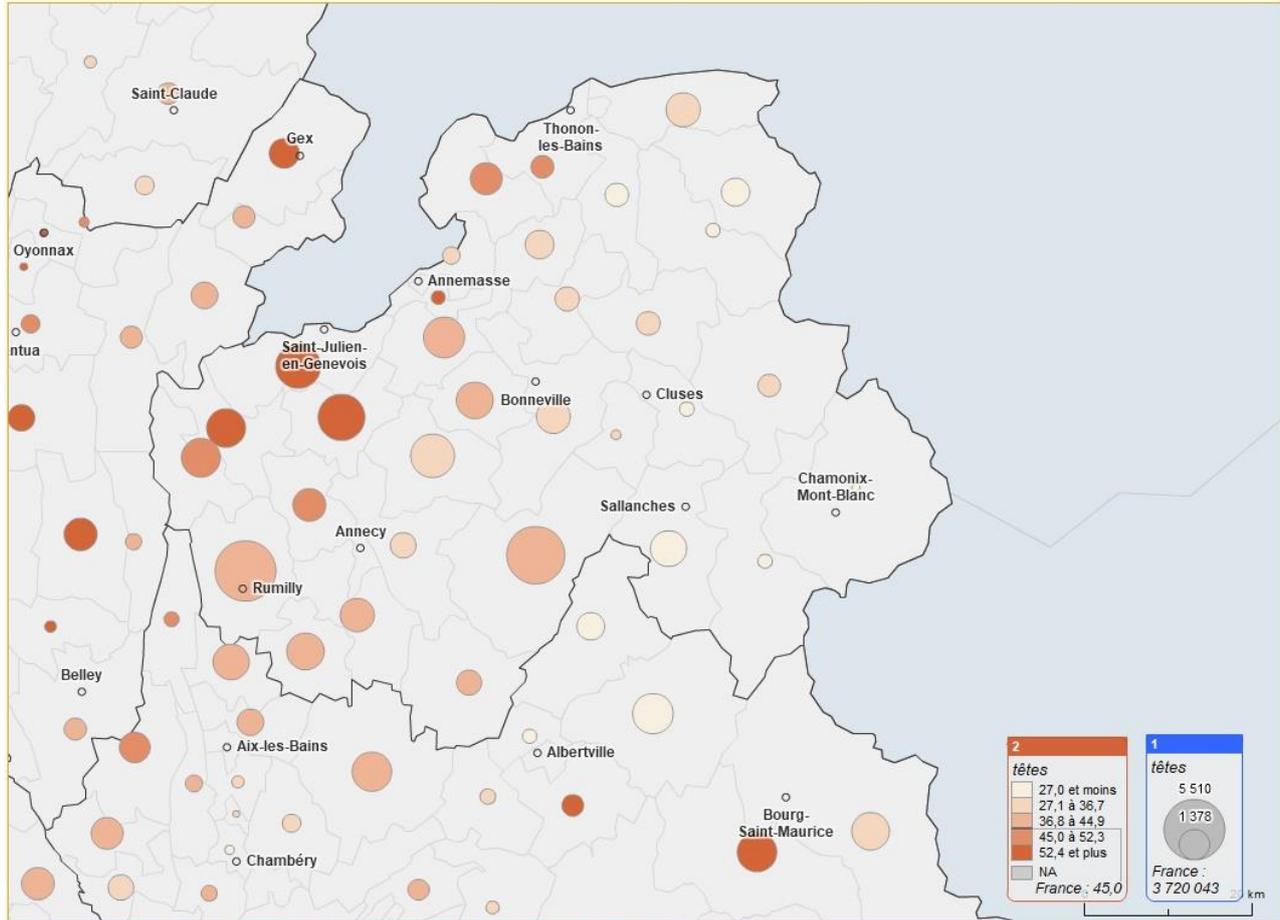


Figure 3 : Nombre de vaches laitières par canton et nombre moyen de vaches laitières par exploitation en 2010 (source : [Agreste](#)).

3.3.2. Plan de surveillance de la filière en 2019

Depuis début 2019, la filière reblochon a mis en place un plan de surveillance collectif pour détecter les STEC dans les lots de fromages en cours de fabrication, et également en analysant les filtres de machine à traire des producteurs. Les reblochons sont prélevés en cours d'affinage (stade « sous presse » ou à J+1), la recherche d'EHEC se fait en trois phases : 1) recherche par PCR des gènes *stx* ou *eae* ; si positif 2) recherche en première intention du sérotype et appartenance au Top 5 ou Top 7 des EHEC⁵, suivant les laboratoires ; 3) confirmation des souches par des méthodes propres à chaque laboratoire. Les laboratoires confirmant les souches comme EHEC conservent ou non les souches isolées. Le plan d'action n'inclut pas une collection de souches, et n'a pas d'objectif de faire une souchothèque. Par ailleurs, les souches ne sont pas séquencées : en dehors des investigations épidémiologiques, le séquençage des souches EHEC n'est pas une pratique

⁵ D'après l'avis de l'Anses de 2017 les sérotypes du top 5 des EHEC sont O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28, O111:H8, et ceux du top 7 contiennent en plus O45:H2 et O121:H19.

courante. Le séquençage de ces souches isolées par ce plan de surveillance devrait permettre de vérifier s'il y a présence et persistance de clones bactériens, tels que ceux rattachés au groupe HC5:65006.

Ce plan de surveillance prévoit une recherche systématique sur les filtres des machines à traire lorsqu'une EHEC est confirmée dans le lot de reblochon, et pouvoir ainsi remonter au producteur de lait. Lorsque le filtre révèle la présence d'EHEC du même séro groupe que celle retrouvée dans le produit fini, un diagnostic des pratiques sur l'exploitation est réalisé, avec un audit sur les pratiques, voire des prélèvements complémentaires sur des échantillons de l'environnement de production (bouses, lavettes, eau, alimentation...) ainsi qu'une mise en place, si nécessaire, des mesures de maîtrise des contaminations. Le lait est dérivé de la production « lait cru », jusqu'à ce que les analyses de filtre de la machine à traire redeviennent satisfaisants (au moins 10 résultats négatifs successifs). Pour information, entre février 2019 et juillet 2019, 6550 fromages laitiers et 3209 filtres de machine à traire ont été analysés. Douze (soit 0,2%) et 26 (soit 0,8%) *E. coli* O26 *stx+* *eae+* ont été isolées de ces échantillons de fromages et de filtres, respectivement.

Les investigations sur les lots de reblochon et la remontée au producteur par les analyses des filtres de lait, telles qu'initiées par la filière dans le plan de surveillance et mis en place depuis février 2019 devrait être poursuivie. Il est par ailleurs conseillé de remonter aux producteurs de lait lorsqu'une souche EHEC, quelle qu'elle soit, est retrouvée lors de l'analyse de filtre de la machine à traire.

3.3.3. Méthode proposée

La future étude épidémiologique doit permettre :

- 1) d'évaluer la présence et l'étendue géographique de clones *E. coli* pathogènes dans la zone AOP reblochon : il est proposé d'avoir recours au typage et à la caractérisation génétique (WGS) des souches *E. coli* isolées dans les produits finis, les filtres et les fermes laitières ;
- 2) de comprendre les mécanismes de transfert d'*E. coli* pathogènes dans cette zone : pour cela il est proposé d'évaluer les connexions existantes entre les élevages.

Ces deux points sont décrits plus en détail dans les parties ci-après.

3.3.4. Étendue géographique de clones *E. coli* pathogènes

Afin d'évaluer l'étendue géographique de la présence de clones *E. coli* pathogènes, l'Anses propose que soit mise en place une surveillance permettant la constitution d'une collection de souches isolées et séquencées issues de prélèvements d'échantillons alimentaires ainsi que ceux provenant de fermes laitières.

Les méthodes de séquençage en génome complet permettent de caractériser les souches microbiennes, et d'avoir des informations importantes au-delà des investigations épidémiologiques.

▪ Prélèvement des échantillons alimentaires

Concernant la constitution d'une collection de souches d'EHEC séquencées, issues de reblochon et de filtre de lait, il est préconisé d'utiliser en premier lieu les souches EHEC qui ont été déjà isolées (et parfois conservées) dans le cadre des plans de surveillance de l'interprofession et d'autocontrôles. Leur séquençage, associé avec la complétion de métadonnées adéquates (e.g. date et coordonnées GPS de prélèvement, type d'échantillon etc.), permettrait de vérifier la présence de clones EHEC au cours de l'année 2019. Comme ordre de grandeur, 130 souches *E. coli* O26:H11 *eae+* et *stx2+* ont été isolées par le LNR entre août 2013 et août 2019, dont 68 proviennent d'aliments laitiers ; 38 souches *E. coli* O26:H11 *eae+* et *stx+* ont été isolées à travers le plan de surveillance de la filière en 2019.

Il est important de bien qualifier les échantillons : l'identification de la matrice (fromage, filtre de lait), de l'atelier et/ou de l'élevage est essentielle. De plus, dans le cas des échantillons de fromage, il devra être indiqué si la production a utilisé un report partiel du lait (dans les conditions qu'autorise le cahier des charges).

Par ailleurs, il apparaît que la centralisation des souches isolées dans les produits alimentaires, ainsi que des données associées (génotypes et métadonnées) est un point essentiel pour répondre à des questions de type contamination spatiale et temporelle. Cette centralisation existe pour les souches isolées (et séquencées) humaines (*i.e.* la centralisation du séquençage est effectuée par le CNR), ce n'est pas le cas pour les souches EHEC isolées d'aliments ou d'environnement d'élevage ou de production. Enfin, il serait intéressant d'étendre le séquençage à toute souche détectée dans les fromages et les filtres de lait.

▪ Prélèvement des échantillons issus des élevages laitiers

Concernant la constitution d'une collection de génotypes d'*E. coli* pathogènes issues des fermes laitières, deux approches complémentaires sont proposées :

- Une approche aléatoire, où chaque élevage de production de lait de la zone géographique à la même probabilité d'être analysé, quelle que soit la présence d'EHEC dans les produits finis. Cette approche permettra d'évaluer la prévalence de la souche EHEC considérée dans l'ensemble des élevages de la filière de production de lait cru.
- Une approche ciblée (Figure 4), qui reposerait sur le prélèvement dans des élevages potentiellement vecteurs à travers la détection d'EHEC considérée dans les produits finis et/ou dans les filtres de lait. Ces élevages de premier niveau sont liés à des élevages de proximité (appelés élevage de niveau 2) à travers différentes interactions *via* des vecteurs (voir liste paragraphe 3.3.5). Ces élevages de niveau 2 sont également producteurs de lait et ne sont pas concernés par la présence de l'EHEC retrouvée dans les fromages et/ou dans les filtres de lait (sinon ils seront considérés comme étant de niveau 1). Parallèlement, des prélèvements seront effectués dans des élevages « témoins » (élevage de niveau 0), qui ne seraient rattachés ni à travers la présence d'EHEC considérée dans les produits finis et/ou les filtres de lait ni à travers des interactions avec l'élevage de niveau 1.

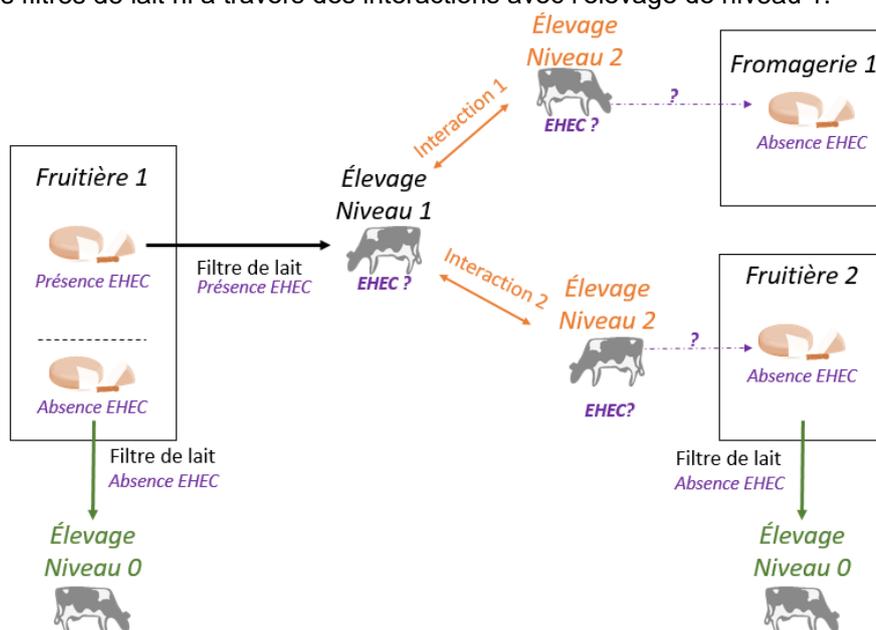


Figure 4 : Prélèvement dans les élevages témoins (niveau 0), ciblés (niveau 1) et de proximité (niveau 2). Les interactions entre les élevages sont définies dans le paragraphe 3.3.5.

Il existe une grande variabilité dans l'excrétion des bovins porteurs d'EHEC. La variabilité entre les fermes d'une même zone géographique peut être très importante (Stein et Katz 2017). L'excrétion peut ne jamais être observée dans certaines fermes ; elle peut se produire occasionnellement et pendant de courtes périodes dans d'autres ; et d'autres fermes peuvent présenter des niveaux d'excrétion permanent dans leur environnement à des niveaux importants. Cette variabilité concerne également la variabilité des niveaux d'excrétion entre animaux au sein d'un troupeau (animaux « super-excréteurs »). Enfin, il existe pour les bovins excréteurs de fortes variations des niveaux d'excrétion au cours du temps (Robinson et al. 2004).

Dans ce contexte, si l'on s'intéresse à la circulation des souches d'EHEC au sein d'une région géographique l'analyse des échantillons de matières fécales poolées par élevage semble être préférable (Tamminen et al. 2019), sans identification de l'individu excréteur. Compte-tenu des différences de portage entre les bovins d'âges différents, il peut être intéressant de faire des mises en commun compartimentées en fonction des zones de la ferme associée aux différentes populations bovines (génisses, veaux, vaches laitières etc.).

Afin de suivre l'évolution de la contamination d'*E. coli* dans le temps, il conviendrait d'avoir plusieurs prélèvements dans un même élevage au cours de l'année. La prévalence des EHEC est variable suivant les périodes de l'année et les souches étudiées. Par exemple, en Irlande, les plus hauts niveaux d'excrétion de STEC O26 ont été observés sur les mois de mai à juillet et les plus faibles d'août à octobre, alors que l'inverse est observée pour les STEC O157 (McCabe et al. 2019).

De ce fait, quatre périodes ont été identifiées, reflétant la saisonnalité relative aux différentes conditions d'élevage, d'alimentation et de système immunitaire (Chemineau et al. 2007) :

- printemps : avril-mai, période des premiers pâturages ;
- été : juillet-août, période où le nombre de SHU déclarés est le plus élevé (Bruyand et al. 2019) ;
- automne : septembre-octobre, fin des pâturages, et majoritairement fin de période de gestation (associée à une baisse d'immunité) ;
- hiver : décembre-janvier, élevage en bâtiment, journées courtes ayant un impact sur la lactation.

Les élevages échantillonnés devront représenter au mieux la diversité des types de production dans filière (e.g. reblochon laitier, reblochon fermier, en fromagerie, en fruitière, avec mise en alpage etc.). La localisation géographique précise de l'élevage devra être renseignée.

Il est également important que les élevages prélevés soient décrits de manière qualitative à travers différents critères, tels que la propreté des points d'eau, des mamelles, des animaux etc. Ces informations permettraient de caractériser les différents élevages, en qualifiant l'interaction des animaux avec leur environnement. Des protocoles normatifs existent pour qualifier, par exemple, l'habitat, la santé ou le bien-être des vaches laitières (Welfare Quality® 2009).

Enfin, ces informations sur les caractéristiques des fermes permettraient d'orienter sur les vecteurs identifiés comme pertinents pour les interactions possibles entre élevages (voir liste paragraphe 3.3.5). Ces critères peuvent être, par exemple, la taille du troupeau, la fréquence d'interaction Homme-vaches laitières, la présence d'animaux autres que bovins, la mise en commun de parcelles (pâturages communs), le prêt/échange de matériel, l'appartenance à un système coopérateur de ramassage de lait, la fréquence d'interaction du troupeau avec la faune sauvage etc. (de Boyer des Roches et al. 2016; Ebinghaus, Ivemeyer, et Knierim 2018).

▪ Analyse des échantillons

Les méthodes d'analyses des échantillons pour la détection des EHEC, ainsi que leur confirmation par isolement devront répondre à la norme ISO/TS 13136:2012, norme qui s'applique aux produits destinés à être consommés par l'Homme et aux aliments pour animaux. Cela s'applique également aux échantillons environnementaux dans les zones de production primaire, de production et de manipulation des aliments.

Il conviendra de vérifier la proximité génétique des souches séquencées en utilisant des méthodes de séquençage et des référentiels communs. Les séquences pourront être déposées sur des bases de données publiques telles qu'Enterobase afin de faciliter leur accessibilité et l'évaluation de leur proximité génétique.

Les souches isolées et séquencées devront être renseignées par des métadonnées décrivant les échantillons. Outre la confirmation de la présence de clones d'EHEC dans les produits alimentaires et les élevages, ces données collectées devront pouvoir permettre de reconstruire un réseau d'interaction entre les différents élevages (voir paragraphe 3.3.5). Aussi, les échantillons devront être décrits de manière la plus précise possible (lieu de prélèvement, matrice, pratiques d'élevages ...).

Enfin, il est encouragé à ce que la recherche des souches collectées lors de cette étude épidémiologique ne se limite pas aux *E. coli* O26:H11, mais soit également étendue aux autres *E. coli* du Top 7. L'investigation sur le sérotype *E. coli* O80:H2 est également fortement encouragée (Anses 2017).

3.3.5. Mécanisme de déplacement des *E. coli*

Pour comprendre le mode de transmission des clones d'EHEC dans la zone géographique, il est proposé de reconstruire un réseau d'interaction des différents points où le clone d'*E. coli* peut être détecté. Les nœuds du réseau pourront être les ateliers de fabrication des fromages (fromagerie et fruitières) ainsi que les élevages, qu'ils aient ou non le clone de la bactérie investiguée (Figure 5).

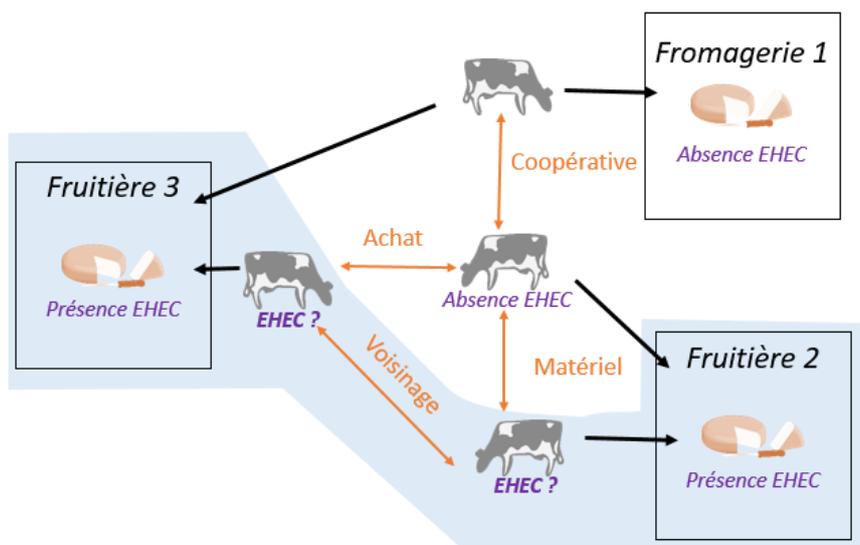


Figure 5 : Exemple de reconstruction d'un réseau d'interaction entre les élevages et les ateliers de production

▪ **Vecteurs potentiels identifiés**

L'origine la plus probable de contamination des fromages est la contamination des laits à la ferme. Parmi les vecteurs possibles liant des élevages, et du fait du portage naturel par les bovins (Farrokh et al. 2013), l'hypothèse principale sur l'introduction d'EHEC dans les différentes exploitations pourrait être le mouvement associé aux bovins.

De ce fait, les interactions suivantes sont celles identifiées comme pertinentes et classées par ordre d'importance :

1. Interactions entre animaux : échange de bovins entre élevages (achat, vente de génisses, veaux et vaches laitières) ;
2. Interactions environnementales : contamination des élevages à travers des pâturages communs pour troupeaux (génisse et/ou vache laitière), source d'eau commune entre élevages, ou très forte proximité géographique (voisinage) ;
3. Interactions matérielles : échange/prêt de matériel entre deux élevages (bétailière), membres d'une même coopérative laitière (citerne de lait qui passe d'un élevage à l'autre) ;
4. Interactions avec la faune sauvage : des prélèvements sur le gibier chassable permettrait d'évaluer le portage des gibiers en EHEC dans cette zone ;
5. Interactions Homme-animal : inséminateur commun, vétérinaire commun, participation à des événements d'exposition d'animaux...

▪ **Reconstruction du réseau d'interaction**

Des études existent en santé animale pour modéliser les introductions de pathogènes dans des élevages à travers les mouvements des bovins. Ce type de modèles épidémiologiques permettent de mieux comprendre la propagation des pathogènes à large échelle, par exemple, régionale, tout en pouvant déterminer la contribution relative des différents vecteurs de transmission (Beaunée et al. 2017; Qi et al. 2019). Pour cela, il est nécessaire d'avoir des données microbiologiques afin de calibrer les modèles (Ezanno et al. 2018).

Outre les informations relatives aux souches isolées et séquencées (alimentaires et issues d'élevage), les données qualifiant les ateliers de fabrication, les élevages, et les pratiques seront nécessaires :

- les liens entre production de fromage et les élevages devront être identifiés (avec ou sans détection de la bactérie pathogène). De ce fait, chaque fromagerie devra être décrite par ses interactions avec les producteurs de lait concernés par l'AOP. Les fromageries et ateliers indépendants devront également être décrits. Ces données permettront de décrire chaque nœud du réseau ;
- comme cela existe déjà dans la filière, dans le cas de détection de bactérie pathogène identifiée dans les fromages, la remontée au producteur, par exemple via l'analyse du filtre de lait, devra être confirmée (voir paragraphe 3.3.4) ;
- les données associées aux mouvements d'animaux entre élevages (notamment les données de notification de mouvement des bovins collectées par les GDS) que cela soit des vaches laitières mais également des jeunes animaux (génisses et veaux), devront être renseignées. L'élevage de génisses en dehors de l'exploitation, qui reviennent en âge de production laitière, est un des exemples de pratique qui peut générer l'introduction de pathogènes dans les élevages ;
- une localisation la plus précise possible des élevages, voire des parcelles accueillant les animaux, afin d'établir le voisinage entre différents élevages. Les indications temporelles seront un plus ;

- les informations qualitatives relatives aux pratiques d'élevage (voir paragraphe 3.3.4).

La reconstruction du réseau d'interaction peut également s'appuyer sur des données de séquençage de microorganismes autres qu'*E. coli* O26:H11. L'investigation et le séquençage sur les autres sérotypes pathogènes (O157:H7, O103:H2, O145:H28, O111:H8, O45:H2, O121:H19, et *E. coli* O80:H2) est encouragée.

4. CONCLUSIONS

Les séquences des souches d'*E. coli* O26:H11 humaines et alimentaires, isolées lors des deux événements épidémiologiques de SHU de 2018 liés à la consommation de reblochon, ainsi que celles isolées dans la zone AOP reblochon entre 2016 et 2019, sont proches d'un point de vue génétique.

Les objectifs que doit viser l'étude épidémiologique à mener sont doubles : évaluer la présence et l'étendue géographique de clones d'*E. coli* pathogènes dans la zone AOP reblochon d'une part, et comprendre les mécanismes de transfert des EHEC dans cette zone, d'autre part.

Les données nécessaires pour répondre à ces deux objectifs sont :

- la mise à disposition d'un génome de référence complet proche des souches EHEC cibles permettant une comparaison génomique discriminante ;
- les séquences génétiques (WGS) des EHEC cibles, isolées d'échantillons de fromage, de filtre de lait, et de fèces poolés issus d'élevage laitiers ; sélectionnés par une approche aléatoire et/ou une approche ciblée « risque » ;
- les informations relatives aux liens entre producteurs de lait et producteurs de fromage dans la zone AOP, aux interactions et proximités entre élevages à travers les vecteurs potentiels identifiés ;
- une description qualitative des élevages qui ont été échantillonnés ;

L'Anses préconise d'étendre le périmètre de l'étude épidémiologique au-delà du sérotype O26:H11 à l'ensemble des *E. coli* pathogènes (toutes celles du Top 7 soit O157:H7, O26:H11, O103:H2, O145:H28, O111:H8, O45:H2, O121:H19 et également O80:H2).

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

Reblochon, *Escherichia coli*, EHEC, *E. coli* O26:H11, fromage au lait cru

Reblochon, *Escherichia coli*, EHEC, *E. coli* O26:H11, raw milk cheese

BIBLIOGRAPHIE

- Abdalhamid, Baha, Emily L. Mccutchen, Alyssa C. Bouska, Zhang Weiwei, Brianna Loeck, Steven H. Hinrichs, et Peter C. Iwen. 2019. « Whole Genome Sequencing to Characterize Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli O26 in a Public Health Setting ». *Journal of Infection and Public Health*, juin. doi:10.1016/j.jiph.2019.06.008.
- Anses. 2017. « Avis du 18 mai 2017 relatif à la détection d'E. coli producteurs de shigatoxines (STEC) considérés comme hautement pathogènes en filière viande hachée bovine ».
- Anses. 2019. « Fiche de description de danger microbiologique transmissible par les aliments : "Escherichia coli entérohémorragiques (EHEC)" ».
- Beunée, Gaël, Elisabeta Vergu, Alain Joly, et Pauline Ezanno. 2017. « Controlling Bovine Paratuberculosis at a Regional Scale: Towards a Decision Modelling Tool ». *Journal of Theoretical Biology* 435 (décembre): 157-83. doi:10.1016/j.jtbi.2017.09.012.
- Bibbal, Delphine, Estelle Loukiadis, Monique Kérourédan, Franck Ferré, Françoise Dilasser, Carine Peytavin de Garam, Philippe Cartier, et al. 2015. « Prevalence of Carriage of Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli Serotypes O157:H7, O26:H11, O103:H2, O111:H8, and O145:H28 among Slaughtered Adult Cattle in France ». Édité par J. Björkroth. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (4): 1397-1405. doi:10.1128/AEM.03315-14.
- Boyer des Roches, Alice de, Isabelle Veissier, Xavier Boivin, Emmanuelle Gilot-Fromont, et Luc Mounier. 2016. « A Prospective Exploration of Farm, Farmer, and Animal Characteristics in Human-Animal Relationships: An Epidemiological Survey ». *Journal of Dairy Science* 99 (7): 5573-85. doi:10.3168/jds.2015-10633.
- Bruyand, Mathias, Patricia Mariani-Kurkdjian, Simon Le Hello, Lisa-A King, Dieter Van Cauteren, Sophie Lefevre, Malika Gouali, et al. 2019. « Paediatric Haemolytic Uraemic Syndrome Related to Shiga Toxin-Producing Escherichia Coli, an Overview of 10 Years of Surveillance in France, 2007 to 2016 ». *Eurosurveillance* 24 (8). doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800068.
- Chemineau, P., B. Malpaux, J. P. Brillard, et A. Fostier. 2007. « Seasonality of Reproduction and Production in Farm Fishes, Birds and Mammals ». *Animal* 1 (3): 419-32. doi:10.1017/S1751731107691873.
- DGAI. 2018. « Instruction technique DGAL/SDSSA/2018-943 du 21 décembre 2018 : Plan de surveillance de la contamination des viandes hachées de boeuf par E. coli STEC au stade de la production - 2019 ».
- DGAI. 2019. « Instruction technique DGAL/MUS/2019-509 du 10 juillet 2019 : Modification de l'annexe XI du guide d'aide à la gestion des alertes ».
- Ebinghaus, Asja, Silvia Ivemeyer, et Ute Knierim. 2018. « Human and Farm Influences on Dairy Cows' Responsiveness towards Humans – a Cross-Sectional Study ». Édité par Juan J. Loor. *PLOS ONE* 13 (12): e0209817. doi:10.1371/journal.pone.0209817.
- Ezanno, Pauline, Gael Beunée, Sébastien Picault, Sandie Arnoux, Vianney Sicard, François Beaudeau, Arnaud Rault, et Elisabeta Vergu. 2018. « Gestion des maladies endémiques du troupeau aux territoires: contribution de la modélisation épidémiologique pour soutenir la prise de décision (projet MIHMES, 2012-2017) », 14.
- Farrokh, Choreh, Kieran Jordan, Frederic Auvray, Kathleen Glass, Hanne Oppegaard, Sabrina Raynaud, Delphine Thevenot, et al. 2013. « Review of Shiga-Toxin-Producing Escherichia Coli (STEC) and Their Significance in Dairy Production ». *International Journal of Food Microbiology* 162 (2): 190-212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.

- INAO, (Institut national de l'origine et de la qualité). 2012. « Cahier des charges de l'appellation d'origine « reblochon » ou « reblochon de savoie » homologué par le décret n°2012-643 du 3 mai 2012, JORF du 5 mai 2012 Bulletin officiel du Ministère de l'agriculture, de l'alimentation, de la pêche, de la ruralité et de l'aménagement du territoire n° 19-2012 », 21.
- Institut Pasteur, et CHU Robert Debré. 2018. « Rapport d'activité 2018 du Centre national de référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella*, année d'exercice 2017 ».
- Jones, Gabrielle, Sophie Lefèvre, Marie-Pierre Donguy, Athinna Nisavanh, Garance Terpent, Erica Fougère, Emmanuelle Vaissière, et al. 2019. « Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* (STEC) O26 Paediatric Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS) Cases Associated with the Consumption of Soft Raw Cow's Milk Cheeses, France, March to May 2019 ». *Eurosurveillance* 24 (22). doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.22.1900305.
- McCabe, Evonne, Catherine M. Burgess, Dolapo Lawal, Paul Whyte, et Geraldine Duffy. 2019. « An Investigation of Shedding and Super-Shedding of Shiga Toxigenic *Escherichia Coli* O157 and *E. Coli* O26 in Cattle Presented for Slaughter in the Republic of Ireland ». *Zoonoses and Public Health* 66 (1): 83-91. doi:10.1111/zph.12531.
- Miko, A., K. Pries, S. Haby, K. Steege, N. Albrecht, G. Krause, et L. Beutin. 2009. « Assessment of Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Isolates from Wildlife Meat as Potential Pathogens for Humans ». *Applied and Environmental Microbiology* 75 (20): 6462-70. doi:10.1128/AEM.00904-09.
- Mora, Azucena, Cecilia López, Ghizlane Dhabbi, Ana M. López-Beceiro, Luís E. Fidalgo, Eduardo A. Díaz, Carlos Martínez-Carrasco, et al. 2012. « Seropathotypes, Phylogroups, Stx Subtypes, and Intimin Types of Wildlife-Carried, Shiga Toxin-Producing *Escherichia Coli* Strains with the Same Characteristics as Human-Pathogenic Isolates ». *Applied and Environmental Microbiology* 78 (8): 2578-85. doi:10.1128/AEM.07520-11.
- Qi, Luyuan, Gaël Beaunée, Sandie Arnoux, Bhagat Lal Dutta, Alain Joly, Elisabeta Vergu, et Pauline Ezanno. 2019. « Neighbourhood Contacts and Trade Movements Drive the Regional Spread of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) ». *Veterinary Research* 50 (1). doi:10.1186/s13567-019-0647-x.
- Robinson, S. E., E. J. Wright, C. A. Hart, M. Bennett, et N. P. French. 2004. « Intermittent and persistent shedding of *Escherichia coli* O157 in cohorts of naturally infected calves ». *Journal of applied microbiology* 97 (5): 1045-53.
- Schürch, A.C., S. Arredondo-Alonso, R.J.L. Willems, et R.V. Goering. 2018. « Whole Genome Sequencing Options for Bacterial Strain Typing and Epidemiologic Analysis Based on Single Nucleotide Polymorphism versus Gene-by-Gene-Based Approaches ». *Clinical Microbiology and Infection* 24 (4): 350-54. doi:10.1016/j.cmi.2017.12.016.
- Stein, Richard A., et David E. Katz. 2017. « *Escherichia coli*, cattle and the propagation of disease ». *FEMS microbiology letters* 364 (6).
- Stimson, James, Jennifer Gardy, Barun Mathema, Valeriu Crudu, Ted Cohen, et Caroline Colijn. 2019. « Beyond the SNP threshold: identifying outbreak clusters using inferred transmissions ». *Molecular biology and evolution* 36 (3): 587-603.
- Tamminen, Lena-Mari, Robert Söderlund, David A. Wilkinson, Maria Torsein, Erik Eriksson, Mikhail Churakov, Johan Dicksved, Linda J. Keeling, et Ulf Emanuelson. 2019. « Risk factors and dynamics of verotoxigenic *Escherichia coli* O157: H7 on cattle farms: An observational study combining information from questionnaires, spatial data and molecular analyses ». *Preventive veterinary medicine* 170: 104726.

Welfare Quality®. 2009. « Welfare Quality® assessment protocol for cattle ». Welfare Quality® Consortium, Lelystad, Netherlands.

Zhou, Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Khaled Mohamed, et Mark Achtman. 2019. « The User's Guide to Comparative Genomics with Enterobase. Three Case Studies: Micro-Clades within Salmonella Enterica Serovar Agama, Ancient and Modern Populations of Yersinia Pestis, and Core Genomic Diversity of All Escherichia ». *BioRxiv*, avril. doi:10.1101/613554.

Zhou, Zhemin, Nabil-Fareed Alikhan, Martin J. Sergeant, Nina Luhmann, Cátia Vaz, Alexandre P. Francisco, João André Carriço, et Mark Achtman. 2018. « GrapeTree: visualization of core genomic relationships among 100,000 bacterial pathogens ». *Genome research* 28 (9): 1395-1404.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

PARTICIPATION ANSES

La coordination scientifique du projet a été assurée par l'Unité d'Évaluation des Risques liés aux Aliments (UERALIM).

Coordination et contribution scientifique

Mme Estelle CHAIX – Coordinatrice d'expertise scientifique – UERALIM – Direction de l'Évaluation des Risques

Contribution scientifique

M. Laurent GUILLIER – Chef de projets scientifiques et techniques – UERALIM – Direction de l'Évaluation des Risques

M. Moez SANAA – Chef d'Unité – UERALIM – Direction de l'Évaluation des Risques

Secrétariat administratif

Mme Angélique LAURENT – Direction de l'Évaluation des Risques

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

CNR et CNR associé

Mme Patricia MARIANI-KURKDJIAN – Responsable *E. coli* producteur de Shiga toxines – Centre National de Référence associé *E. coli* Hôpital Robert-Debré – 31 juillet 2019

M. François-Xavier WEILL – Responsable du Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* – Institut Pasteur – 14 novembre 2019

Mme Sophie LEFEVRE – Directrice adjointe du Centre National de Référence des *Escherichia coli*, *Shigella* et *Salmonella* – Institut Pasteur – 14 novembre 2019

Santé publique France

Mme Gabrielle JONES – Épidémiologiste – Direction des régions – Santé publique France – 3 septembre 2019

Mme Henriette DE VALK – Responsable de l'Unité infections entériques, alimentaires, zoonoses, Direction des maladies infectieuses – Santé publique France – 3 septembre 2019

LNR

Mme Delphine SERGENTET – Responsable du Laboratoire National de Référence *E. coli* – 30 août 2019

Filière

M. Bruno MATHIEU – Responsable maîtrise sanitaire du Syndicat Interprofessionnel du Reblochon – 21 août 2019

Mme Anne-Laure BOMPAS – Directrice industrielle au sein des fromageries Chabert – 21 août 2019

M. Olivier GIRARDET – Directeur de la Société Fromagère d'Éteaux, affiliée au groupe Lactalis – 21 août 2019

Mme Valérie MICHEL – Responsable de l'Unité Microbiologie Laitière à ACTALIA – 21 août 2019