

Rapport annuel d'activité

2019

Centre National de Référence
virus des gastro-entérites

Année d'exercice
2018



RÉSUMÉ ANALYTIQUE

I. LE CNR VIRUS DES GASTRO-ENTÉRITES

Le CNR virus des gastro-entérites (CNRvge) est hébergé au sein du Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon. Le CNRvge y bénéficie d'une autonomie administrative (Unité Fonctionnelle spécifique) mais partage locaux et équipements avec le laboratoire au sein de la Plate-forme de Biologie Hospitalo-Universitaire (PBHU). Le CNRvge a été reconduit en 2017 et son responsable est le Professeur Alexis de ROUGEMONT. Quatre biologistes (environ 2 ETP), 5 techniciens (4,3 ETP) et 1 secrétaire participent à l'activité.

II. LES MISSIONS ET LE CONTEXTE

Le CNRvge a des missions d'expertise, de surveillance et d'alerte en lien avec Santé Publique France (SPF) dans le domaine des gastro-entérites virales. En France comme en Europe, les gastro-entérites virales posent surtout un problème de morbidité, mais qui est polymorphe car **i)** deux virus en sont les principaux agents, les rotavirus (pour lesquels nous disposons d'un vaccin) et les norovirus; **ii)** trois groupes de patients sont principalement concernés par ces infections : les enfants pour le rotavirus, les personnes âgées vivant en collectivités (EHPAD surtout) pour les norovirus ; et enfin, les immunodéprimés ; **iii)** et ces infections surviennent régulièrement en période hivernale ou bien par épidémies brutales (cas groupés) lors de contaminations alimentaires ou hydriques.

III. LES OBJECTIFS DU CNR ET LES PRINCIPAUX RÉSULTATS EN 2018

Dans ce contexte, le CNRvge a concentré ses actions autour de 3 objectifs principaux : **i)** l'expertise virologique pour la communauté médicale, **ii)** la surveillance des gastro-entérites infantiles à rotavirus et **iii)** les gastro-entérites épidémiques en EHPAD.

i) Activités d'expertise virologique

- **évaluation de quatre tests triplex immunochromatographiques et treize tests de biologie moléculaire de divers fabricants pour la détection des norovirus et/ou rotavirus dans les selles.** Les résultats nous permettent un conseil avisé aux collègues qui nous contactent.
- **investigations virologiques chez 283 patients immunodéprimés.** Nous apportons notre expertise dans le diagnostic et le suivi de ces patients.
- **expertises virologiques de 292 cas sporadiques.** Nous apportons notre aide et notre expertise dans le diagnostic de cas parfois complexes.
- **bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal.** Nous apportons notre expertise aux institutions en charge de la réglementation (ANSM) et aux cliniciens utilisant cette approche thérapeutique (transfert technique et conseils).

ii) Gastro-entérites infantiles à rotavirus

Afin de pouvoir apprécier l'impact de la vaccination sur l'évolution ou l'émergence des génotypes du rotavirus, le CNRvge réalise une surveillance moléculaire continue depuis la saison 2001-2002. Les principaux résultats montrent une variabilité cyclique des génotypes avec l'émergence des souches G9 et G12, et une grande variabilité géographique. **Le point significatif de la saison 2017-2018 est la poursuite de la diffusion du génotype G9P[8] (47,0%) suite à sa réémergence en 2014-2015 et l'émergence d'un génotype G3P[8] « equine-like ».** Le génotype G1P[8], moins fréquent cette saison (16,2%), reste le premier génotype toutes saisons confondues.

iii) Gastro-entérites épidémiques en EHPA / EHPAD ou cas groupés de gastro-entérites

Le CNRvge, en collaboration avec SPF, les CIRE, les ARS, les EHPAD et les LABM, réalise les investigations virologiques s'intégrant dans la prise en charge épidémiologique globale de ces épidémies.

- les points majeurs de la dernière saison de surveillance (2017-2018) a été la **prépondérance du variant recombinant GII.P16-GII.4(2012) (45,0%) et l'augmentation de la circulation des norovirus GI (29,4%)**
- une étude prospective effectuée sur **neuf années consécutives montre que les épidémies à norovirus représentent une charge importante pour les des établissements de long séjour** qui nécessiterait d'être évaluée sur le plan médico- économique.

IV. BILAN SCIENTIFIQUE

Les travaux de recherche du CNRvge ont fait l'objet de **9 publications internationales en 2018.**

EXECUTIVE SUMMARY

I. THE NRC FOR GASTROENTERITIS VIRUSES

The NRC for gastroenteritis (NRCgev) virus is located in the Laboratory of Virology at the University Hospital of Dijon. The NRCgev benefits from administrative autonomy (specific Functional Unit) but shares premises and equipment with the laboratory within the Hospital-University Biology Platform. The NRCgev was renewed in 2017 and its head is Prof. Alexis de ROUGEMONT, MD PhD. Four biologists (about 2 FTEs), 5 technicians (4.3 FTEs) and 1 secretary are involved in the activity.

II. MISSIONS AND CONTEXT

The NRCgev has expertise, surveillance and alert missions related to Santé Publique France (SPF) in the field of viral gastroenteritis. In France as in Europe, viral gastroenteritis are essentially a problem of morbidity, but it is polymorphic because **i)** two viruses are the main agents, rotavirus (for which there is a vaccine) and norovirus; **ii)** three groups of patients are mainly concerned by these infections: children for rotavirus, elderly people living in communities (especially nursing homes) for noroviruses; and at last, immunocompromised patients; **iii)** and these infections occur frequently during winter time (person-to-person transmission) or food- and waterborne outbreaks (grouped cases).

III. OBJECTIVES AND MAIN RESULTS OF THE NRC IN 2018

In this context, the NRCgev has focused its actions around 3 main objectives: **i)** virological expertise for the medical community, **ii)** surveillance of rotavirus gastroenteritis in children and **iii)** gastroenteritis outbreaks in nursing homes.

i) Virological expertise activities

- **Evaluation of four triplex immunochromatographic tests and thirteen molecular biology tests from various manufacturers for the detection of noroviruses and/or rotaviruses in stool samples.** The outcomes help us to provide useful advice to colleagues who call us.
- **Virological investigations in 283 immunocompromised patients.** We bring our expertise in the diagnosis and follow-up of these patients
- **Virological expertise of 292 sporadic cases.** We bring our help and expertise in the diagnosis of sometimes complex cases.
- **Virological assessment prior to fecal microbiota transplant.** We bring our expertise to regulation institution (ANSM) and clinicians using this therapeutic approach (technical transfer and advice).

ii) Infant rotavirus gastroenteritis

In order to assess the impact of vaccination on the evolution or emergence of new rotavirus genotypes, the NRCgev is monitoring rotavirus infections since the 2001-2002 season. The main results show cyclic change in genotypes with the emergence of G9 and G12 strains, and a great geographical variability. **The significant observation of the 2017-2018 season is the continued spread of the G9P[8] genotype (47.0%) following its re-emergence during the 2014-2015 season and the emergence of a G3P[8] "equine-like".** The G1P[8] genotype, less frequent this season (16.2%), remains the first all-season genotype.

iii) Epidemic gastroenteritis in nursing homes or grouped cases of gastroenteritis

The NRCgev, in collaboration with SPF, the CIRE (Cellules d'Intervention en Région), the ARS (Agence Régionale de Santé), nursing homes and private laboratories, carries out virological investigations relevant in the global epidemiological management of these epidemics.

- the last winter surveillance season (2017-2018) showed the preponderance of the **GII.P16-GII.4 (2012) recombinant (45,0%) and the increase in circulation of GI noroviruses (29,4%)**
- a prospective study carried out over **nine consecutive years shows that norovirus outbreaks represent a significant burden for nursing homes** which would need to be evaluated on a medico-economic level.

IV. SCIENTIFIC REPORT

The NRCgev research works led to **9 international publications in 2018.**

SOMMAIRE

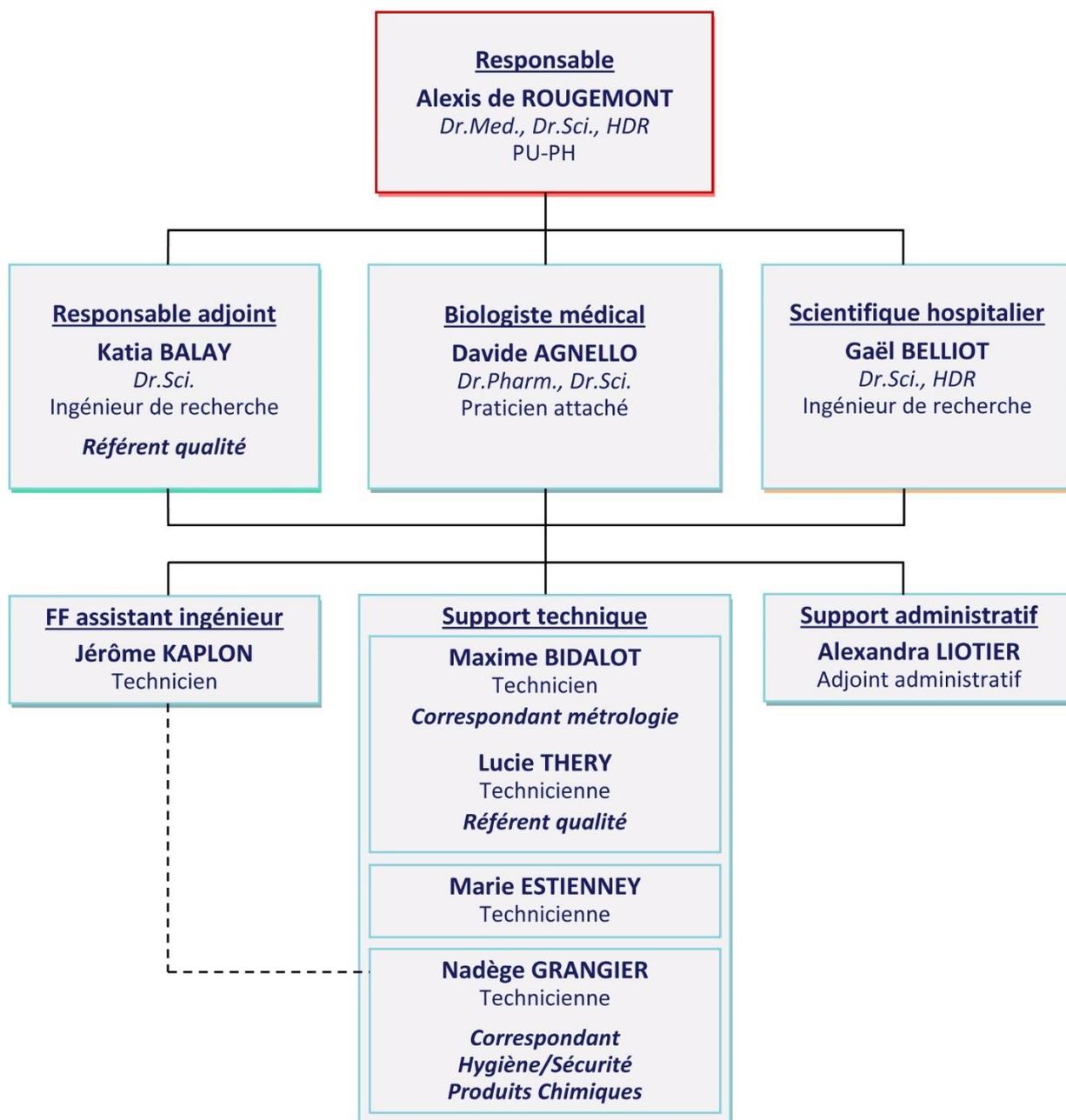
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	1
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	3
2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR	3
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES	3
2.3 TRANSFERT DES TECHNIQUES À D'AUTRES LABORATOIRES	4
2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES	4
2.5 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DU CNR EN 2018	4
2.5.1 Investigations virologiques des épidémies de cas groupés	4
2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal	8
2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques	8
2.5.4 Délai de restitution des résultats	10
2.6 ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE	11
3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE	13
3.1 DESCRIPTION DU RÉSEAU DE PARTENAIRES	13
3.1.1 Réseau de surveillance des cas groupés de gastro-entérites	13
3.1.2 Réseau de surveillance des gastro-entérites à rotavirus	15
3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES INFECTIONS	15
3.2.1 Caractéristiques épidémiologiques des cas groupés	15
3.2.2 Caractéristiques virologiques des épidémies de gastro-entérites à rotavirus en France : bilan de la surveillance de la saison 2017-2018	18
3.3 INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	25
3.3.1 Réseaux internationaux « NoroNet » et « EuroRotaNet »	25
3.3.2 Réseaux avec les pays Africains	26
3.4 ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE	26
3.4.1 Suivi des établissements long séjour du CHU de Dijon	26
3.4.2 Caractérisation de nouveaux virus dans les selles de patients	26
4. ALERTE	27
4.1 CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE (SPF)	27
4.2 PROCÉDURES D'ALERTE DE SPF ET DES AUTRES PARTENAIRES	27
4.2.1 Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...)	27
4.2.2 Arrivée de prélèvements sans annonce préalable	27
4.3 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	27
4.3.1 Transmission des données à SPF Voozanoo	27
4.3.2 Anonymisation des prélèvements	27
5. ACTIVITÉS DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	29
5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ	29
5.1.1 Site internet « www.cnr-ve.org »	29
5.1.2 Activité de formation	29
5.1.3 Activité de conseil aux professionnels de santé	29
5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES	29

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR	31
<hr/>	
6.1 ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU CNR EN COURS POUR 2018	31
6.1.1 Études en cours non publiées	31
6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie	32
6.1.3 Études épidémiologiques en France et dans le monde(<i>abstracts</i>)	32
6.1.4 Investigation d'épidémies d'origine animale (<i>abstracts</i>)	34
6.1.5 Détection des virus entériques dans l'environnement (<i>abstracts</i>)	34
6.1.6 Recherche fondamentale sur les virus entériques (<i>abstracts</i>)	35
6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2018)	36
6.2.1 Publications internationales	36
6.2.2 Publications nationales et chapitres d'ouvrage	37
6.2.3 Communications internationales	37
6.2.4 Communications nationales	37
7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX, INDUSTRIELS	39
<hr/>	
7.1. COOPÉRATIONS STRUCTURELLES DANS LE CADRE DES ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE ET D'ALERTE	39
7.2. COOPÉRATIONS DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE	39
7.2.1 Coopérations universitaires	39
7.2.2 Projets	39
7.2.3 Collaboration avec l'INRA	40
7.2.4 Conclusion sur nos coopérations	40
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR LES ANNÉES SUIVANTES	41
<hr/>	
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	41
8.1.1 Évaluation de trousse de diagnostic	41
8.1.2 Développement de techniques	41
8.1.3 Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections	42
8.1.4 Travaux d'évaluation de techniques	42
8.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires	43
8.1.6 Recherche liées avec les missions du CNR des virus des gastro-entérites	43
8.2. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE	44
8.2.1 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à rotavirus	44
8.2.2 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à norovirus	44
8.3. CONTRIBUTION À L'ALERTE	45
8.4. ACTIVITÉ D'INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL	45
8.4.1 Modalités de diffusion de l'information et des résultats	45
8.4.2 Collaboration/expertises auprès d'instances nationales ou internationales	45
8.4.3 Activité de formation	45

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CN

Les missions et l'organisation du CNR des virus des gastro-entérites sont détaillées dans l'**annexe 1**. Elles ont été définies dans le cahier des charges spécifiques du CNR paru en 2016 pour la période 2017-2021. Aucune modification n'est intervenue à ce niveau en 2018.

Organigramme CNR virus des gastro-entérites (CNRvge)



2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

Éléments clefs de l'activité d'expertise du CNRVge en 2018 :

- délai moyen de rendu des résultats de 2,5 jours
- évaluation de quatre tests immunochromatographiques triplex rota-Adeno/noro et treize tests de biologie moléculaire pour la détection des norovirus et/ou rotavirus dans les selles.
- expertises virologiques de 184 épidémies de cas groupés : 160 souches de norovirus dont 70,6% de GII (45,0% de GII.4, majoritairement des GII.P16-GII.4(2012) et 29,4% de GI, en nette augmentation.
- investigations virologiques chez 283 patients immunodéprimés : 23,0% de patients positifs et prépondérance des norovirus (38 souches).
- expertises virologiques de 292 cas sporadiques.
- bilan virologique de 27 selles pour transplantation de microbiote fécal.

2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR

Nous avons validé et passé en routine une technique multiplex maison de PCR en temps réel (RT-qPCR) pour la détection des nouveaux astrovirus des clades MLB (MLB-1 à MLB-3) et VA (VA-1 à VA-5) dans les selles et autres prélèvements.

Nous déployons actuellement des techniques de RT-qPCR pour la détection de nouveaux virus impliqués dans les diarrhées virales : les cosavirus et salivirus (*Picornaviridae*) et les bufavirus (*Parvoviridae*).

Nous avons d'autre part développé des techniques maison de RT-qPCR pour la détection des virus de l'hépatite A et de l'hépatite E.

Enfin, nous développons progressivement des techniques de séquençage haut-débit (NGS) pour la détection des virus entériques ARN dans les selles à l'aide de la plate-forme Illumina (MiSeq et NextSeq) disponible au CHU. Un technicien faisant fonction d'assistant ingénieur a été formé aux systèmes de bio-informatique. Le déploiement de ces techniques se feront progressivement au cours de l'exercice du mandat du CNRVge.

Les procédures de référence disponibles pour la détection par qPCR/RT-qPCR (adénovirus, virus Aichi, astrovirus, bocavirus, rotavirus du groupe A, norovirus GI et GII, sapovirus, entérovirus, paréchovirus, hépatite A, hépatite E) et par RT-PCR (CMV et génotypage des rotavirus groupe A) sont détaillées dans l'annexe 2.

2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES

Au cours de l'année 2018, nous avons évalué :

- **quatre trousse immunochromatographiques (ICG) triplex**, actuellement sur le marché, pour la détection dans les selles des **norovirus, rotavirus et adénovirus**, et comparé leurs performances aux techniques de RT-qPCR employées en routine au CNRVge. Il s'agit des trousse : bioMérieux bioNexia® Noro/Rota-Adeno (réf. 415089), Biosynex Immunoquick® NoRotAdeno (réf. 1150013), CerTest Rota+Adeno+Noro Combo Card (réf. RA872001V) et R-Biopharm Rida® Quick Rota/Adeno/Noro Combi (réf. N1903). Cette évaluation a porté sur 194 selles positives génotypées ou négatives issues des collections du CNRVge. Les résultats de cette évaluation donneront lieu à une publication au cours de l'année 2019 et une communication officielle sera diffusée.
- **treize trousse de biologie moléculaire simple et/ou multiplex**, actuellement sur le marché, pour la détection dans les selles à minima des **norovirus et rotavirus**, et comparé leurs performances aux techniques de RT-qPCR employées en routine au CNRVge. Il s'agit des trousse :
 - 4 trousse rotavirus** : Altona Diagnostics RealStar® Rotavirus RT-PCR Kit 1.0 (réf. 561013), Certest Biotec Viasure® Rotavirus Real time PCR detection kit (réf. VS-RTV112L), PrimerDesign Genesig® Rotavirus A (réf. Path-RotavirusA), R Biopharm Ridagene® Viral Stool Panel II (réf. PG1325);
 - 5 trousse norovirus** : Altona Diagnostics RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 (réf. 052013), Certest Biotec Viasure® Norovirus GI + GII Real time PCR detection kit (réf. VS-NOR112L), PrimerDesign Genesig® Norovirus Genogroups I and II (ref. Path-Norovirus), R Biopharm Ridagene® Norovirus I et II (réf. PG1415), Eurobio EurobioPlex® Norovirus (réf. EBX-025)
 - 4 trousse multiplex** : Diagenode G-DiaNota® Norovirus I/II Rotavirus (ref. DDGG10-L100), Fast-

track Diagnostics FTlyoViral® Gastroenteritis (réf. FTlyo-3s-64-L), Seegene Allplex® GI virus (réf. GI9701X), Immundiagnostik AG MutaPLEX® GastroSys 1 (réf. KG198696). Ces évaluations ont porté sur les 194 selles positives génotypées et quantifiées ou négatives issues des collections du CNRvge (les mêmes que pour l'évaluation des ICG). Les résultats de cette évaluation donneront lieu à une publication au cours de l'année 2019 et une communication officielle sera diffusée.

Ces évaluations de trousse de diagnostic nous permettent de donner des conseils appropriés aux laboratoires de microbiologie publics ou privés souhaitant les utiliser.

2.3 TRANSFERT DES TECHNIQUES À D'AUTRES LABORATOIRES

Des réactifs pour le diagnostic des norovirus et des rotavirus sont désormais largement commercialisés. De ce fait, la demande de transfert de techniques se pose rarement. Pour répondre à la demande des laboratoires français, mais aussi étrangers ou d'Outre-Mer, nous fournissons nos procédures et nous assurons un soutien technique à distance.

Néanmoins, la demande la plus fréquente des laboratoires français, comme étrangers, est **la fourniture de témoins positifs**. Nous disposons à cet effet d'un stock d'échantillons de selle dont le virus est parfaitement caractérisé.

Avec l'objectif de disposer d'un contrôle externe pour les tests immunochromatographiques, nous avons développé une collection d'antigènes synthétiques sous forme de particules virales de synthèse (VLP) dérivées principalement des norovirus humains dont nous possédons un large panel. Ces VLP correspondent en autres aux principaux génotypes circulant en France, dont les derniers variants (**annexe 2**).

2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES

Nos collections de selles sont référencées au Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand-Cabanne du CHU de Dijon dans la section « microbiologie » en 4 collections distinctes : « rotavirus », « norovirus », « autres virus » et « selles négatives ». Une filière spécifique a été mise en place pour le traitement et l'archivage des selles au CRB avec l'acquisition d'un nouveau PSM dédié.

Nos prélèvements, souches caractérisées, VLP et anticorps sont disponibles à tous les laboratoires publics qui en font la demande dans un but d'évaluation de leurs techniques de diagnostic. La mise à disposition de ces matériels biologiques viraux à des sociétés privées est possible dans le cadre d'un contrat entre ces sociétés et notre établissement.

2.5 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DU CNR EN 2018

2.5.1 Investigations virologiques des épidémies de cas groupés

1/ Données épidémiologiques

Dans la quasi-totalité des épidémies, l'alerte a été effectuée directement ou indirectement via SPF, les CIRE ou les délégations territoriales des ARS concernées. Les prélèvements ont été transmis par des laboratoires publics ou privés, ou directement par l'établissement concerné par l'épidémie. L'acheminement a été effectué par voie postale dans la plupart des cas ou, lorsque le nombre de prélèvements le justifiait, par un transporteur agréé (p. ex. la société TSE à Lyon).

En 2018, nous avons expertisé 184 épidémies dont 145 étaient positives pour un virus entérique soit 78,8% (pour 87,6% d'entre elles, un norovirus était retrouvé seul ou associé à un autre virus) (**Tableau 2**). Si on analyse **les 39 épidémies « négatives » (21,2%)**, on constate que pour 13 (33,3%) d'entre elles nous n'avons qu'un seul prélèvement. Or, l'observation des données montre qu'en disposant de **3 à 4 prélèvements par épidémie nous pouvions prouver l'étiologie d'une épidémie quand elle est virale (Tableau 3)**.

Entre 2012 et 2017, Nous avons expertisé 1694 épidémies et détecté un virus pour 1397 d'entre elles soit 82,5%. Nous avons retrouvé un norovirus seul ou associé à d'autres virus pour 90,3% de ces épidémies positives.

Au total en 2018, 604 échantillons ont été analysés, soit une moyenne de 3,3 ±2,3 échantillons et une médiane de 3 échantillons par épidémie :

- **145 épidémies « positives » comprenant :**
 - **505 prélèvements analysés**, soit une moyenne de 3,5 ±2,4 échantillons et une médiane de 3 échantillons analysés / épidémie,
 - **363 prélèvements positifs**, soit une moyenne de 2,5 ±2,0 positifs et une médiane de 2 positifs / épidémie,
- **39 épidémies « négatives » comprenant 99 prélèvements analysés**, soit une moyenne de 2,5 ±1,6 échantillons et une médiane de 2 échantillons analysés / épidémie.
- **rapport (échantillons positifs / analysés)**
 - 60,1% des échantillons analysés contenaient au moins un virus,
 - 71,9% des échantillons analysés issus des épidémies « positives » contenaient au moins un virus.

Tableau 2 : Tableau annuel comparatif des prélèvements analysés entre 2012 et 2018

épidémies		infections	virus								étiologie inconnue
			NoV	SaV	RVA	AdV	AstV	AiV	EV	autres	
2012	338	mono : 266	237	5	20	4	0	0	0		59 (17,5%)
		mixtes : 13	13	4	6	4	2	2	1		
2013	304	mono : 254	232	3	9	7	3	0	0		38 (12,5%)
		mixtes : 12	7	8	2	5	4	3	1		
2014	242	mono : 174	156	5	6	3	3	0	1		57 (23,6%)
		mixtes : 11	11	6	7	5	2	1	0		
2015	225	mono : 179	152	6	15	2	1	2	1		27 (11,8%)
		mixtes : 19	19	7	6	3	3	5	1		
2016	348	mono : 267	254	1	6	3	2	0	0	1*	58 (16,9%)
		mixtes : 23	19	8	9	7	2	2	2		
2017	237	mono : 173	155	3	12	2	1	0	0		58 (24,5%)
		mixtes : 6	6	3	3	0	1	0	0		
2018	184	mono : 135	119	8	7	1	0	0	0		39 (21,2%)
		mixtes : 10	8	7	3	2	2	2	0		

NoV : norovirus ; SaV : sapovirus ; RVA : rotavirus ; AdV : adénovirus ; AstV : astrovirus ; AiV : virus Aichi ; EV : entérovirus ; *Bocavirus

Pour 71 des 145 épidémies « positives », le nombre de prélèvements positifs correspondait exactement au nombre de prélèvements reçus au laboratoire du CNR. Cette proportion est globalement proche de celle observée les trois années précédentes avec 49,0% d'adéquation contre 50,3% (2017), 47,2% (2016) et 52,5% (2015) mais plus faible que la moyenne de l'ensemble de la période 2012-2017 (54,4%).

En 2018, nous avons expertisé **184 épidémies dont 145 étaient positives** pour un virus entérique soit **78,8%** (pour 87,6% d'entre elles, un norovirus était retrouvé seul ou associé à un autre virus). Si on analyse **les 39 épidémies « négatives » (21,2%)**, on constate que pour 13 (33,3%) d'entre elles nous n'avions qu'un seul prélèvement.

Tableau 3 : Distribution des épidémies selon le nombre de prélèvements analysés et le nombre de prélèvements positifs

2018		Nombre de prélèvements analysés												Total
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	13	
Nombre de prélèvements positifs	0	13	9	8	4	3	1	1						39
	1	23	11	12	2	4		1				1		54
	2		20	13	2	1	1							38
	3			19	7		4							30
	4				3	4	1							8
	5					1	1		1					3
	6						3	1		1				5
	7							1	1		2			4
	8													0
	9									1	1		1	3
Total		36	40	52	18	11	5	2	2	2	3	1	1	184

2/ Principales souches virales caractérisées

Les norovirus (Tableau 4)

- **160 souches de norovirus ont été caractérisées en 2018 dans 127 épidémies dont :**
 - 47 souches de NoV-GI, soit 29,4%
 - **113 souches de NoV-GII, soit 70,6%**
 - pour comparaison, nous avons caractérisé 1443 souches dans 1279 épidémies dont 22,0% de NoV GI et 88,0% de NoV GII sur la période 2012-2017. Cette différence pourrait s'expliquer par le mode de transmission (hydrique, alimentaire ou de personne-à-personne).
- **le génotype GII.4 représentait 45,0% des NoV avec 72 souches** dont :
 - **51 souches GII.P16-GII.4(2012)**, nouveau NoV recombinant prédominant apparu fin 2016,
 - 10 souches recombinantes GII.Pe-GII.4(2012).
- **le génotype GII.17 ne représentait plus que 4,4% des NoV avec 7 souches** contre 14,6% en 2017. Il s'agit du variant GII.17 Kawasaki-308 qui avait émergé en Europe en 2016 et était devenu temporairement le génotype de norovirus principal en France.
- **les autres génotypes (34 souches) dont divers recombinants (20 souches) associés aux génotypes GII.2, GII.3 et GII.6** ont circulé sur la période. En particuliers, **les GII.P16-GII.2**, apparus concomitamment avec les GII.P16-GII.4 fin 2016, ont régulièrement circulé en 2018 et, avec 16 souches, **représentaient près de la moitié (43,2%) des souches GII non GII.4.**
- **les NoV GI ont été beaucoup plus fréquemment impliqués dans les épidémies avec une fréquence de 29,4% soit 47 souches** représentant 7 génotypes différents (sur les 9 appartenant au génogroupe I). **Le virus de Norwalk (GI.1) a été le génotype le plus fréquemment retrouvés avec 25,5%** de l'ensemble des souches GI détectées.

Les autres virus détectés en 2018 (33 souches) :

- **rotavirus : 10 souches ont été caractérisées dans 10 épidémies** (2 n'étaient pas typables). Les principaux génotypes retrouvés étaient **G9P[8]** suivi des génotypes G2P[4] et G12P[8],
- **sapovirus : 15 souches ont été caractérisées dans 15 épidémies** (2 n'étaient pas typables). **SaV GI.2** était le génotype le plus fréquent avec 8 souches détectées (53,3%),
- **adénovirus : 3 souche AdV** dont **une souche entérique** (AdV-F types 40 et 41),
- **astrovirus : 2 souches AstV** dont **une de génotype 2** et une non typable,
- **aichivirus : 2 souche AiV** de génotype B,
- **bocavirus : 1 souche BoV** de génotype 1.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des souches de norovirus caractérisées entre 2012 et 2018.

		2012			2013			2014			2015			2016			2017			2018				
Norovirus		GI	GII	%																				
Génogroupe I (GI)	GI non typable	9		3,5%	5		1,9%	14		7,2%	4		2,1%	1		0,3%	5		2,9%	4		2,5%		
	GI.1							1		0,5%				5		1,7%	1		0,6%	12		7,5%		
	GI.2							6		3,1%	5		2,6%	2		0,7%	3		1,8%	5		3,1%		
	GI.3	7		2,7%	9		3,4%	8		4,1%	8		4,1%	5		1,7%	5		2,9%	1		0,6%		
	GI.4	5		1,9%	4		1,5%	2		1,0%	2		1,0%	4		1,3%	2		1,2%	8		5,0%		
	GI.5													3		1,6%	4		1,3%				4	2,5%
	GI.P4-GI.5																						1	0,6%
	GI.6	9		3,4%	10		3,8%	2		1,0%	5		2,6%	1		0,3%	1		0,6%	4		2,5%		
	GI.Pb-GI.6																			1		0,6%	2	1,3%
	GI.7	3		1,2%																1		0,6%	6	3,8%
	GI.8				1		0,4%	1		0,5%														
GI.9				2		0,8%																		
Génogroupe II (GII)	GII non typable		8	3,1%		10	3,9%		10	5,2%		5	2,6%		14	4,7%		13	7,6%		4	2,5%		
	GII.1		10	3,9%		3	1,2%		8	4,1%		17	8,9%		3	1,0%								
	GII.2		2	0,8%		6	2,3%		8	4,1%		16	8,2%		9	3,0%		6	3,5%		3	1,9%		
	GII.P16-GII.2														9	3,0%		12	7,1%		16	10,0%		
	GII.3		3	1,2%					2	1,0%					5	1,7%								
	GII.P12-GII.3																					1	0,6%	
	GII.P16-GII.3																					1	0,6%	
	GII.P21-GII.3		1	0,4%		3	1,1%		2	1,0%		2	1,0%		1	0,3%								
	GII.Pc-GII.3																						2	1,3%
	GII.4(1987)														1	0,3%		1	0,6%					
	GII.4(2006a)																	1	0,6%					
	GII.4(2009)		91	35,0		3	1,1%		4	2,1%												1	0,6%	
	GII.4(2004/2012)																					3	1,9%	
	GII.4(2009/2012)					32	12,2		25	12,9		47	24,4		31	10,4		24	14,1		1	0,6%		
	GII.4(2012)		88	33,8		152	58,0		70	36,1		47	24,4		37	12,5		13	7,6%		1	0,6%		
	GII.Pe-GII.4(2012)											2	1,0%		4	1,3%		3	1,8%		10	6,3%		
	GII.P16-GII.4(1987)																					1	0,6%	
	GII.P16-GII.4(2012)															14	4,7%		50	19,4		51	31,9%	
	GII.P16-GII.4(2016)																		2	1,2%				
	GII.P21-GII.4(2012)																					4	2,5%	
	GII.5					1	0,4%																	
	GII.P22-GII.5					1	0,4%																	
	GII.6		9	3,5%		12	4,6%		26	13,4		3	1,6%		5	1,7%		2	1,2%		1	0,6%		
GII.P7-GII.6		6	2,3%		1	0,4%		1	0,5%												1	0,6%		
GII.7		8	3,1%		2	0,8%								1	0,3%		2	1,2%						
GII.8					1	0,4%																		
GII.12											1	0,5%												
GII.13		1	0,4%								1	0,5%		1	0,3%						2	1,3%		
GII.P21-GII.13											1	0,5%		1	0,3%									
GII.14					3	1,1%					1	0,5%		1	0,3%									
GII.15																					2	1,3%		
GII.16														1	0,3%						1	0,6%		
GII.17					1	0,4%		3	1,5%		22	11,4		133	44,8		22	12,9		7	4,4%			
GII.21								1	0,5%					1	0,3%									
GII.22														2	0,7%									
GIV.1											1	0,5%												
total		33	227	260	31	231	262	34	160	194	27	160	187	22	275	299	19	151	170	47	113	160		
%		13%	87%		12%	88%		18%	82%		14%	86%		7%	93%		11%	89%		29%	71%			

3/ Conclusions sur les virus entériques caractérisés

Les norovirus représentent la majorité (82,9%) des virus isolés à partir des selles analysées dans le cadre d'une investigation de cas groupés de gastro-entérites. Il s'agit essentiellement de **norovirus du génogroupe II (70,6% des norovirus détectés)**.

Jusqu'ici les variants du génotype GII.4 étaient prédominants et se succédaient selon un cycle de 2 à 3 années. Depuis 2017, les variants recombinants prédominent notamment le GII.P16-GII.4(2012) qui a émergé en 2016 en France et qui est devenu le génotype majeur avec 32,5% des souches de norovirus caractérisées, suivi par le génotype GIIP16.GII.2 avec 10,0%. Le génotype GII.17 variant Kawasaki-308 qui avait émergé au cours de l'hiver 2015-2016 avec presque 45% des souches de norovirus caractérisées est devenu largement minoritaire avec 4,4% des souches.

Au cours de l'année 2018, les norovirus GI ont été étonnamment plus fréquemment impliqués dans les épidémies avec une fréquence de 29,4%, notamment les GI.1, contre une moyenne de 15,8% au cours des 6 dernières années.

2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal

Nous participons depuis 2014 à divers programmes de recherche sur le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) par transplantation de microbiote fécal (TMF), notamment avec l'équipe du Pr. Harry SOKOL de l'APHP (étude REBALANCE) et de BIOFORTIS (MérieuxNutriSciences) via un accord cadre.

En 2018, nous avons analysés 27 échantillons de selles pour les CHU d'Amiens, Brest, Clermont-Ferrand, Saint-Etienne et de l'APHP (Cochin, Henri-Mondor et La Pitié-Salpêtrière) dans le cadre de TMF. En tout 4 prélèvements ont été disqualifiés par le CNR après la détection de norovirus (2), entérovirus (1) et parechovirus (1).

Notre expérience a été mise à disposition des autres laboratoires afin de favoriser l'accès à cette nouvelle thérapeutique.

2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques

Au cours de l'année 2017, le CNR a procédé à l'analyse de 1078 prélèvements de selles issus de cas de diarrhées sporadiques.

1/ Surveillance de patients immunodéprimés (Figure 1)

Nous avons reçu **330 selles représentant le suivi de 283 patients**. Nous n'avons reçu qu'un seul prélèvement pour 246 patients et 2 à 6 prélèvements pour 37 patients. Au total, **74 (22,4%) selles** chez 65 (23,0%) patients **étaient positives** pour 1 virus (56 patients) ou 2 virus (10 patients). Par ordre de fréquence : **norovirus (36 patients)**, adénovirus tout type (20 patients), sapovirus (12 patients), rotavirus (5 patients), entérovirus (5 patients), aichi virus (2 patients), astrovirus (2 patients), astrovirus MLB/VA (2 patients), bocavirus (1 patients).

Les principales souches virales caractérisées chez ces sujets immunodéprimés correspondaient à 86 souches de virus :

- **norovirus : 38 souches (Tableau 5)**
 - 8 souches de NoV-GI
 - **30 souches de NoV-GII**, soit 78,9% des norovirus détectés **dont 7 variants GII.4 (23,3%)** comprenant les recombinants GII.P16-GII.4(2012), GII.4(2004/2012) et GII.4(2009/2012).
- **sapovirus : 12 souches dont 7 souches GI.2.**
- **adénovirus : 20 souches dont 1 souche entérique et 15 souches non entériques** (groupe C et D essentiellement).
- **rotavirus : 5 souches** dont du G9P[8]
- **aichi virus : 2 souches** de génotype B
- **astrovirus : 2 souches** de génotype 1, les plus fréquents
- **astrovirus MLB/VA : 2 souches** de génotype MLB-1.

Tableau 5. Détail des typages des norovirus détectés chez des immunodéprimés en 2018

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI non typés	3	GI.3	1
	GI.1	1	GI.Pb-GI.6	1
	GI.2	1	GI.7	1
Génogroupe II	GII non typé	11	GII.P4(2004)-GII.4(2012)	2
	GII.Pm-GII.1	1	GII.P4(2009)-GII.4(2012)	2
	GII.P16-GII.2	2	GII.Pe-GII.4(2012)	1
	GII.Pc-GII.3	1	GII.P16-GII.4(2012)	2
	GII.6	4		
	GII.P7-GII.6	2		
	GII.10	1		

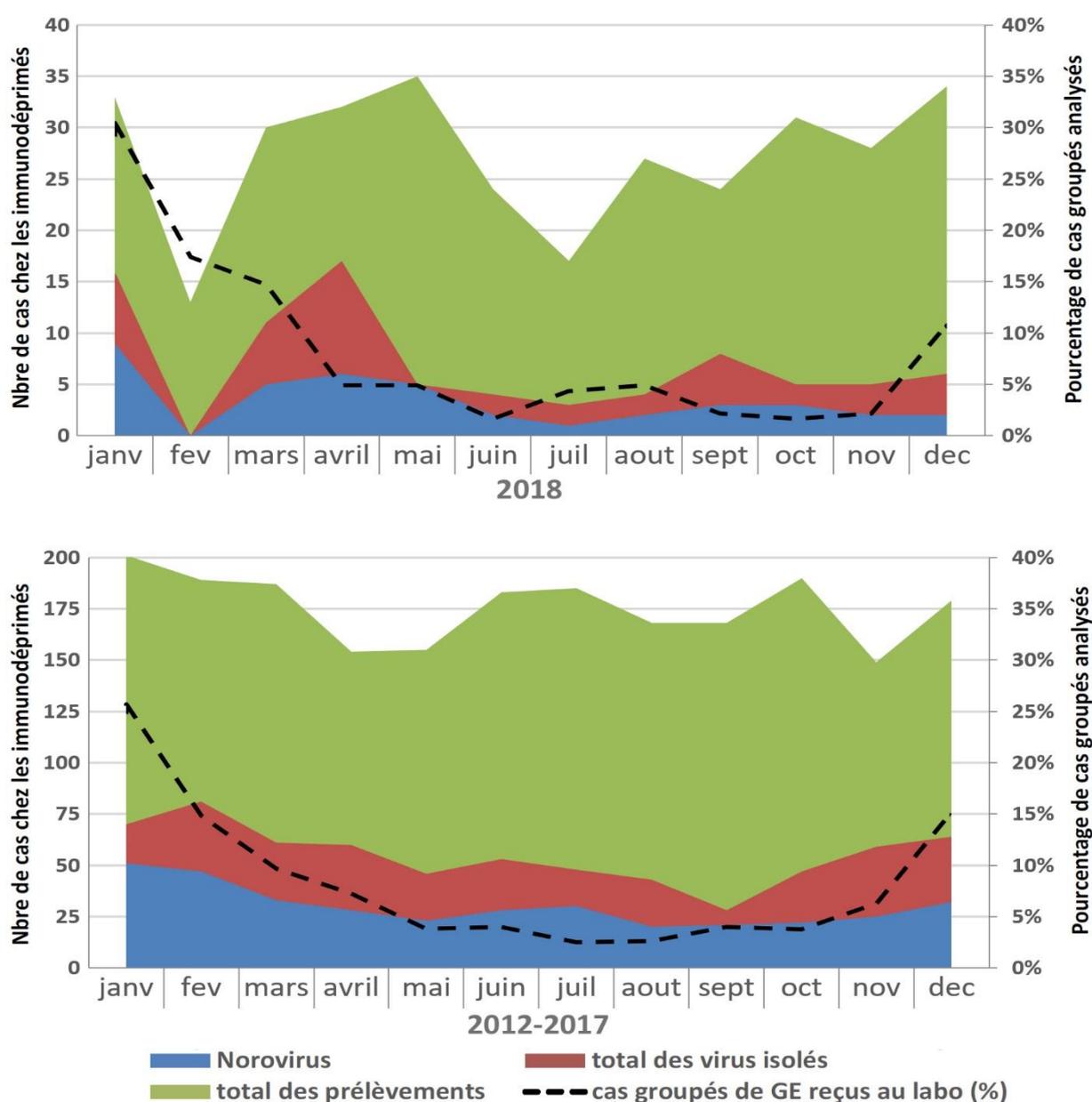


Figure 1 : Répartition saisonnière des virus isolés des selles diarrhéiques des patients immunodéprimés (1 prélèvement/patient) (a) 330 demandes entre janvier 2018 et décembre 2018 ; (b) 2140 demandes entre janvier 2012 et décembre 2017.

2/ Diagnostic de cas sporadiques de diarrhées aiguës

En 2018, nous avons analysés les selles de 292 patients souffrant de diarrhée aiguë et provenant de CHR, CHU ou LABM de toute la France. La moyenne d'âge était à 26,7 ans et la médiane à 11,3 ans [5 jours ; 97,8 ans]. En tout 54 patients étaient positifs pour au moins 1 virus entérique dont 5 patients présentaient de 2 ou 3 virus dans les selles. En tout, ont été détectés 18 norovirus (**Tableau 6**), 21 rotavirus (dont 6 G9P[8], 4 G1P[8] et 3 G3P[8]), 11 adénovirus (dont 4 AdV entériques de type 41), 2 entérovirus (Coxsackie A), 6 paréchovirus (dont 3 PeV-5), 2 sapovirus (GI.2) et 1 bocavirus, 1 hépatite E mais aucun astrovirus.

Tableau 6. Détail des typages des norovirus détectés dans les cas sporadiques en 2017

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI.1	2		
Génogroupe II	GII non typable	5	GII.P12-GII.3	1
	GII.2	1	GII.P21-GII.3	1
	GII.17	2	GII.Pc-GII.3	3
			GII.P16-GII.4(2012)	3

2.5.4 Délai de restitution des résultats

Afin de répondre au mieux au besoin d'un résultat diagnostique rapide pour le traitement des épidémies groupées et des cas sporadiques, le CNR s'est organisé afin de réduire au maximum les délais de restitution des résultats d'analyse. La recherche des norovirus GI et GII dans les selles, analyse accréditée COFRAC, est l'analyse principale qui sert de baromètre pour l'évaluation des délais de restitution.

L'analyse « norovirus GI/GII » est majoritairement réalisée dans un délai inférieur à 7 jours avec un pic à 1 et 2 jours, et une moyenne de 2,3 jours en 2017 et 2,5 jours en 2018 avec des médianes de 2 jours (Figure 2). Un allongement du délai de restitution peut être dû : à un rajout de l'analyse en seconde intention, à un traitement en deux temps, à une inhibition sur une autre analyse qui nécessite de répéter l'analyse, à un jour férié qui décale la mise en œuvre des autres analyses ou à une analyse d'un autre virus fait tardivement.

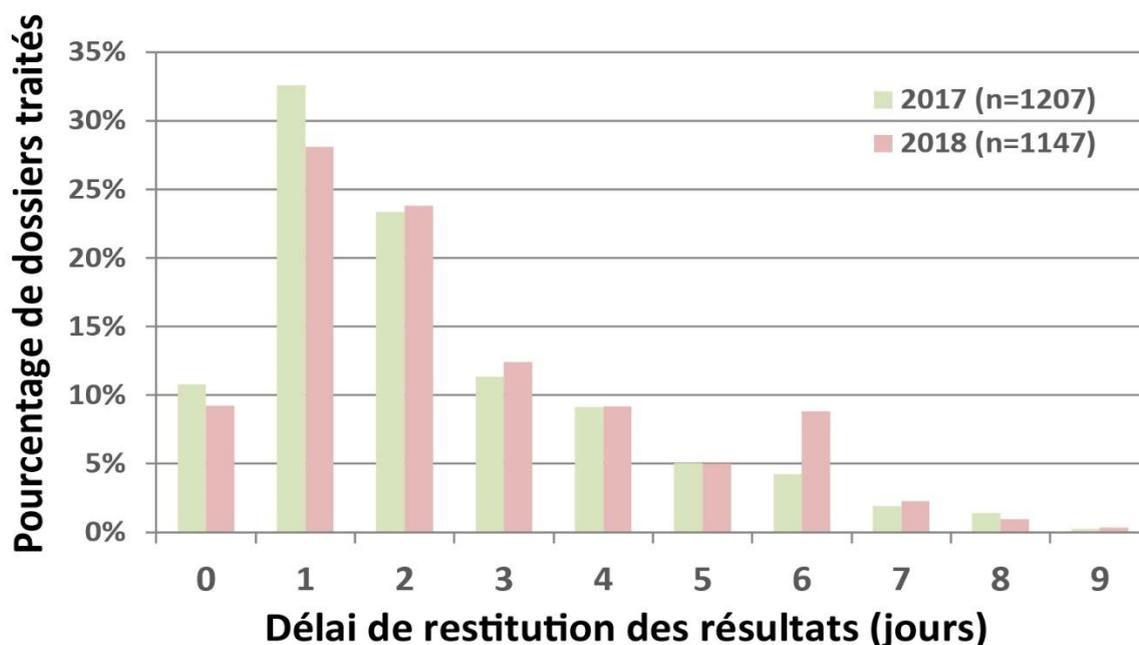


Figure 2 : Délai de restitution des résultats d'analyse de norovirus dans les selles en 2017 et 2018

2.6 ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE

Le CNRVge a accès à une plate-forme de séquençage haut-débit comportant actuellement deux séquenceurs Illumina[®] MySeq[®] et NextSeq[®] hébergé sur la Plate-forme de Biologie Hospitalo-Universitaire (PBHU) du CHU de Dijon. Bien qu'une aide à la bio-informatique soit disponible, l'assistant ingénieur du CNRVge a été formé à la bio-informatique pour le traitement des données. Les données sont traitées via le logiciel Galaxy puis à l'aide du logiciel de métagénomique BioNumerics que nous alimentons en continu depuis plusieurs années au sein du CNR. La mise en place des activités de séquençage NGS sur prélèvements de selles est un long processus qui permettra au CNR de répondre à la demande de détection du « virome intestinal » humain. Cette détection sera volontairement limitée à la détection des virus ARN majoritairement responsables des gastro-entérites chez l'homme. De nombreuses interférences existent avec notamment les ARN génomiques de l'hôte mais surtout les ARN ribosomiaux des microbiote et mycobiote intestinaux. Le CNR est actuellement en capacité d'effectuer des analyses de type NGS pour les norovirus et les rotavirus dans les selles mais elles seront prochainement disponibles pour les analyses pan-virales dans les selles.

3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

Éléments clefs de l'activité de surveillance du CNRvge en 2018 :

- surveillance du réseau national rotavirus :
 - participation de 11/18 CHU/CHG (extension de la surveillance vers le sud et l'ouest)
 - analyses de 645 prélèvements de selles : poursuite de la diffusion du génotype G9P[8] (47,0%) suite à sa réémergence en 2014-2015 et émergence de G3P[8] « equine-like » (21,7%).
- surveillance des épidémies dans les EHPAD
 - analyses de 236 épidémies : survenue de novembre à mars/avril
 - transmission le plus fréquemment de personne-à-personne (48,9%)

3.1 DESCRIPTION DES RÉSEAUX PARTENAIRES

3.1.1 Réseau de surveillance des cas groupés de gastro-entérites

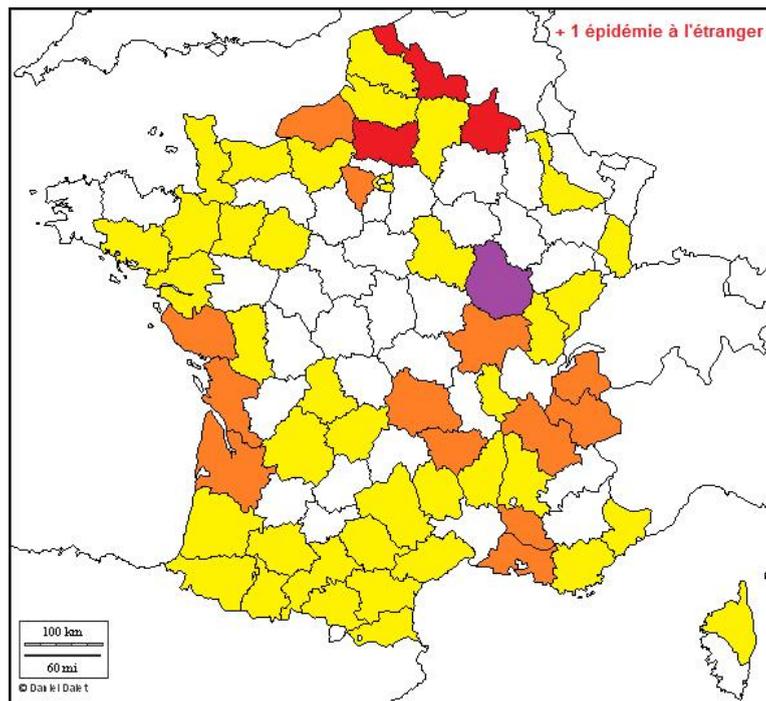
1/ Réseaux de surveillance

- **Santé Publique France (SPF)** et les **CIRE**, les **Délégations territoriales des ARS** et d'autre part les **services hospitaliers**, les **CLIN** ou les **services d'hygiène des établissements de soins**.

Les **Délégations territoriales des ARS** ou les **CIRE** notifient les épidémies et déclenchent l'alerte et l'investigation virologique. Plus rarement, l'alerte nous est donnée par un service hospitalier, le **CLIN** ou le service d'hygiène d'un établissement de soins. Toutes les données nous parvenant sont immédiatement transmises à **SPF** pour la coordination des investigations épidémiologiques et virologiques. **SPF et les CIRE** réalisent les investigations épidémiologiques.

- **Réseau Sentinelles** : nos interlocuteurs en 2018 étaient Thomas GORONFLOT et Lucie FOURNIER.
- **Les autres laboratoires de référence** :
 - **IFREMER** – Centre de Nantes (Dr. Françoise LE GUYADER) : laboratoire de référence pour les virus entériques dans les **produits de la mer**. Ce laboratoire fait partie du même réseau européen que le nôtre (NoroNet). Nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).
 - **ANSES – Unité de virologie des Aliments et de l'eau**, Maisons-Alfort (Dr. Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour **l'eau et les aliments**. Nous collaborons avec ce laboratoire pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).
 - **ANSES – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy**, 40, Rue Lionnois F-54000 NANCY (Dr Benoît GASSILLOUD).
 - **Centre National de Référence Virus des hépatites à transmission entériques (Hépatites A et E)**. AP-HP - Paris Paul Brousse (Pr. Anna- Maria ROQUE-AFONSO) et CHU de Toulouse (Pr. Jacques IZOPET). Nous collaborons étroitement avec ces CNR, notamment pour les épidémies d'origine hydrique ou alimentaire.
- **Centre National de Référence Entérovirus et Paréchovirus**, Hospices Civils de Lyon (Pr. Bruno LINA) et CHU de Clermont-Ferrand (Pr. Cécile HENQUELL). Nous collaborons étroitement avec les CNR : nous assurons la détection dans les selles, en cas de positivité le virus ou le prélèvement est adressé au CNR des entérovirus et paréchovirus pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique.

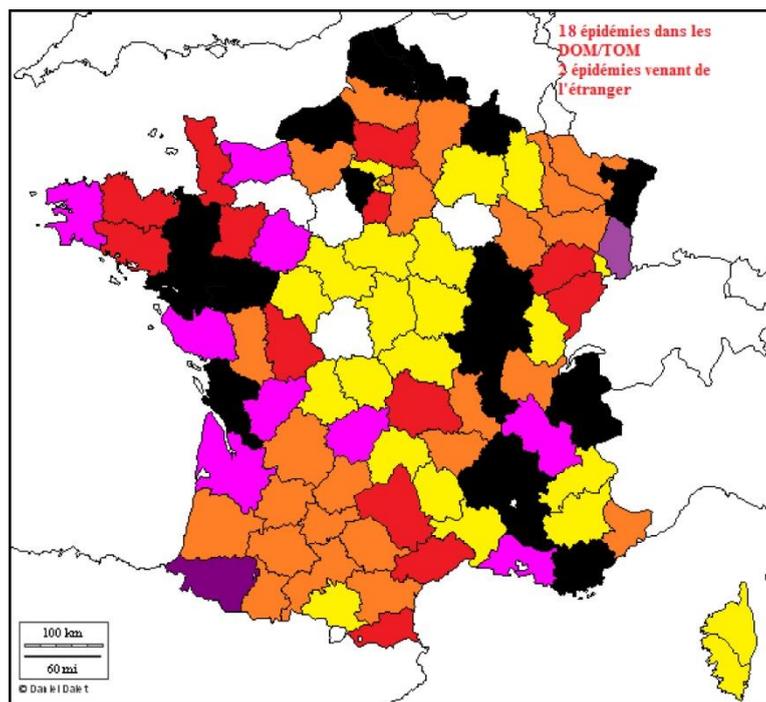
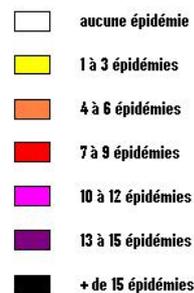
2/ Provenance des échantillons



Répartition géographique des épidémies reçues au CNR Virus des gastro-entérites :

en 2018
184 épidémies

CODE COULEUR :



Répartition géographique des épidémies reçues au CNR des virus entériques :

de 2012 à 2017
1694 épidémies

CODE COULEUR :

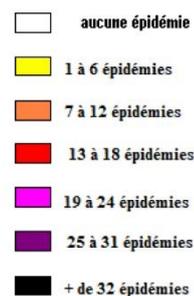


Figure 3 : Répartition géographique des épidémies reçues. (a) bilan de l'activité du CNR en 2018 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2017. La plupart des départements nous ont envoyé des prélèvements au moins une fois depuis 2012.

3.1.2 Réseau de surveillance des gastro-entérites à rotavirus

Une surveillance moléculaire des souches de rotavirus en milieu pédiatrique avait été mise en place en prévision de la prochaine disponibilité de vaccins anti-rotavirus. Depuis 2004 et surtout l'hiver 2006 nous avons développé un réseau de surveillance épidémiologique et moléculaire des rotavirus comprenant 11 CHU de province, 3 établissements de l'Assistance Publique de Paris (hôpitaux de Saint Vincent de Paul-Necker, Robert Debré et Trousseau) et 2 CHR (Charleville-Mézières et Orléans). Depuis 2017, le CHU de Toulouse et le CHR de Cahors ont rejoint le réseau rotavirus. Ce réseau national est connecté à un plus large réseau européen, le réseau **EuroRotaNet** (Figure 4).

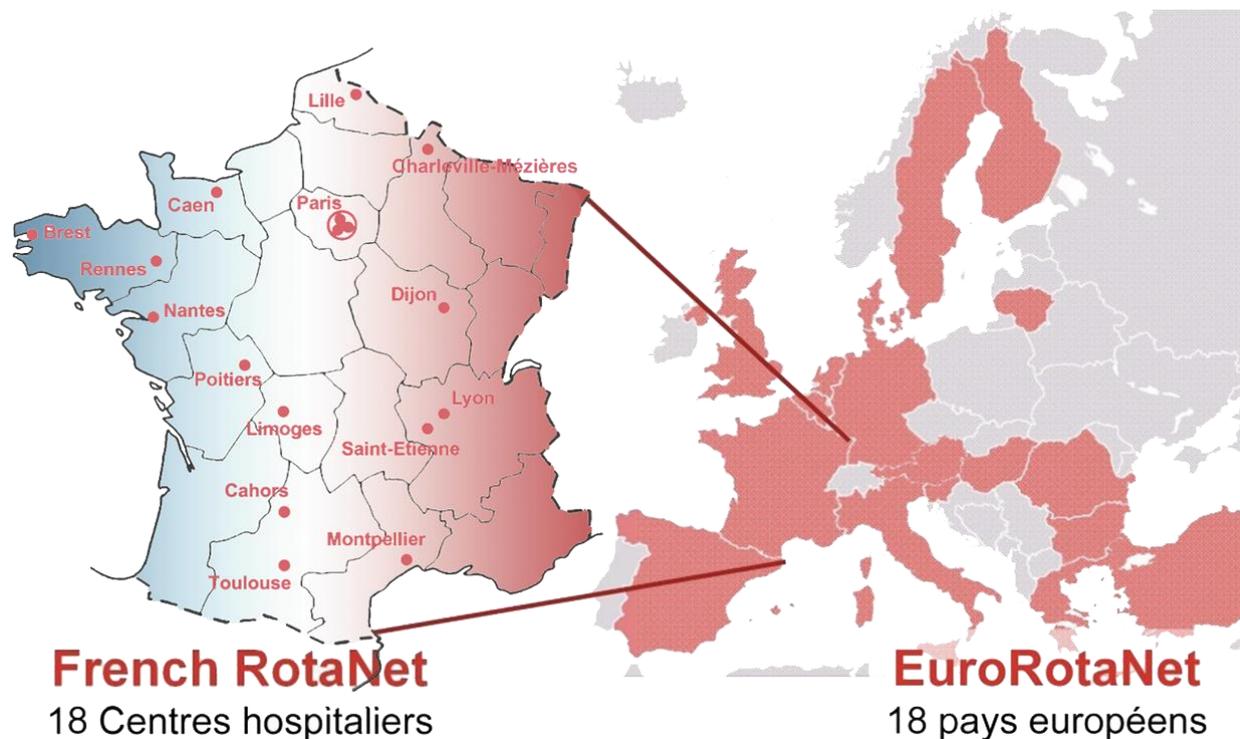


Figure 4 : Répartition des centres participant au réseau national rotavirus en 2018.

Participation des CHU/CHRU de Brest, Caen, Dijon, Lille, Limoges, Lyon, Montpellier, Nantes, Paris (Necker-Enfants Malades, Robert-Debré, Armand-Trousseau), Poitiers, Rennes, Saint-Etienne, Toulouse et des CH de Cahors, Charleville-Mézières, Lille (GHICL).

3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES INFECTIONS

3.2.1 Caractéristiques épidémiologiques des cas groupés

1/ Aspect saisonnier des épidémies

La saisonnalité hivernale est très marquée pour les épidémies survenant en EHPAD et hôpitaux, au contraire de celles survenant dans les centres pour adultes ou lors de réceptions (Figure 5). On retrouve cette même différence si l'on compare les épidémies transmises de personne-à-personne (hivernales) de celle transmises par les aliments ou l'eau (toute l'année).

En 2018, 75,5% des épidémies analysées au CNR sont survenues entre novembre et mars (environ 71% entre 2012 et 2017). Cette forte saisonnalité hivernale concerne les épidémies survenant en établissements de soins (84,2%), mais pas celles survenant en collectivités ou dans les restaurants (52,4%). Cette différence était sensiblement la même en 2018 que pour les années précédentes 2012-2017 (environ 76,0% et 49,0%, respectivement). Cette observation est comparable aux différences de saisonnalité entre les épidémies transmises de personne-à-personne et celles d'origine alimentaire ou hydriques.

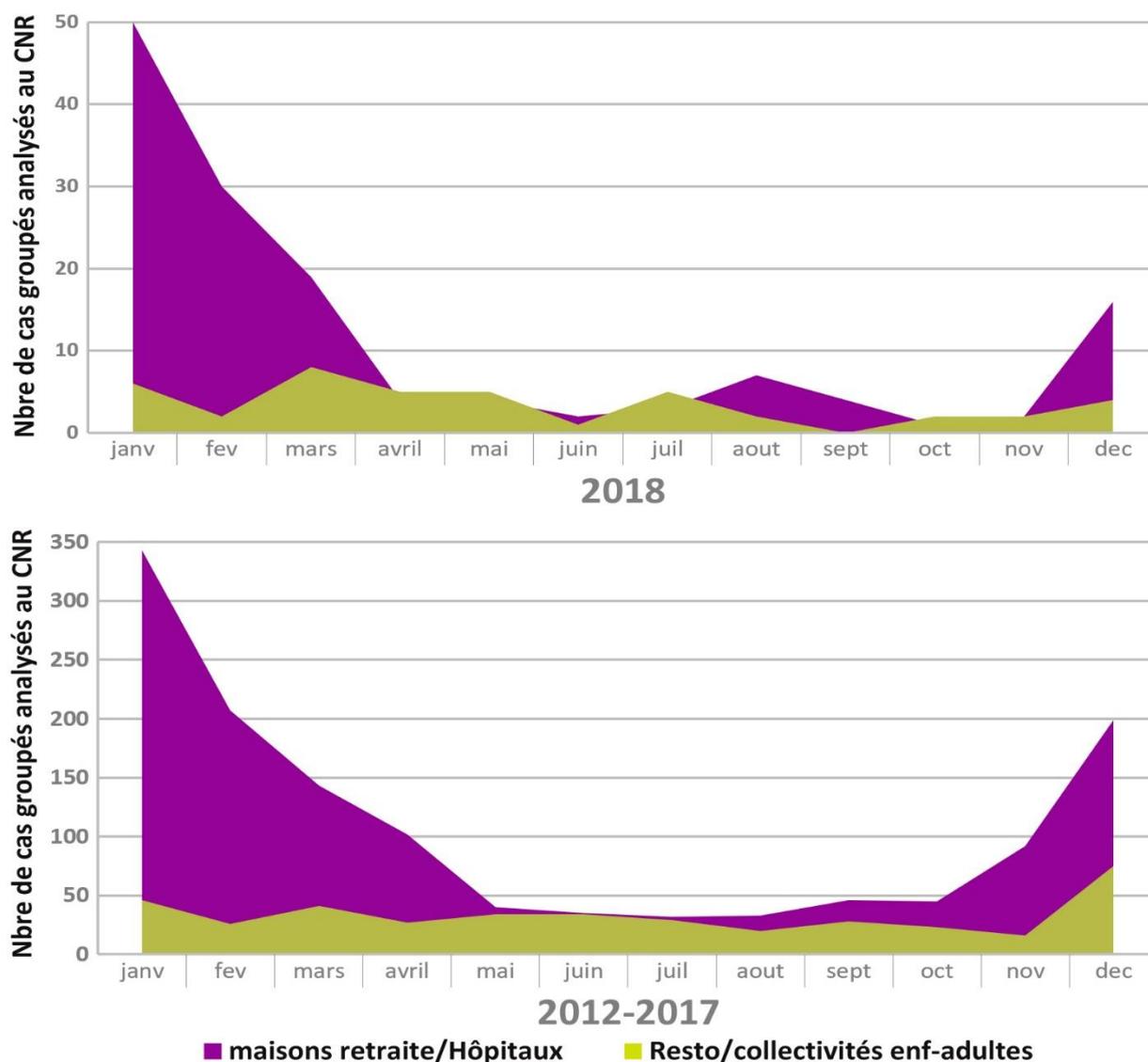


Figure 5 : Répartition temporelle des cas groupés pris en charge par le CNR en fonction de l'origine de l'épidémie. (a) bilan de l'activité du CNR en 2018 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2017.

2/ Sites et modes de transmission

Qu'il s'agisse du mode de transmission ou du site de l'épidémie, la répartition observée en 2018 est globalement similaire à l'ensemble de la période 2012-2017 (Tableau 7).

Tableau 7 : Répartition des épidémies selon le site et le mode de contamination.

sites/transmissions		pers-à-pers	inconnu	aliments	hydrique	Total
2018	EHPAD	83 (45,1%)	34 (18,5%)	16 (8,7%)	2 (1,1%)	135 (73,4%)
	hôpitaux	4 (2,2%)	1 (0,5%)	2 (1,1%)	0 -	7 (3,8%)
	réception	0 -	0 (0,0%)	25 (13,6%)	0 -	25 (13,6%)
	centre enfants	1 (0,5%)	0 -	8 (4,3%)	0 -	9 (4,9%)
	centre adultes	2 (1,1%)	2 (1,1%)	4 (2,2%)	0 -	8 (4,6%)
	Total	90 (48,9%)	37 (20,1%)	55 (29,9%)	2 (1,1%)	184
2012-2017	EHPAD	743 (44,4%)	345 (20,6%)	59 (3,5%)	7 (0,4%)	1154 (69,0%)
	hôpitaux	103 (6,2%)	74 (4,4%)	16 (1,0%)	0 -	193 (11,5%)
	réception	10 (0,6%)	7 (0,4%)	152 (9,1%)	0 -	169 (10,1%)
	centres enfants	38 (2,3%)	16 (1,0%)	41 (2,5%)	6 (0,4%)	101 (6,0%)
	centres adultes	13 (0,8%)	13 (0,8%)	29 (1,7%)	0 -	55 (3,3%)
	Total	907 (54,3%)	455 (27,2%)	297 (17,8%)	13 (0,8%)	1436

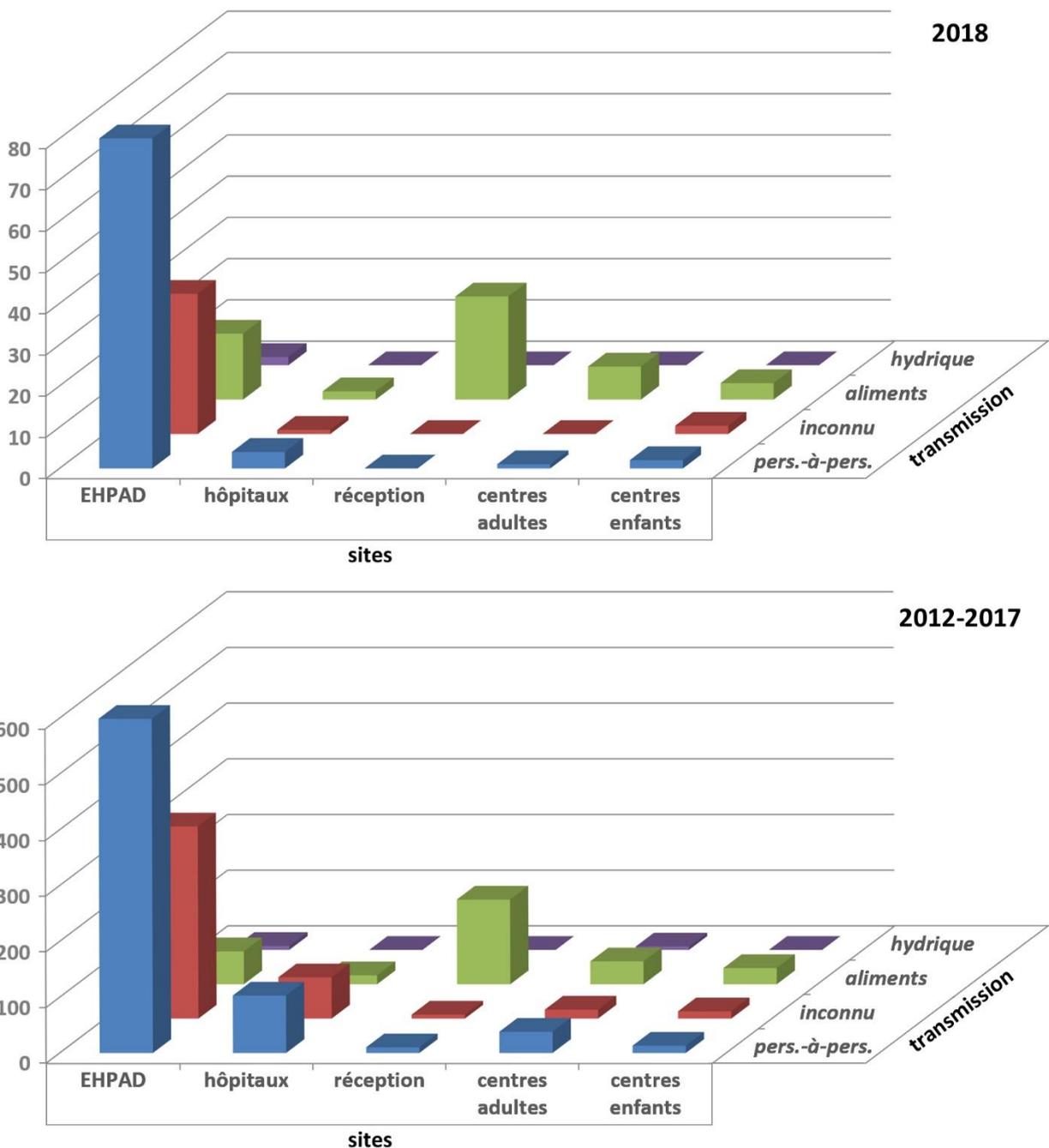


Figure 6 : Relation entre type d'établissement et le mode de transmission.
 (a) bilan de l'activité du CNR en 2018 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2017.

– **Site ou établissement :**

En 2018, la majorité des 184 épidémies est survenue dans des EHPAD : 135 soit 73,4%. Les autres sites concernés ont été essentiellement des réceptions/ banquets (25 ; 13,6%). Globalement, ces résultats sont comparables à ceux constatés au cours de la période 2012-2017 avec, proportionnellement et de manière non significative, une légère baisse du nombre de cas observés dans les hôpitaux (-7,7 points).

– **Mode de transmission :**

En 2018, le mode de transmission de **personne-à-personne, le plus fréquent, est incriminé dans 90 épidémies soit 48,9% des cas.** Cependant, le mode de transmission restait inconnu ou non renseigné pour un cinquième des épidémies (37 ; 20,1%). Une origine alimentaire a été à l'origine de 55 épidémies (29,9%). Les épidémies d'origine hydrique restent marginales (2 ; 1,1%). Globalement, ces résultats sont comparables à ceux constatés au cours de la période 2012-2017 avec, proportionnellement et de manière significative une augmentation du nombre de cas à transmission d'origine alimentaire (+12,1 points).

– Relation site et mode de transmission :

En 2018, comme sur la période 2012-2017, la majorité des épidémies est advenue dans des EHPAD ou des services hospitaliers. Le principal mode de propagation des virus entériques dans ces établissements était une transmission de personne-à-personne (45,1% en 2018 et 44,4% de 2012 à 2017). Cependant, les causes inconnues restent encore fréquentes (18,5% en 2018 et 20,6% de 2012 à 2017). L'origine alimentaire y est toutefois retrouvée dans quelques épidémies (8,7% en 2018 et 3,5% de 2012 à 2017).

Comme attendu, une origine alimentaire est principalement trouvée dans les épidémies survenant lors d'une réception, dans les écoles et dans les centres pour adultes.

3.2.2 Caractéristiques virologiques des épidémies de gastro-entérites à rotavirus en France : bilan de la surveillance de la saison 2017-2018

Dix-huit centres participent à cette étude depuis 2006 et **11 centres ont envoyé des prélèvements durant la saison 2017-2018** : Brest, Dijon, Grenoble, Lille, Montpellier, Paris (Necker et Trousseau), Poitiers, Rennes, Saint-Etienne et Toulouse.

Au total, nous avons reçu et analysé **645 prélèvements durant la saison 2017-2018 (soit 10.317 souches de rotavirus « génotypées » entre 2006 et 2018)**

1/ Distribution saisonnière des épidémies à rotavirus

Les infections à rotavirus sont saisonnières et surviennent durant les mois d'hiver. Cependant les résultats de notre étude européenne (réseau EuroRotaNet) montrent un gradient Sud-Nord et Ouest-Est avec un pic d'infections plus précoce en Espagne (décembre à février) et plus tardif (avril-mai) dans les pays du nord et de l'est de l'Europe. **En France, le pic des infections de la saison 2017-2018 est apparu en mars et les trois mois durant lesquels il y avait le plus de prélèvements positifs étaient février-mars-avril.** Cette saison a été présentée un pic moyen similaire à celui observé sur les résultats compilés des saisons 2006 à 2018 (**Figure 7**).

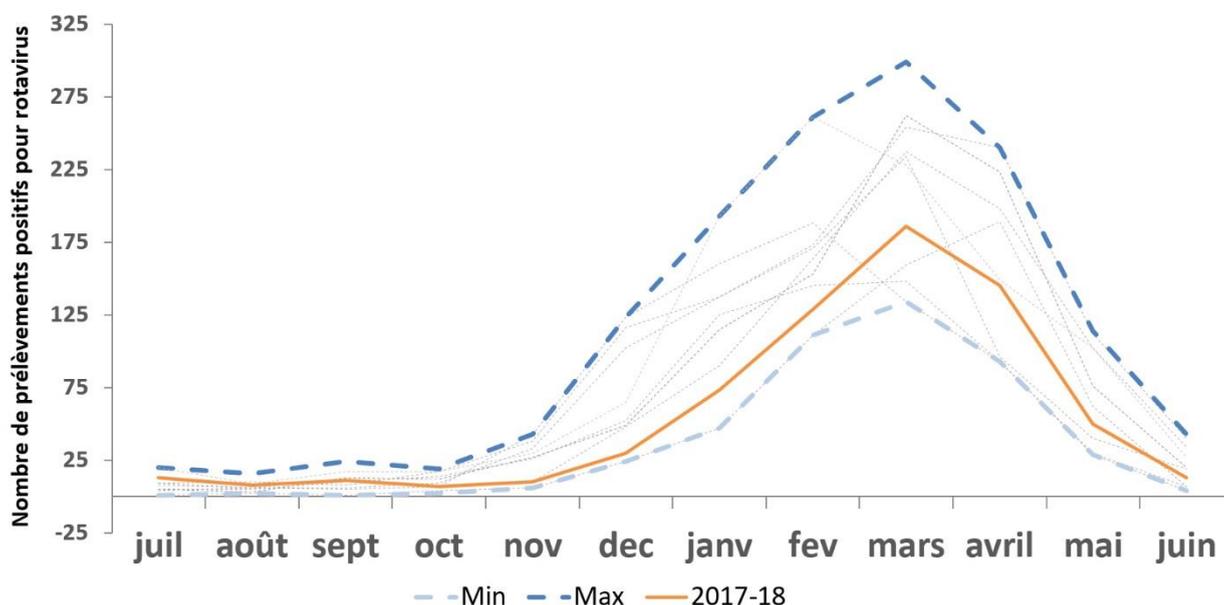


Figure 7 : Distribution temporelle des infections à rotavirus pour la saison 2017-18 comparée aux maximums et minimums des saisons de 2006 à 2018.

Globalement, il y a de différence d'une année à l'autre puisque le pic des infections a lieu en mars pour 9 saisons sur 12 de 2006 à 2018, les autres ayant eu lieu en février pour les saisons 2007-08 et 2016-17, et en avril pour 2006-07. Les mois les plus importants sont février-mars-avril pour 8 saisons (2006-07, 2009-10, de 2011 à 2016 et 2017-18) et janvier à mars pour les 4 autres (2007-08, 2008-09, 2010-11 et 2016-17).

2/ Analyse de la répartition des combinaisons génotypiques G/P

Saison 2017-2018 (Figure 8)

En tout 645 prélèvements ont été caractérisés au cours de la saison 2017-18. En comparaison avec l'étude globale, les résultats importants de cette dernière saison sont :

- le génotype G9P[8] continue sa diffusion après sa réémergence au cours de la saison 2014-15 (32,1) et surtout au cours des deux précédentes saisons (2015-16 et 2016-17) avec de fortes fréquences de détection (64,1% et 74,1%, respectivement). Ce génotype représentait au cours de la dernière saison 47,0% des souches circulantes de rotavirus. Ces G9P[8] appartiennent au lignage III pour le génotype G9 et au lignage P[8]-3 pour le génotype P[8]. Ces souches diffèrent peu de celles détectées au cours de la dernière décennie et notamment d'avec celles de la saison 2004-2005 qui a vu ce génotype émerger en France.
- le génotype G3P[8] marque un grand retour dans l'épidémiologie des rotavirus en France avec 21,7% de fréquence de détection contre 2,7% au cours de la précédente saison. Une telle fréquence n'avait pas été constatée depuis les saisons 2011-2012 et 2003-2004. Nos travaux préliminaires sur ces nouvelles souches montrent que cette réémergence serait due à une souche dite « *equine-like* » possédant ainsi des antigènes modifiés. Ces souches seraient des recombinants humain-équin alliant un segment VP7 de type G3 d'origine équine à une constellation de gènes d'origine humaine dont un segment VP4 de type P[8] (soit un profil DS1-like : G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1).
- Les autres génotypes importants sont :
 - G1P[8] (16,2%) qui demeure néanmoins le premier génotype toutes saisons confondues
 - G2P[4] (5,9%) qui conserve son niveau moyen en terme de fréquence (6,1% sur la période 2006-2018).
 - G12P[8] (3,5%) qui était en nette diminution depuis son émergence ces 5 dernières saisons.
 - G4P[8] (2,5%) qui est au niveau de sa fréquence moyenne (2,3% sur la période 2006-2018).

La persistance d'un certain nombre de souches non typables (1,4%) est liée à l'amélioration de nos méthodes de détection et ne reflète pas l'émergence de souches atypiques. La détection par PCR en temps réel, plus sensible, entraîne en effet une augmentation des prélèvements diagnostiqués positifs sans que l'on puisse caractériser plus en détail le rotavirus détecté par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire car les charges virales sont généralement très faibles.

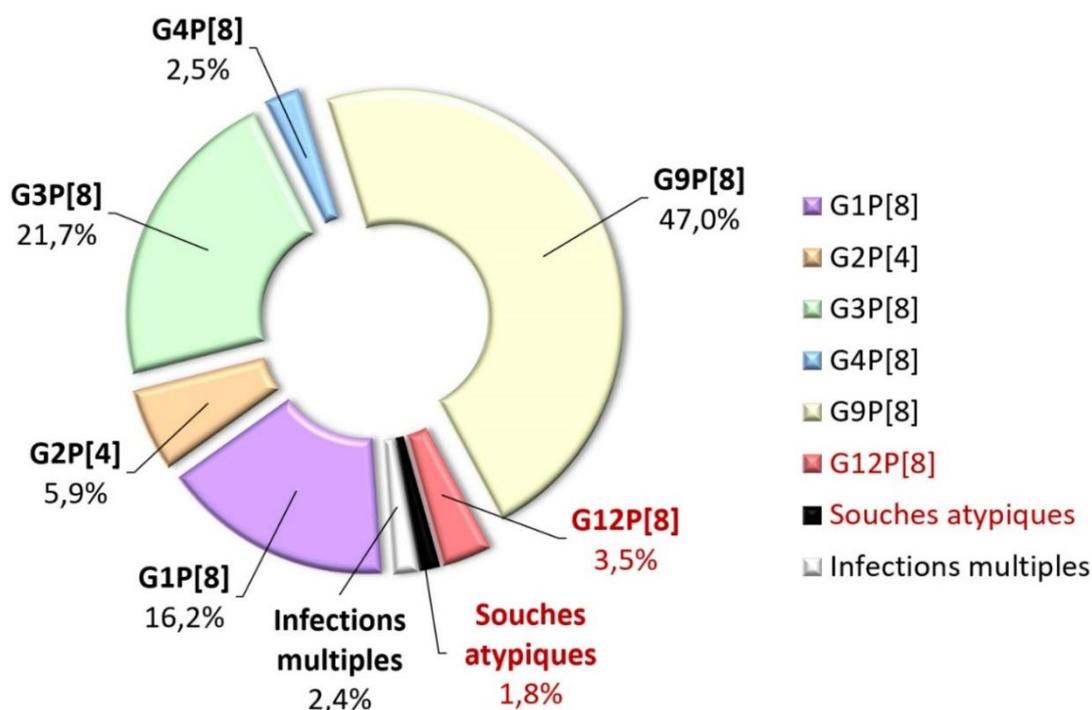


Figure 8 : Distribution des combinaisons de génotypiques G et P des rotavirus détectés **en France durant la saison 2017-2018** (645 prélèvements).

Bilan 2006-2018 (Figure 9)

Le recueil des prélèvements sur l'ensemble des saisons 2006-2007 à 2017-2018 est de **10.651 souches de rotavirus** totalement ou partiellement caractérisées (figure 6a et tableau 4). Les six principales combinaisons de génotypes G/P (>1%) ont été durant ces douze années : **G1P[8] (49,6%)** suivie de **G9P[8] (28,0%)**, cumulant à elles seules **77,6% des souches détectées**, puis **G3P[8] (7,8%)** et **G2P[4] (6,1%)**.

Les autres combinaisons d'importance significative étaient **G4P[8] (2,3%)** et **G12P[8] (1,5%)**. Ainsi, les six combinaisons génotypiques désormais classiques (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] et G12P[8]) représentaient 95,3% des souches caractérisées. Les **génotypes ou combinaisons atypiques** (incluant notamment quelques associations de génotypes G et P classiques) représentent **1,6 %** et les infections mixtes 1,7%.

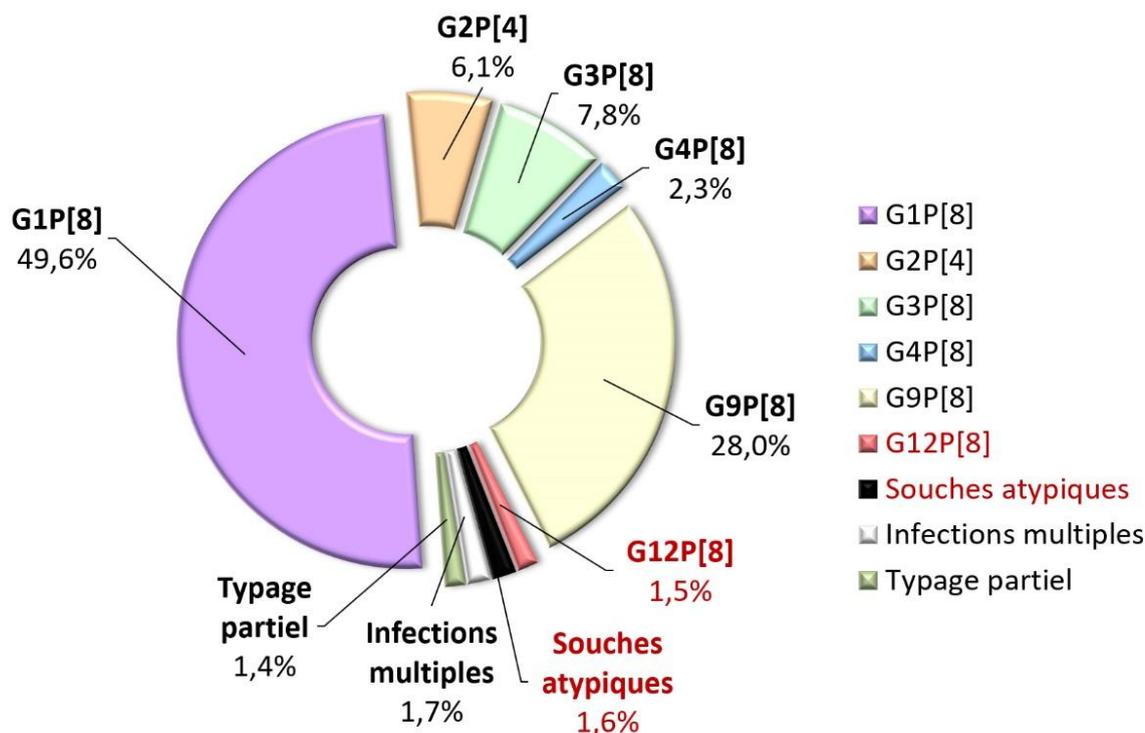


Figure 9 : Distribution des combinaisons de génotypiques G et P des rotavirus détectés en France durant l'ensemble de la surveillance 2006-2018 (10.451 échantillons).

3/ Analyse de la répartition des génotypes G ou P

L'analyse séparée des **génotypes G** (Tableau 8, Figures 10 et 11) montre une répartition des souches semblable à celle observée pour les combinaisons G/P. Les génotypes G inhabituels détectés en France en 2017-2018 ont été **G8** (2 souches, 0,3%). Aucun génotype G5, G6 ou G10 (souches d'origine bovine) n'a été caractérisé durant la saison 2017-2018.

Les faits marquants de cette saison 2017-2018 est

- la **réémergence à une fréquence élevée des rotavirus de génotype G3** avec 22,3% de détection (141 souches)
- la **persistance à une fréquence très élevée des rotavirus de génotype G9** avec 46,7% de détection (295 souches),

Le **génotype G12** (27 souches (4,3%)) semble retrouver un taux de circulation proche de celui constaté lors de son émergence au cours de la saison 2011-2012 après une saison 2016-2017 très en retrait (0,8%). Cette émergence du génotype G12 (associé au génotype P[8]) a été observée dans toute l'Europe mais avec des différences selon les pays. L'Espagne est le pays où cette émergence a été la plus marquée avec une fréquence >60% dans le Pays Basque.

Tableau 8 : Distribution et prévalence par année des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2018 et durant la saison 2017-2018.

	Nombre de souches de rotavirus génotypées		
	2006-2017 <i>n</i> =9907	2017-2018 <i>n</i> =632	2006-2018 <i>n</i> =10539
Génotypes G ^a			
G1	5084 (51,3)	103 (16,3)	5187 (49,2)
G2	637 (6,4)	37 (5,9)	674 (6,4)
G3	762 (7,7)	141 (22,3)	903 (8,6)
G4	262 (2,6)	16 (2,5)	278 (2,6)
G6	22 (0,2)		22 (0,2)
G8	14 (0,1)	2 (0,3)	16 (0,2)
G9	2830 (28,6)	295 (46,7)	3125 (29,7)
G10	2 (<0,1)		2 (<0,1)
G12	142 (1,4)	27 (4,3)	169 (1,6)
Infections mixtes (types G)			
G1 + G2	20 (0,2)		20 (0,2)
G1 + G3	22 (0,2)		22 (0,2)
G1 + G4	9 (0,1)	1 (0,2)	10 (0,1)
G1 + G9	63 (0,6)	6 (0,9)	69 (0,7)
G2 + G3	1 (<0,1)		1 (<0,1)
G2 + G4	1 (<0,1)		1 (<0,1)
G2 + G9	5 (0,1)		5 (<0,1)
G3 + G4	2 (<0,1)		2 (<0,1)
G3 + G9	21 (0,2)	3 (0,5)	24 (0,2)
G4 + G9	8 (0,1)	1 (0,2)	9 (0,1)
Génotypes P ^a			
P[3]	5 (0,1)		5 (<0,1)
P[4]	606 (6,3)	39 (6,2)	645 (6,3)
P[5]	1 (<0,1)		1 (<0,1)
P[6]	63 (0,7)	7 (1,1)	70 (0,7)
P[8]	8925 (92,3)	585 (92,7)	9510 (92,3)
P[9]	27 (0,3)		27 (0,3)
P[14]	9 (0,1)		9 (0,1)
Infections mixtes (types P)			
P[4] + P[8]	37 (0,4)		37 (0,4)

^a Inklus les infections multiples

Les **génotypes P** (Tableau 8 et Figures 10 et 11) sont peu diversifiés et très largement dominés par le génotype **P[8]** (globalement 92,7% entre 2006-2018 et 92,7% en 2017-2018), alors que le génotype **P[4]** représente globalement 6,7 % entre 2006-2018 et 6,2% cette dernière saison.

Ce résultat concernant le génotype P[4] est à considérer dans le suivi des effets de la vaccination (en particulier avec le vaccin Rotarix[®] constitué d'une souche G1P[8] atténuée). Entre 2006 et 2018, les génotypes atypiques en France étaient représentés par **P[3], P[5], P[6], P[9] et P[14]** ce qui représentait 112 (1,1%) souches. Durant la saison 2017-2018 nous avons détecté uniquement le **génotype P[6] (7 souches) soit 1,1% des souches.**

La constance de la prévalence du génotype P[8] entre 2006 et 2018 est rassurante et doit être soulignée s'agissant de l'efficacité de la vaccination puisque les deux vaccins commercialisés possèdent cette valence antigénique dans leur composition.

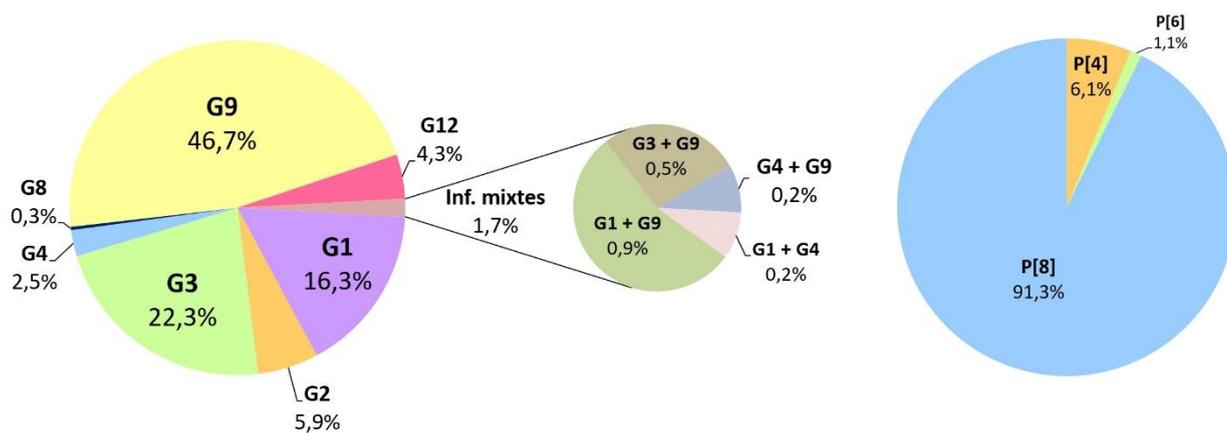


Figure 10 Distribution des génotypes G et P détectés en France pour la saison 2017-2018

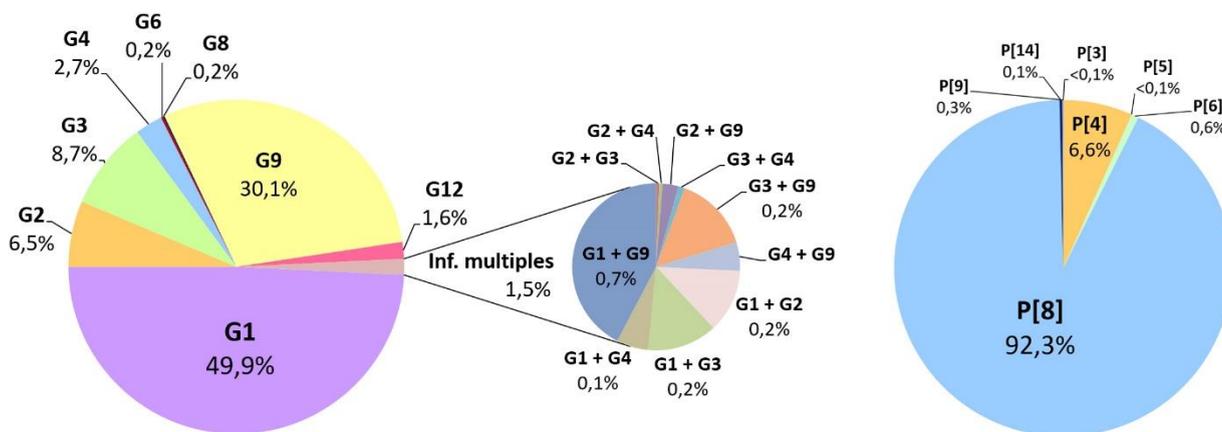


Figure 11. Distribution des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2018

4/ Variations temporo-spatiales des combinaisons de génotypes G/P

a/ Variations des génotypes G/P entre 2006-2018 (Figure 12)

Évolution des génotypes G/P « classiques »

L'évolution des génotypes G/P durant cette période de surveillance est marquée par :

- la **prédominance du génotype G9P[8]** : après sa brutale émergence en 2004-2005 (65,0%), sa fréquence diminuait régulièrement de 25,1% à 6,3% en 2012-2013. Sa réapparition à un taux élevé au cours des saisons 2013-2014 et 2014-15 (21,1% puis 30,9%) puis sa réémergence au cours des saisons 2015-16 et 2016-17 (66,0% et 74,1%, respectivement) et son maintien à une fréquence élevée (47,0%) soulève des questions quant à sa circulation et son évolution. Il sera important de comparer nos résultats à ceux obtenus en Europe, l'émergence brutale observée en 2004-2005 avait été un phénomène observé sur tout le continent. La réémergence des G3P[8] pourrait changer la donne lors de la prochaine saison 2018-2019.
- Le **génotype G1P[8]** stable depuis plus de 10 ans a vu sa fréquence chuter avec la réémergence des G9P[8] (entre 53,0% et 73,1% entre 2005 et 2015 ; 16,8% en 2015-2016, 9,0% en 2016-2017 et 16,2% en 2017-2018). Ce phénomène a déjà été observé en 2004-2005 mais il n'avait duré qu'une seule saison. Les résultats des génotypages de la saison prochaine 2018-2019 seront à regarder de près avec soit une inversion des fréquences G1P[8] et G9P[8] comme lors de la saison 2005-2006, soit une persistance des G9P[8] à un haut niveau de prévalence, soit une chute de fréquence au profit des G3P[8] en cours de réémergence.

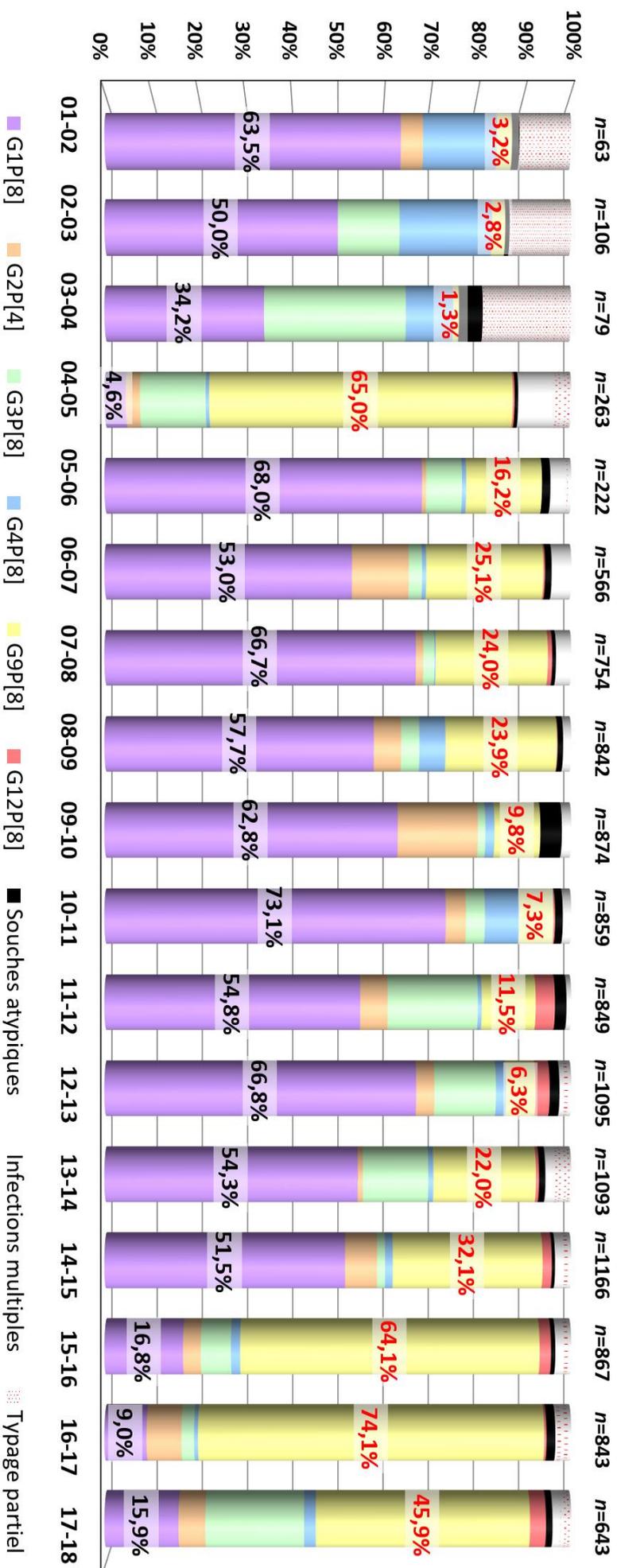


Figure 12. Évolution des combinaisons de génotypes G/P de rotavirus en France entre 2001 et 2018
 (Noter que la période 2001 à 2006 est une étude limitée.)

- le **génotype G3P[8]** : jusqu'ici sa fréquence restait relativement faible avec quelques pics de détection supérieur à 20% au cours des saisons 2003-2004 et 2011-2012. La saison 2017-2018 semble marquée une réémergence de ce génotype qui sera à confirmer au cours de la prochaine saison.
- le **génotype G12P[8]** : son **émergence récente** (4,2% en 2011-12 et 3,0% en 2012-2013) laissait penser qu'il deviendrait l'un des six génotypes importants en France. Après quelques saisons creuses (0,6% à 2,6% de détection), ce génotype a été détecté à une fréquence de 3,5% (27 souches) en 2016-2017 confirmant la persistance de la circulation des rotavirus G12 en France. La saison 2017-2018 a montré une circulation des G12P[8] similaire à celle des saisons de leur émergence. Aucune donnée ne permet actuellement de savoir s'il y aura une variation de la fréquence ou une stabilisation de la circulation des G12P[8] à ce niveau de fréquence.
- les autres génotypes **G2P[4]** et **G4P[8]** évoluent de façon cyclique selon les saisons : G2P[4] (entre 1,6% et 17,2%) et G4P[8] (entre 0,3% et 7,3%).

Évolution des génotypes ou combinaisons atypiques

- en dehors du génotype G12P[8], décrit précédemment dans les souches dites « classiques », les **génotypes atypiques** sont des combinaisons incluant l'un des génotypes **G6, G8, G10, P[3], P[5], P[6], P[9]** et **P[14]**. Sur l'ensemble de l'étude, elles représentent **112 souches (1,1%) dont 7 (1,1%) en 2017-2018**. Parmi ces génotypes inhabituels, le génotype P[6] est le plus important (70 souches au total dont 7 en 2016-2017). Certaines de ces souches peuvent être d'origine animale, notamment bovine et caprine. Il s'agissait pour la dernière saison de souches G12P[6] (5), G3P[6] (1) et G9P[6] (1).
- les **combinaisons atypiques**, par exemple G2 associé à P[8] ou G1, G3, G4, G9 ou G12 associé à P[4] représentent 1,0% des souches détectées de 2006 à 2018 et 0,3% sur la dernière saison (2 souches G3P[4] durant la saison 2017-2018).

b/ Variabilité géographique des génotypes de rotavirus (Figure 13)

Nous avons montré dans les précédents rapports qu'il existait **une variabilité géographique, selon les centres**. Nous retrouvons lors de cette saison 2017-2018 cette même variabilité géographique avec une forte fréquence de détection des G9P[8] qui varie de 30,4% (Brest) à 70,6% (Poitiers) et de G3P[8] avec des détections allant de 8,9% (Toulouse) à 35,9% (Brest). Néanmoins, cette variabilité concerne tous les génotypes. On peut noter, en particulier, une fréquence très marquée des G1P[8] à Saint-Etienne (32,8%) alors qu'ils ne circulent pas dans 2 centres (Poitiers et Toulouse) et très faiblement à Rennes (2,9%). Cette même disparité est observée pour les G12P[8] (non détection dans 3 centres) et les G4P[8] (4 centres). Il existe donc des circulations régionales préférentielles de certains génotypes.

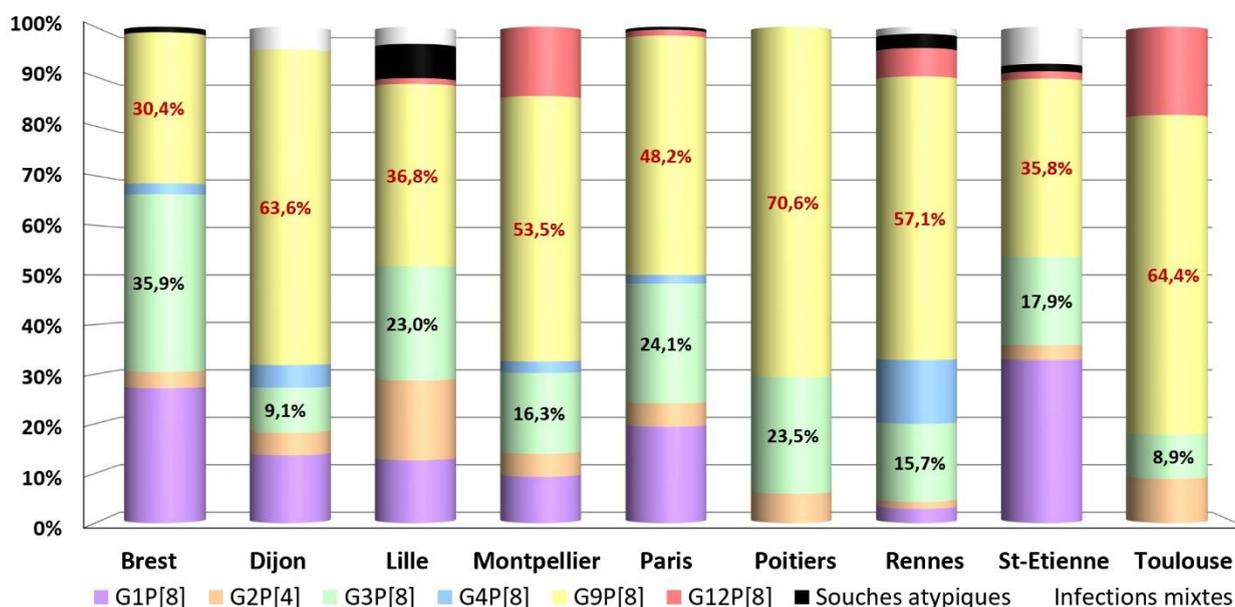


Figure 13 : Distribution des génotypes en France selon les centres durant la saison 2017-18

5/ Conclusions

La surveillance épidémiologique des souches de rotavirus a été effectuée en France en dehors de toute pression vaccinale. En effet, la couverture vaccinale ne dépasse pas, en 2018, 5% tous vaccins confondus (c.-à-d. pour les vaccins Rotarix® (monovalent, GSK) et Rotateq® (pentavalent, Merck)).

La distribution saisonnière des épidémies de gastro-entérites à rotavirus s'étale en France principalement entre décembre et avril avec de faibles variations selon les saisons. En revanche, il semble exister une différence entre les centres parisiens, où les épidémies commenceraient plus tôt, dès décembre, suivi par la province de février à avril.

Les résultats significatifs concernant la répartition des génotypes des rotavirus sont :

- la **large prédominance du génotype G1** à l'exception des saisons 2004-2005, et plus récemment, de 2015 à 2018.
- **l'émergence de nouveaux génotypes** :
 - le **génotype G9** est devenu, depuis la saison 2004-2005, un génotype « classique » avec G1, G2, G3 et G4. Il a réémergé depuis la saison 2015-2016 et circule encore avec une forte prévalence (47,0%).
 - **l'émergence dès la saison 2011-2012 du génotype G12**, globalement moins brutale que celle du génotype G9, représentant en France environ 4% des souches avec des différences significatives selon les centres. Ce génotype semble circuler de manière régionale en France.
- la **variation cyclique des génotypes G2, G3 et G4**. Le génotype G2P[4] doit cependant être plus particulièrement suivi dans les pays où la couverture vaccinale est élevée, principalement avec le vaccin monovalent. Le génotype G3P[8] semble réémerger sous l'impulsion d'une nouvelle souche G3 « *equine-like* » et sera à surveiller au cours de la saison suivante.
- la stabilité de la fréquence des souches inhabituelles (notamment le génotype P[6]) et l'existence, parmi celles-ci, de **souches d'origine animale** infectant les enfants.

Outre cette variabilité saisonnière des génotypes, il existe une **grande variabilité géographique**. Variabilité selon les centres en France et quelle que soit la saison. Cette variabilité est également retrouvée au niveau des pays européens.

3.3 INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX

3.3.1 Réseaux internationaux « NoroNet » et « EuroRotaNet »

Le **réseau européen NoroNet** regroupe les laboratoires des réseaux européens constitués à partir de financements de la Communauté Européenne. Ce réseau mondial regroupe plusieurs laboratoires européens, d'Amérique du Nord et du Sud, d'Asie et d'Océanie. Il a pour mission la surveillance et la caractérisation des virus des gastro-entérites, essentiellement les norovirus. Ils nous offrent l'accès et le partage d'une base de données ; la possibilité d'une comparaison des souches de norovirus et d'une surveillance prospective des nouveaux variants. Ils sont des outils majeurs de la caractérisation des souches de norovirus détectées. Le CNRVge participe à ce réseau depuis sa création. Nos partenaires français sont SPF et l'IFREMER.

- *Composition du réseau NoroNet : Europe (Pays-Bas, Grande-Bretagne, Allemagne, Hongrie, Suède et France) ; Amérique (USA, Canada, Nicaragua Venezuela, Chili) ; Asie Israël, Japon, Chine, Inde, Malaisie) ; Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande).*

Le **réseau « EuroRotanet »** a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus responsables des gastro-entérites chez les enfants. Le CNR des virus des gastro-entérites de Dijon a participé à la création de ce réseau européen. Ce réseau nous permet une actualisation de nos techniques de caractérisation des génotypes de rotavirus et un partage des données virologiques et épidémiologiques. Outre notre participation aux recherches épidémiologiques dans un cadre européen, l'intégration de notre laboratoire dans ces réseaux nous donne l'accès aux **contrôles de qualité externes (rotavirus)**.

- *Composition des réseaux européens : Ces réseaux regroupent 14 laboratoires de 12 pays européens : **Pays Bas**: RIVM, Bilthoven (Dr M. Koopmans) ; **Finlande**: Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH) ; **Danemark**: Virus Diagnostics Laboratory, Copenhague (Dr Böttiger) ; **Suède**: Karolinska Institute, Slona (Dr Svensson L) ; **Grande Bretagne**: Central Public Health Laboratory, London (Dr Brown D) ; **Allemagne**: Robert*

Koch- Institut, Berlin (Dr Schreier E) ; Espagne: Institut de Salud Carlos III, Madrid (Dr Sanchez A), Universitat de Barcelona (Dr Bosch A) et Universitat de Valencia (Dr Buesa J) ; Italie: Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), Slovénie : Medical Faculty of Ljubljana (Dr. Poljsak-Prijatelj M); Hongrie : County Institute of State Public Health Service (Dr Szucs G) ; France : IFREMER (Dr F. Le Guyader S), CNR hépatites A (APHP Paul Brousse, Pr AM. Roque-Afonso) et E (CHU Toulouse, Pr J. Izopet), CNR virus des gastro-entérites (CHU Dijon, Dr A. de Rougemont).

3.3.2 Relations avec les pays Africains

Ces collaborations ont pour objectifs 1) la formation de virologistes aux techniques de détection-caractérisation des virus entériques et 2) une surveillance épidémiologique des virus entériques dans la population et dans l'environnement des pays du pourtour méditerranéen et d'Afrique subsaharienne afin d'anticiper un risque de diffusion en Europe.

1/ Réseau avec le Maghreb

Ces collaborations ont été soutenues par les **programmes CMCU et Hubert Curien** du Ministère des Affaires Étrangères et du Ministère de la Recherche.

Durant l'année 2018 ce réseau a été principalement actif avec la **Tunisie**. Nous avons accueilli Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (chercheur universitaire invité de l'Université de Monastir) dont les travaux portent sur les norovirus et les virus Aichi.

2/ Programme d'Appui à la Recherche en Réseau en Afrique (PARRAF)

Dès 2010 nous avons commencé une collaboration avec le Niger (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire et l'Université, Niamey). Nous avons étendu cette collaboration au Burkina Faso à partir de 2011 et jusqu'à présent dans le cadre d'un programme « PARRAF ». Au cours de l'année 2018, nous n'avons pas eu l'opportunité d'accueillir un collègue de ce réseau.

3.4 ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE

3.4.1 Suivi des établissements long séjour du CHU de Dijon

Ce travail prospectif de surveillance a été commencé fin 2016. Il s'agit d'étudier le microbiote intestinal chez les patients présentant une diarrhée virale à norovirus (collaboration avec l'Institut les Prs. Philippe LANGELLA et Harry SOKOL du laboratoire MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas).

3.4.2 Caractérisation de nouveaux virus dans les selles de patients

En collaboration avec le laboratoire d'Eric DELWART (Université de Californie, San Francisco, USA) nous recherchons par une approche métagénomique la présence de virus inhabituels ou nouveaux dans les selles de patients diarrhéiques préalablement sélectionnés. En 2015/2016 cette recherche nous a permis de caractériser de nouveaux virus pour lesquels le nom de *Smacoviridae* a été proposé pour cette nouvelle famille de virus.

4. ALERTE

4.1 CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE (SPF)

Un point hebdomadaire avec Santé Publique France est effectué le mardi de novembre à avril. Le réseau Sentinelles est associé à cette réunion téléphonique. Nos contacts à SPF sont Madame Nathalie JOURDAN-DA SILVA et Madame Nelly FOURNET. Nos interlocuteurs au réseau Sentinelles ont été tout d'abord Monsieur Thomas GORONFLOT, remplacé ensuite par Mme Lucie FOURNIER.

4.2 PROCÉDURES D'ALERTE DE SPF ET DES AUTRES PARTENAIRES

4.2.1 Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...)

- Informer le demandeur de l'existence de formulaires à remplir disponibles sur le site internet du CNR
- Déterminer l'identifiant de l'épidémie (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :

<p>code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année (Exemple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)</p>

- Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** (<https://voozanoo.invs.sante.fr>).

4.2.2 Arrivée de prélèvements sans annonce préalable

- Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyés au prescripteur, par fax ou par mail, les formulaires pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

Important : Penser à noter la date de réception des prélèvements sur les papiers joints (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)

4.3 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

4.3.1 Transmission des données à SPF Voozanoo

Voozanoo est une base de données partagée entre SPF et le CNR, qui permet un échange en temps réel des informations épidémiologiques et moléculaires sur les épidémies de gastro+entérites annoncées et/ou traitées (voir paragraphe 4.4. et annexe 3).

- Enregistrement d'une épidémie dans la base Voozanoo : annonce d'une épidémie au CNR directement par un laboratoire, une ARS. Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à SPF, créer une nouvelle fiche pour entrer les premières informations.
- Rendu des résultats à SPF : les résultats préliminaires et définitifs sont entrés dans la base Voozanoo de SPF. Parallèlement, les résultats définitifs sont entrés dans le système informatique des laboratoires (SIL) du CHU de Dijon (Corlabs) pour archivage ; ce système informatique est protégé par un accès sécurisé.

4.3.2 Anonymisation des prélèvements

- Enregistrement des prélèvements reçus au CNR : repérer sur le serveur sécurisé le tableau de *synthèse* (S:\CNR Virus Enteriques\Tableaux de synthèse\Synthèse échantillons) le ou les numéros et identifier chacun des échantillons face au numéro en fin de liste (commencer par E...) puis les enregistrer sur le serveur du CHU (S:\CNR Virus Entériques\Tableaux de synthèse\Synthèse échantillons).
- Classement des dossiers : annexer les documents joints aux prélèvements dans une chemise identifiée par :
 - le nom de la ville qui a inspiré le numéro d'identifiant,
 - l'identifiant de l'épidémie (code département / 2 premières lettres de la ville / mois / année)
 - le numéro du carton suivi du numéro de la chemise (Exemple : 15.03 correspond au carton n°15, la chemise n°3 dans ce carton),
 - les **numéros des échantillons** correspondants (E... à E...).

5. ACTIVITÉS DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ

5.1.1 Site internet « www.cnr-ve.org »

Le site nous permet une présentation du CNR et de ses missions. Il détaille les différentes procédures : conditions de prélèvement des selles, de leur conservation et de leur acheminement au CNR, les virus recherchés au CNR. Il est continuellement mis à jour.

Sur le site se trouvent également toutes les communications et publications du CNR et met à disposition les rapports d'activité du CNR.

Lien web : <http://www.cnr-ve.org>

5.1.2 Activité de formation

L'activité de formation se fait essentiellement par l'accueil et l'encadrement de stagiaires. Une formation par séminaire et publications didactiques est également proposée.

Stagiaires accueillis en 2018 :

- Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (Université Monastir, Tunisie)
- M. Georges TARRIS (interne de médecine en anatomo-pathologie actuellement en préparation de son doctorat de médecine et doctorat d'université)
- M. Bastien CAUQUIL (interne de pharmacie en biologie)
- M. Jean-Baptiste COTS (étudiant en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Marie DESCOINS (étudiante en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- M. Arthur GOYARD (étudiant en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- M. Paul-Louis GRALL (étudiant en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Camille LAMARCHE (IUT de Dijon)

5.1.3 Activité de conseil aux professionnels de santé

Comme par le passé, le CNR virus des gastro-entérites apporte son aide ou ses conseils aux établissements publics, de soins ou d'hébergement (publics ou privés), aux administrations qui lui en font la demande.

5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES

Le CNR participe régulièrement au Groupe de Travail « Sécurité Virale » de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) et à l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail).

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR

6.1 ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU CNR EN COURS POUR 2018

6.1.1 Études en cours non publiées

1/ Évaluation de quatre troupes commerciales d'immunochromatographie (ICG) triplex pour la détection combinée des rotavirus, adénovirus et norovirus dans les selles

Objectifs : évaluer et comparer les performances de ces troupes aux techniques de RT-qPCR employées en routine au CNRVge à l'aide de 194 selles positives génotypées ou négatives issues des collections du CNRVge. Les quatre fabricants de ces troupes (bioMérieux, Biosynex, CerTest et R-Biopharm) ont fourni gracieusement et sans contrepartie les kits nécessaires à l'étude.

Troupes testées : bioMérieux bioNexia[®] Noro/Rota-Adeno (réf. 415089), Biosynex Immunoquick[®] NoRotAdeno (réf. 1150013), CerTest Rota+Adeno+Noro Combo Card (réf. RA872001V) et R-Biopharm Rida[®] Quick Rota/Adeno/Noro Combi (réf. N1903).

État d'avancement : l'évaluation est terminée. Une publication est en cours d'élaboration et sera publiée dans le courant de l'année 2019. Une communication officielle sera diffusée.

2/ Évaluation de treize troupes commerciales de biologie moléculaire (RT-qPCR) pour la détection isolée ou combinée des rotavirus et norovirus dans les selles

Objectifs : évaluer et comparer les performances de ces troupes et comparé leurs performances aux techniques de RT-qPCR employées en routine au CNRVge à l'aide de 194 selles positives génotypées ou négatives issues des collections du CNRVge (les mêmes que celles utilisées pour l'évaluation des ICG). Tous les fabricants de ces troupes (Altona, CerTest, Diagenode, Eurobio, Fast-Track, PrimerDesign, R-Biopharmbio, Seegene, Immundiagnostik) ont fourni gracieusement et sans contrepartie les kits nécessaires à l'étude. Il s'agit des troupes :

Troupes testées :

- i) **4 troupes rotavirus** : Altona Diagnostics RealStar[®] Rotavirus RT-PCR Kit 1.0 (réf. 561013), CerTest Biotec Viasure[®] Rotavirus Real time PCR detection kit (réf. VS-RTV112L), PrimerDesign Genesig[®] Rotavirus A (réf. Path-RotavirusA), R-Biopharm Ridagene[®] Viral Stool Panel II (réf. PG1325);
- ii) **5 troupes norovirus** : Altona Diagnostics RealStar[®] Norovirus RT-PCR Kit 2.0 (réf. 052013), CerTest Biotec Viasure[®] Norovirus GI + GII Real time PCR detection kit (réf. VS-NOR112L), PrimerDesign Genesig[®] Norovirus Genogroups I and II (ref. Path-Norovirus), R-Biopharm Ridagene[®] Norovirus I et II (réf. PG1415), Eurobio EurobioPlex[®] Norovirus (réf. EBX-025)
- iii) **4 troupes multiplex** : Diagenode G-DiaNota[®] Norovirus I/II Rotavirus (ref. DDGG10-L100), Fast-Track Diagnostics FTlyoViral[®] Gastroenteritis (réf. FTlyo-3s-64-L), Seegene Allplex[®] GI virus (réf. GI9701X), Immundiagnostik AG MutaPLEX[®] GastroSys 1 (réf. KG198696).

État d'avancement : l'évaluation est terminée. Une publication est en cours d'élaboration et sera publiée dans le courant de l'année 2019. Une communication officielle sera diffusée.

3/ Études de la prévalence des infections à cosavirus, salivirus et bufavirus chez les enfants de moins de 5 ans

Objectifs : évaluer la circulation de nouveaux virus retrouvés dans les selles de sujets diarrhéiques et établir leur lien de causalité avec la diarrhée. Il s'agit de 2 nouveaux genres de *Picornaviridae* (Cosavirus et Salivirus) et 1 nouveau genre de *Parvoviridae* (Bufavirus). L'étude porte sur les populations pédiatriques consultant ou hospitalisées aux CHU de Dijon et Saint-Etienne sur une année complète. Les virus sont détectés par (RT)-qPCR dans les selles.

Partenariats : l'étude est effectuée collaboration avec le CHU de Saint-Etienne qui fournit les selles des enfants réceptionnées au laboratoire de virologie.

État d'avancement : En tout, 537 selles d'enfants de moins de 5 ans diarrhéiques ou non ont été collectés pendant 1 an aux CHU de Dijon et de Saint-Etienne, et ont été recherchées à l'aide de techniques de PCR en temps réel. Au total 170 selles ont été trouvées positives pour l'un des 3 virus : 86 (16,0%) cosavirus, 2 (0,4%) salivirus (génotype A1) et 85 (15,8%) bufavirus. Une co-infection avec un ou plusieurs autres virus

entériques (norovirus, rotavirus, astrovirus, sapovirus, aichivirus, adénovirus, parechovirus et bocavirus) a été retrouvée pour 86 (56,0%) selles. L'analyse génotypique permettra également de déterminer les génotypes viraux circulant en France.

Tableau 9 : Résultats préliminaires

	NoVGI	NoVGII	RVA	AstV	SaV	AiV	AdV	PeV	BoV	Co-inf.
CosV n=86	0 0,0%	7 8,1%	43 50,0%	1 1,2%	1 1,2%	0 0,0%	1 1,2%	2 2,3%	1 1,2%	56 65,1%
SalV n=2	0 0,0%	1 50,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 50,0%
BuV n=85	1 1,2%	13 15,3%	7 8,2%	1 1,2%	7 8,2%	0 0,0%	2 2,4%	2 2,4%	1 1,2%	34 40,0%
Total n=170	1 0,6%	21 12,4%	50 29,4%	2 1,2%	8 4,7%	0 0,0%	3 1,8%	4 2,4%	2 1,2%	91 53,5%

Rq : les 3 adénovirus retrouvés étaient des adénovirus non entériques (AdV-2, 3 et 6)

4/ Étude histopathologique d'un cas de décès consécutif à une infection à rotavirus

Objectifs : mettre en évidence la capacité de diffusion extra-intestinale et de la réplication de rotavirus (RVA) dans les organes chez un enfant de 16 mois sans antécédent décédé d'une diarrhée à rotavirus à l'aide de techniques immunohistochimiques et d'immunofluorescence ciblant les protéines virales structurales (VP2 et VP6) et non-structurales (NSP2, NSP4 et NSP5) dans divers organes.

Partenariats : l'étude est effectuée collaboration avec le Service de Pathologie du CHU de Dijon.

État d'avancement : l'étude est en cours de publication. Les analyses de biologie moléculaire (RT-qPCR) ont mis en évidence une importante virémie à RVA de génotype G1P[8] et la présence de génome dans les divers tissus explorés. L'étude immunohistochimique a permis de montrer la présence intracellulaire des protéines virales NS et VP au niveau du pôle apical des cellules des portions ascendantes et descendantes de l'anse de Henlé, démontrant une réplication active du RVA. Ces résultats sont confirmés par la co-détection des protéines virales par immunofluorescence dans ces structures. Les protéines virales n'ont pas été détectées dans les structures cellulaires du cœur, du foie, du poumon et du péricarde malgré la détection du génome du RVA par RT-qPCR, car celle-ci était liée à la virémie intra-capillaire. Cette étude démontre la capacité du RVA à se répliquer dans certaines cellules épithéliales tubulaires rénales impliquées dans la réabsorption hydro-électrolytique. Nos données suggèrent que RVA pourrait jouer un rôle critique dans l'occurrence de la mort subite chez le nourrisson en causant des dommages organiques irréversibles et une insuffisance rénale.

6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie

Comme indiqué précédemment (voir paragraphe 6.1.1), le CNRvge publiera au cours de l'année 2019 les résultats des évaluations de trousse commerciales :

- 4 trousse ICG triplex pour la détection de rotavirus, adénovirus et norovirus dans les selles,
- 13 trousse RT-qPCR pour la détection de rotavirus et/ou norovirus dans les selles.

6.1.3 Études épidémiologiques en France et dans le monde (abstracts)

Au cours de l'année 2018, le CNRvge a publié 3 études épidémiologiques portant sur :

- la prédominance des rotavirus de génotype G9P[8] chez les enfants en France entre 2014 et 2017
- une étude séro-épidémiologique des norovirus en Afrique Sub-saharienne
- une analyse des données épidémiologiques du NoroNet de 2005 à 2016

1/ Predominance of G9P[8] rotavirus strains throughout France, 2014-2017

Objectives: Group A rotavirus is a major cause of acute gastroenteritis in young children worldwide. A prospective surveillance network has been set up in France to investigate rotavirus infections and to detect the emergence of potentially epidemic strains.

Methods: From 2014 to 2017, rotavirus-positive stool samples were collected from 2394 children under 5 years old attending the paediatric emergency units of 13 large hospitals. Rotaviruses were genotyped by

RT-PCR with regard to their outer capsid proteins VP4 and VP7.

Results: Genotyping of 2421 rotaviruses showed that after a marked increase in G9P[8] (32.1%) during the 2014-2015 season, G9P[8] became the predominant genotype during the 2015-2016 and 2016-2017 seasons with detection rates of 64.1% and 77.3%, respectively, whereas G1P[8] were detected at low rates of 16.8% and 6.6%, respectively. Phylogenetic analysis of the partial rotavirus VP7 and VP4 coding genes revealed that all of these G9P[8] strains belonged to the lineage III and the P[8]-3 lineage, respectively, and shared the same genetic background (G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) as did most of previously detected G9P[8] strains and particularly the emerging G9P[8] strains from the 2004-2005 season in France.

Conclusions: G9P[8] rotaviruses have become the predominant circulating genotype for the first time since their emergence a decade ago. In the absence of rotavirus immunization programmes in France, our data give an insight into the natural fluctuation of rotavirus genotypes in a non-vaccinated population and provide a base line for a better interpretation of data in European countries with routine rotavirus vaccination.

2/ The First Norovirus Longitudinal Seroepidemiological Study from Sub-Saharan Africa Reveals High Seroprevalence of Diverse Genotypes Associated with Host Susceptibility Factors

Background. Human noroviruses (HuNoVs) are a prominent cause of gastroenteritis, yet fundamental questions remain regarding epidemiology, diversity, and immunity in sub-Saharan African children. We investigated HuNoV seroprevalence and genetic and sociodemographic risk factors in Ugandan children.

Methods. We randomly screened 797 participants of a longitudinal birth cohort (Entebbe, EMaBS) and 378 from a cross-sectional survey (rural Lake Victoria, LaVIISWA), for antibodies against HuNoV genotypes by ELISA. We used linear regression modeling to test for associations between HuNoV antibody levels and sociodemographic factors, and with the human susceptibility rs601338 FUT2 secretor SNP and histo-blood group antigens (A/B/O).

Results. Of EMaBS participants, 76.6% were seropositive by age 1, rising to 94.5% by age 2 years. Seroprevalence in 1-year olds of the rural LaVIISWA survey was even higher (95%). In the birth cohort, 99% of seropositive 2-year olds had responses to multiple HuNoV genotypes. We identified associations between secretor status and genogroup GII antibody levels (GII.4 $P = 3.1 \times 10^{-52}$), as well as ABO and GI (GI.2 $P = 2.1 \times 10^{-12}$).

Conclusions. HuNoVs are highly prevalent in Ugandan children, indicating a substantial burden of diarrhea-associated morbidity with recurrent infections. Public health interventions, including vaccination, and increased surveillance are urgently needed.

3/ Molecular surveillance of norovirus, 2005–16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network

Background: The development of a vaccine for norovirus requires a detailed understanding of global genetic diversity of noroviruses. We analysed their epidemiology and diversity using surveillance data from the NoroNet network.

Methods: We included genetic sequences of norovirus specimens obtained from outbreak investigations and sporadic gastroenteritis cases between 2005 and 2016 in Europe, Asia, Oceania, and Africa. We genotyped norovirus sequences and analysed sequences that overlapped at open reading frame (ORF) 1 and ORF2. Additionally, we assessed the sampling date and country of origin of the first reported sequence to assess when and where novel drift variants originated.

Findings: We analysed 16 635 norovirus sequences submitted between Jan 1, 2005, to Nov 17, 2016, of which 1372 (8.2%) sequences belonged to genotype GI, 15 256 (91.7%) to GII, and seven (<0.1%) to GIV.1. During this period, 26 different norovirus capsid genotypes circulated and 22 different recombinant genomes were found. GII.4 drift variants emerged with 2–3-year periodicity up to 2012, but not afterwards. Instead, the GII.4 Sydney capsid seems to persist through recombination, with a novel recombinant of GII.P16–GII.4 Sydney 2012 variant detected in 2014 in Germany ($n=1$) and the Netherlands ($n=1$), and again in 2016 in Japan ($n=2$), China ($n=8$), and the Netherlands ($n=3$). The novel GII.P17–GII.17, first reported in Asia in 2014, has circulated widely in Europe in 2015–16 (GII.P17 made up a highly variable proportion of all sequences in each country [median 11.3%, range 4.2–53.9], as did GII.17 [median 6.3%, range 0–44.5]).

GII.4 viruses were more common in outbreaks in health-care settings (2239 [37.2%] of 6022 entries) compared with other genotypes (101 [12.5%] of 809 entries for GI and 263 [13.5%] of 1941 entries for GII non-GII.Pe–GII.4 or GII.P4–GII.4).

Interpretation: *Continuous changes in the global norovirus genetic diversity highlight the need for sustained global norovirus surveillance, including assessment of possible immune escape and evolution by recombination, to provide a full overview of norovirus epidemiology for future vaccine policy decisions.*

6.1.4 Investigation d'épidémies d'origine animale (abstracts)

Au cours de l'année 2018, le CNRvge a publié 1 étude épidémiologique portant sur la prévalence des norovirus et nebovirus bovins chez le veau nouveau-né en Iran.

1/ Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran.

In this study, bovine enteric caliciviruses (BECs) were detected in 49.4% of a total of 253 stool specimens for diarrheic calves collected from 42 industrial dairy farms from March 2010 to February 2012. Genogroup III norovirus (NoVsGIII) were more prevalent (39.5%) than neboviruses (NBs) (15%), and coinfections were observed in 5.1% of the samples tested. Sequence analysis of the partial polymerase gene from 13 NoVsGIII samples indicated the circulation of both genotype 1 and genotype 2 strains. Among the six NB strains sequenced, five were related to the Bo/Nebraska/80/US strain, while one was related to the Bo/Newbury1/76/UK strain.

6.1.5 Détection des virus entériques dans l'environnement (abstracts)

Au cours de l'année 2018, le CNRvge a publié 4 études environnementales portant sur :

- la prédiction de la contamination des rivières par les virus entériques humains,
- l'étude de la dynamique saisonnière des virus entériques dans les eaux usées et les eaux de captation,
- la détection des adénovirus entériques dans les eaux usées hospitalières,
- la détection des sapovirus dans les eaux usées hospitalières et la découverte de 2 nouveaux génotypes.

1/ Vomiting symptom of acute gastroenteritis estimated from epidemiological data can help predict river contamination by human pathogenic enteric viruses.

Contamination of fresh water bodies by human enteric viruses from wastewater discharge is a well-established phenomenon. Here we propose a model of viral contamination of rivers based on acute gastroenteritis epidemiology and assess how well it can simulate in situ experimental monitoring. Noroviruses, rotaviruses, enteroviruses, adenoviruses and hepatitis A viruses were quantified by molecular methods after water concentration. Water flows were obtained from the Hydro databank and wastewater treatment plant (WWTP) data. Acute gastroenteritis cases based on medical prescriptions were recorded by the French public health agency. We estimated the total number of daily viral acute gastroenteritis cases and modeled virus shedding and fate in WWTPs and rivers. Simulated virus concentrations were compared to the weighted sum of measured concentrations. Seasonal variations in viral acute gastroenteritis were predicted from vomiting occurrence. All viruses except hepatitis A virus were widely detected in wastewaters and river, in concentrations reaching 10^{+6} genome copies·L⁻¹ for adenoviruses in the Artière River. We were able to predict virus load in raw wastewater and in the Artière River. Estimated weighting coefficients showed the high impact of noroviruses GII. This model can thus serve to compare water treatment, discharge and reuse scenarios.

3/ Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters

Enteric viruses represent a global public health threat and are implicated in numerous foodborne and waterborne disease outbreaks. Nonetheless, relatively little is known of their fate and stability in the environment. In this study we used carefully validated methods to monitor enteric viruses, namely adenovirus (AdV), JC polyomavirus (JCV), noroviruses (NoVs), sapovirus (SaV) and hepatitis A and E viruses (HAV and HEV) from wastewater source to beaches and shellfish beds. Wastewater influent and effluent, surface water, sediment and shellfish samples were collected in the Conwy catchment (North Wales, UK)

once a month for one year. High concentrations of AdV and JCV were found in the majority of samples, and no seasonal patterns were observed. No HAV and HEV were detected and no related illnesses were reported in the area during the period of sampling. Noroviruses and SaV were also detected at high concentrations in wastewater and surface water, and their presence correlated with local gastroenteritis outbreaks during the spring and autumn seasons. Noroviruses were also found in estuarine sediment and in shellfish harvested for human consumption. As PCR-based methods were used for quantification, viral infectivity and degradation was estimated using a NoV capsid integrity assay. The assay revealed low-levels of viral decay in wastewater effluent compared to influent, and more significant decay in environmental waters and sediment. Results suggest that AdV and JCV may be suitable markers for the assessment of the spatial distribution of wastewater contamination in the environment; and pathogenic viruses can be directly monitored during and after reported outbreaks to prevent further environment-derived illnesses.

3/ Molecular detection and genotypic characterization of enteric adenoviruses in a hospital wastewater.

Hospital wastewater (HWW) represents a major source of the diffusion of many antibiotics and some toxic pathogenic microorganisms in the aquatic environment. Sanitation services play a critical role in controlling transmission of numerous waterborne pathogens, especially enteric human adenoviruses (HAdVs) that can cause acute gastroenteritis. This study intended to evaluate the human adenoviruses (HAdVs) detection rates, to determine the genotype of these viruses and to assess the efficiency of HAdVs removal in hospital pilot wastewater treatment plant (PWWT) in Tunis City, Tunisia. Therefore, hospital wastewater samples ($n = 102$) were collected during the study year from the two biological wastewater treatment techniques: natural oxidizing ponds and the rotating biological disks or biodisks. Nested polymerase chain reaction (Nested PCR) was used to evaluate the HAdVs detection rates. The genotype of HAdVs positive samples was achieved by the sequencing of the PCR products. HAdVs were detected in 64% (65/102) of positive wastewater samples. A substantial increase in the frequencies of HAdVs was observed at the exit of the two wastewater treatment techniques studied. The typing of HAdVs species F showed the occurrence of only HAdVs type 41. This data acquired for the first time in Tunisia showed high persistence and survival of HAdVs in the two biological wastewater treatment techniques experienced, and mainly highlighted the poor virological quality of the treated wastewater intended for recycling, agriculture reuse, and discharges into the natural receiving environments. Consequently, tertiary wastewater treatment appeared necessary in this case to decrease the load of enteric viruses flowing in the water environment.

4/ Detection of Sapoviruses in two biological lines of Tunisian hospital wastewater treatment.

The efficiency of rotating biodisks and natural oxidizing lagoon procedures is investigated at a Tunisian semi-industrial pilot plant, El Menzeh I, where the wastewater is mainly provided by three different neighbouring hospital clinics. Throughout 2011, 102 wastewater samples were collected from the two mentioned wastewater treatment procedures. Results showed that the Sapovirus (SaV) frequency was approximately 29.4% using the real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) technique, and about 16.6% using the conventional RT-PCR. Also, the SaV genogroups and genotypes were identified and genotyping revealed that all of the four Tunisian SaV strains obtained belonged to the two genogroups GIV.1 and GI.3. In addition, two new genotypes, D and C, were detected. A moderate decrease in the SaV frequencies was observed at the exit of the two treatment processes and the SaV removal rate was around 90% in the natural oxidizing lagoons and 94% in the rotating biodisks procedure showing the temperate sensitivity of these viruses to the implemented biological wastewater. Therefore, an urgent disinfection process should be implemented downstream of the two biological treatment procedures for safe release of treated effluent in the different natural environments.

6.1.6 Études fondamentales (abstracts)

Au cours de l'année 2018, le CNRvge a publié 1 étude fondamentale portant sur la modélisation sur l'élimination et l'immobilisation des norovirus murins dans le sol.

1/ Modelling the removal and reversible immobilization of murine noroviruses in a Phaeozem under various contamination and rinsing conditions

Enteric viruses entering the soil with contaminated irrigation water can reach groundwater or be internalized in plants through their roots without being inactivated. Their fate in the soil depends on the virus, the soil and the soil solution. In order to write a mathematical model suitable for a Calcaric Phaeozem, we investigated the removal of murine norovirus and reversible immobilization in aggregate columns according to a saturation procedure, conditions between contamination and rinsing time, temperature and soil solution. Viruses were quantified before and after 0.45- μm filtration with an RT-qPCR (real-time polymerase chain reaction). Experimental results supported a model that combined free and colloidal transport of viruses in mobile water, exchange of free viruses between mobile and immobile water, virus removal and reversible virus adsorptions on suspended colloids, the outer aggregate surface and the inner aggregate particles. For an artificial soil solution at 20°C, the fate of viruses in contaminations lasting 1 to 7 days followed by 7 hours of rinsing was described by combining 0.38 \log^{10} daily removal and weak reversible immobilization using a Freundlich adsorption isotherm ($kF = 1120$, $nF = 1.53$), which explained why free viruses prevailed in mobile water. Partial drying without aggregate desaturation did not affect virus recovery. Magnesium cation enrichment induced geochemical changes that faded over time, resulting in up to ten times more viruses adsorbed on suspended colloids than free and enhanced adsorption on outer aggregate surfaces. Likewise, groundwater rich in Mg^{2+} slowed remobilization. The fate of murine norovirus within a Calcaric Phaeozem can be described by a model that takes into account geochemical fluctuations.

6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2018)

6.2.1 Publications internationales

1. **J Kaplon, N Grangier, S Pillet, A Minoui-Tran, A Vabret, N Wilhelm, N Prieur, M Lazrek, S Alain, Y Mekki, V Foulongne, J Guinard, V Avettand-Fenoel, A Schnuriger, A Beby-Defaux, G Lagathu, P Pothier, A de Rougemont***. Predominance of G9P[8] Rotavirus Strains throughout France, 2014-2017. *Clin Microbiol Infect*, 2018; 24(6):660.e1-660.e4
2. L Thorne*, A Nalwoga, A Mentzer, **A de Rougemont**, M Hosmillo, E Webb, A Elliott, I Goodfellow. The first longitudinal seroepidemiological study of human noroviruses from sub-Saharan Africa reveals high diverse seroprevalence associated with host susceptibility factors. *J Infect Dis*, 2018; 218(5):716-725
3. J van Beek, M de Graaf, H Al-Hello, DJ Allen, **K Ambert-Balay**, N Botteldoorn, M Brytting, J Buesa, M Cabrerizo, M Chan, F Cloak, I Di Bartolo, S Guix, J Hewitt, N Iritani, M Jin, R Johne, I Lederer, J Mans, V Martella, L Maunula, G McAllister, S Niendorf, HG Niesters, AT Podkolzin, M Poljsak-Prijatelj, LD Rasmussen, G Reuter, G Tuite, A Kroneman, H Vennema, Koopmans MPG. Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect Dis*. 2018 May; 18(5): 545-553
4. F Pourasgari, **J Kaplon**, A Sanchooli, **C Fremy**, S Karimi-Naghlani, V Otarod, **K Ambert-Balay**, N Mojgani, **P Pothier**. Molecular prevalence of bovine noroviruses and neboviruses in newborn calves in Iran. *Arch Virol*. 2018 May; 163(5): 1271-1277
5. V Tesson, **G Belliot, M Estienney**, S Wurtzer, P Renault. Vomiting symptom of acute gastroenteritis estimated from epidemiological data can help predict river contamination by human pathogenic enteric viruses. *Environ Int*. 2019 Feb; 123: 114-123.
6. K Farkas*, DM Cooper, JE McDonald, SK Malham, **A de Rougemont**, DL Jones. Seasonal and spatial dynamics of enteric viruses in wastewater and in riverine and estuarine receiving waters. *Sci Total Environ*, 2018 Sep 1;634:1174-1183
7. C Ibrahim, S Hammami, N Chérif, S Mejri, **P Pothier**, A Hassen. Detection of Sapoviruses in two biological lines of Tunisian hospital wastewater treatment. *Int J Environ Health Res*. 2018 Nov 26: 1-14

8. C Ibrahim, A Hassen, **P Pothier**, S Mejri, S Hammami. Molecular detection and genotypic characterization of enteric adenoviruses in a hospital wastewater. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Apr; 25(11): 10977-10987
9. V Tesson, **A de Rougemont**, L Capowiez, P Renault. Modelling the removal and reversible immobilization of murine noroviruses in a phaeozem under various contamination and rinsing conditions. *Eur J Soil Sci*, 2018 November; 69, 1068–1077

6.2.2 Publications nationales et chapitres d'ouvrages

1. **A de Rougemont**, A Garbarg-Chenon, J Kaplon. Chapitre 94 « Autres virus des gastro-entérites ». In *REMIC v6*, 2018.
2. A Garbarg-Chenon, **A de Rougemont**, J Kaplon. Chapitre 93 « Rotavirus ». In *REMIC v6*, 2018.
3. S Bonacorsi, S Le Hello, **A de Rougemont**. Chapitre 21 « Gastro-entérites ». In *REMIC v6*, 2018.
4. **A de Rougemont**. Chapitre 52 « Les gastro-entérites ». In *Traité de Virologie Médicale, 2è édition*, 2018.
5. **A de Rougemont**. Chapitre 35 « Les virus des gastro-entérites : rotavirus et norovirus ». In *Traité de Virologie Médicale, 2è édition*, 2018.

6.2.3 Communications internationales

1. **Davide Agnello***, Damien Denimal, **Amandine Lavaux**, Cécile Pitoiset, **Pierre Pothier**, **Alexis de Rougemont**. Asymmetric recirculation of $\alpha 4\beta 7$ -expressing memory B cells throughout the gut-associated lymphoid tissues. *13th International dsRNA virus symposium, Houffalize (Belgium), September 2018*.

6.2.4 Communications nationales

1. **Alexis de Rougemont**. Les gastro-entérites du nourrisson, *Journée de prévention du risque infectieux chez le nouveau-né, Centre d'appui pour la prévention des infections associées aux soins, CPIAS ARA, Lyon, 18 octobre 2018*.
2. **Alexis de Rougemont**. Les GEA virales, *Gestion des cas groupés de Gastro- Entérites Aiguës (GEA), CoCLINNOR, Rouen, 15 novembre 2018*.

7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX, INDUSTRIELS

7.1. COOPÉRATIONS STRUCTURELLES DANS LE CADRE DE NOS ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE ET D'ALERTE

IFREMER - Centre de Nantes (Dr Françoise LE GUYADER) : laboratoire de référence pour les virus entériques dans les **produits de la mer**. Nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).

ANSES – Unité de virologie des Aliments et de l'eau, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons Alfort (Dr Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour **l'eau et les aliments**. Nous collaborons avec ce laboratoire pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).

ANSES - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, 40, Rue Lionnois F-54000 NANCY (Dr Benoît GASSILLOUD).

7.2. COOPÉRATIONS DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE

7.2.1 Coopérations universitaires

Depuis 2016, l'équipe de recherche du CNRVge est intégrée à l'équipe « **Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques** » à **L'Unité Mixte de Recherche « Procédés Alimentaires et Microbiologiques » (UMR PAM)**, placée sous la gestion conjointe d'AgroSup Dijon et de l'Université de Bourgogne. Fondée le 1^{er} janvier 2012, elle est constituée de 3 équipes : **PMB, PCAV (« Physico-Chimie de l'Aliment et du Vin »)**, et **VALMIS (« Vin-ALiment-Microbiologie-Stress »)**. Elle est installée sur 4 sites : AgroSup Dijon, l'IUVV, l'INRA et l'UFR des Sciences de Santé. L'UMR PAM est un acteur majeur du progrès scientifique et technologique dans le domaine des aliments et du vin. Les travaux conduits par l'équipe PMB s'affichent dans le cadre « santé et alimentation » et sont tournés vers le monde de l'industrie. Ils ont pour finalité l'amélioration de la qualité de la nutrition en élaborant de nouveaux produits ou procédés à partir de microorganismes, et l'évaluation des risques que posent les virus dans l'alimentation (sécurité alimentaire). À cette fin, l'activité de recherche est centrée sur la maîtrise de l'activité et de la fonctionnalité de microorganismes soumis à différents types de perturbations environnementales d'amplitude et de cinétique variés. Nos travaux sont surtout axés sur les norovirus et leur éradication suivant les conclusions du *Codex alimentarium* de 2012.

Notre équipe participe à l'étude du pouvoir pathogène des virus persistants dans l'environnement et les facteurs de stress qui y sont associés et sur l'optimisation de leur destruction au cours de traitements technologiques tout aussi bien applicable dans les secteurs de l'agro-alimentaire, de l'hygiène et de la clinique. Les travaux mettent en œuvre des stratégies et des outils performants et adaptés à cette approche dont des outils moléculaires de détection, de caractérisation et de quantification des virus dans l'environnement et différents types de matrices ; la production et la purification d'antigène et de particule de synthèse en système bactérien et en baculovirus ; ou encore la génétique inverse, la mutagenèse et l'expression de gènes.

7.2.2 Projets

Projet européen OXYVIR

Le CNRVge participe depuis de 2017 au projet OXYVIR subventionné par le Fond Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche (FEAMP) sur 3 ans. Ce projet OXYVIR porte sur la survie des norovirus et l'étude de leur pouvoir infectieux en conchyliculture et en particulier en ostréiculture. Dans le cadre de ce projet, le CNRVge apporte son expertise scientifique et technologique sur les norovirus et l'utilisation de particules virales de synthèse (VLP). Les membres du consortium sont les suivants : ACTALIA (Saint Lô, association Loi 1901), le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR 7564, Université de Lorraine, Nancy), le Laboratoire de Chimie et Physique des milieux complexes (Université de Lorraine, Metz), Spéciales GILLARDEAU (entreprise conchylicole) et le Pôle de compétitivité AQUIMER (Boulogne sur mer).

7.2.3 Collaboration avec l'INRA

Depuis plusieurs années, le CNRVge collabore avec les équipes de l'INRA :

- du Pr. Pierre RENAULT à Avignon sur le devenir des virus des gastro-entérites dans l'environnement et de déterminer comment la transmission alimentaire des gastroentérites virales aiguës est façonnée par les pratiques alimentaires, d'hygiène et de santé et par le devenir du virus dans l'environnement. Ce projet, en partenariat avec un consortium de 12 laboratoires, vise à améliorer l'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA) liés aux infections virales dues à la consommation de légumes-feuilles crus et à l'origine de gastroentérites aiguës, en intégrant toutes les étapes de la production à la consommation des légumes-feuilles.
- du Pr. Harry SOKOL (APHP) à Jouy-en-Josas (équipe MICALIS) sur la transplantation de microbiote fécal (TMF) et le microbiote fécal dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), en particuliers la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Cette collaboration porte actuellement sur deux études TMF (REBALANCE et MIRACLE) portées par l'équipe INRA ainsi que sur l'étude Microbiote portée par l'UMR PAM de Dijon.

7.2.4 Conclusion sur nos coopérations

Nos activités de surveillance nous ont conduites à collaborer régulièrement avec l'IFREMER et l'ANSES. Nos participations à des contrats de recherche, ANR ou autres nous ont permis de collaborer avec d'autres laboratoires avec lesquels nous avons conservé des contacts.

Parallèlement à ce réseau national, nous avons recherché à mieux insérer notre CNR dans le contexte scientifique local travaillant dans les domaines de la microbiologie alimentaire ou de l'environnement. Ainsi, notre collaboration avec l'UMR PAM (Pr. Laurent BENEY) a été soutenue par la Région Bourgogne.

8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR LES ANNÉES SUIVANTES

8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

8.1.1 Évaluation de trousse de diagnostic

Diagnostic des norovirus

Nous poursuivrons notre **évaluation des trousse de diagnostic par immuno- chromatographie (ICG) et de diagnostic moléculaire**. Les évaluations que nous pratiquons montrent une amélioration de la sensibilité, néanmoins les firmes poursuivent le développement et l'amélioration de ces trousse car la sensibilité n'est globalement encore pas satisfaisante.

Diagnostic de rotavirus

Contrairement au diagnostic des norovirus, les méthodes d'immunochromatographie sont très satisfaisantes en termes de sensibilité. Nous poursuivons cette veille, notamment avec l'arrivée de trousse ICG triplex noro-rota-ado et développerons des évaluations des trousse de diagnostic par biologie moléculaire. Néanmoins, nous envisageons l'évaluation de ces tests chez le nouveau-né et le prématuré en réanimation pédiatrique. Face à un nombre de faux positifs régulièrement rapportés, cette étude visera à déterminer la pertinence et les limites des tests ICG chez des enfants ayant une immaturité du système digestif.

Diagnostic des pathogènes entériques

Plusieurs fournisseurs développent une **approche « syndromique »** du diagnostic en recherchant tous les pathogènes entériques en une seule analyse. Outre l'aspect technique de ces réactifs, nous évaluons l'aspect stratégique de leur utilisation afin de définir et limiter les indications de ces réactifs coûteux. Par ailleurs, des évaluations de leur sensibilité semblent nécessaires pour mieux appréhender ces nouveaux outils.

8.1.2 Développement de techniques

Transferts technologiques et développement du NGS

Fort de nos collaborations, nous avons entrepris depuis quelques années une démarche de développement du **séquençage haut débit (Next Génération Sequencing)** pour la détection des virus entériques ARN dans les selles à l'aide de la technologie Illumina sur MiSeq® puis NextSeq®. Le CNRvge a acquis une compétence partielle de bioinformatique pour l'analyse des données et peut s'appuyer sur l'expertise de l'équipe « *Genetics of Development Disorders* » (GAD) de l'INSERM 1231 qui partage nos locaux au CHU. Nous sommes aujourd'hui capables de détecter et séquencer les génomes de norovirus et de rotavirus issus de notre biobanque et de cultures. Diverses approches vont être mis en place avec i) une recherche mensuelle/bimestrielle pan-viral ARN dans les selles de patients immunodéprimés, ii) une approche « *whole-sequencing* » des souches d'intérêt, en particuliers des norovirus.

Amélioration des techniques de quantification des virus entériques dans les selles

Ces techniques quantitatives s'appuient sur l'utilisation systématique de gammes ARN des virus cibles afin d'en déterminer la charge dans les selles. La synthèse des ARN à partir de plasmide pour l'élaboration des gammes est effectuée au laboratoire. Le laboratoire possède les plasmides nécessaires pour la synthèse de ces ARN (entérovirus, norovirus GI et GII, VHA, VHE, rotavirus, bocavirus, salivirus, cosavirus, aichivirus, astrovirus).

Développement de l'étude des constellations de gènes de rotavirus

Cette technique actuellement en notre possession permet d'étudier l'ensemble des 11 gènes de rotavirus et de mettre en évidence des recombinaisons. Cette approche est importante lorsqu'il s'agit de comparer un rotavirus à une souche vaccinale lors de gastro-entérites aiguës post-vaccinales. Elle sera généralisée à un plus grand nombre d'échantillons. Elle servira également d'étalon pour évaluer les performances de la technologie NGS sur les rotavirus.

Détection de nouveaux virus impliqués ou suspectés dans les gastro-entérites humaines

D'autres virus, plus exotiques, peuvent être impliqués dans les GEA : deux nouveaux genres de *Piriconaviridae* : les cosavirus et les salivirus, et un nouveau *Protoviridae*, le bufavirus. Nous

possédons déjà une bonne expérience dans la détection de ces virus et l'évaluation de leur prévalence dans la population pédiatrique est en cours. La mise en production de ces techniques est en cours d'évaluation.

Dans le courant de l'année 2018, nous avons mis en production une technique de détection des nouveaux astrovirus recombinants appartenant aux clades MLB et VA. Ces virus entériques sont également pourvoyeurs d'infections neurologiques sévères chez l'immunodéprimé. Une évaluation prospective est en cours afin d'évaluer la prévalence de ces virus.

8.1.3 Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections

Constitution et stockage

Nos collections comprennent des souches virales pour les virus cultivant sur cellules, des échantillons de selle comprenant des virus caractérisés, des gènes clonés et des pseudo- particules virales dérivées des norovirus humains (*virus like particle* ou VLP), des anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus et rotavirus. Cette collection constituée depuis 2002 comprend l'ensemble des virus responsables de gastro-entérites connus et la plupart des génotypes de ceux-ci.

Cette collection est anonyme pour ce qui concerne les échantillons de selle. Cette collection est conservée dans le **Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand-Cabanne** (www.crbferdinandcabanne.fr) dont le numéro d'accréditation est **BB-0033-00044**. Une petite partie, nécessaire pour notre activité quotidienne, est conservée en miroir sous forme d'aliquotes dans les enceintes froides à -40°C ou -80°C.

Mise à disposition des collections

Les souches caractérisées, les VLP et les anticorps sont conservés au sein du CNR et du CRB microbiologique du CHU de Dijon. Tous les produits ou souches d'intérêt pour le diagnostic biologique de routine des gastro-entérites virales sont disponibles pour les laboratoires d'analyses médicales y compris les laboratoires privés.

Tous les produits ou souches d'intérêt scientifique sont disponibles pour les laboratoires de recherche académique selon les conditions habituelles, c'est-à-dire après signature d'un « *Material Transfert Agreement* » entre notre établissement et les demandeurs.

Tous les produits ou souches d'intérêt de notre collection sont disponibles pour les sociétés privées dans le cadre d'un contrat entre notre établissement et ces sociétés.

Toutes les séquences génomiques virales d'intérêt sont à disposition de nos collègues des réseaux « NoroNet » et « EuroRotaNet ». Certaines de ces séquences sont incluses dans des banques de données accessibles à tous comme GenBank.

8.1.4 Travaux d'évaluation de techniques

Collaborations avec les industrielles

Durant le précédent contrat, nous avons établi des relations privilégiées avec les industriels fabriquant les réactifs de diagnostic des virus responsables de gastro-entérites, principalement BioMérieux et Coris Bioconcept mais également R-Biopharm, Operon, Diasorin, Diagenode, Certest Biotc et Mobidiag. Ces laboratoires nous demandent régulièrement d'évaluer leurs nouveaux réactifs ou les modifications apportées à leur trousse de détection. Notre collection complète tant pour les norovirus et les rotavirus que pour les virus plus rares nous permet d'évaluer les réactifs vis-à-vis de ces virus et de disposer d'un échantillon représentatif des virus circulant dans les différentes classes d'âge de la population. Ces éléments associés à une standardisation de nos évaluations sont toujours un atout de poids pour de futures évaluations ou collaborations avec ces industriels.

Évaluations futures

Nous poursuivrons les évaluations des nouveaux réactifs de diagnostic comme précédemment. Ces évaluations régulières nous permettent de **conseiller nos collègues biologistes dans leur choix lors des appels d'offre**.

Comme évoqué plus haut, nous travaillons également sur les trousse de diagnostic dit « syndromique ». Nous avons déjà évalué cette technologie (réactif Biofire® de BioMérieux®) sachant que d'autres réactifs sont ou seront prochainement sur le marché. Outre l'évaluation des performances de ces

réactifs, il nous conviendra d'en définir leur utilisation. En effet, le coût élevé de ces tests, environ 140 euros par analyse, obligera les biologistes à en cibler les indications. Outre les caractéristiques virologiques des virus des échantillons, nos panels d'évaluation tiendront compte des caractéristiques cliniques et épidémiologiques (patients immunodéprimés, enfants, personnes âgées en institution, etc.). Cette évaluation devrait aboutir à l'écriture d'une procédure à usage interne définissant le bon usage de ces systèmes.

8.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Des réactifs pour le diagnostic des norovirus et des rotavirus étant commercialisés, les demandes de transfert de techniques de diagnostic pour ces virus se posent donc rarement. Néanmoins, **nos procédures sont disponibles** et nous assurerons un **soutien technique à distance**. Ces processus sont principalement adaptés aux virus moins fréquents comme les virus Aichi et les Sapovirus.

La demande la plus fréquente émane des laboratoires pour la **fourniture de témoins positifs**. Nous disposons à cet effet d'un stock d'échantillons de selle dont le virus est parfaitement caractérisé. En collaboration avec l'ANSM nous avons élaboré par le passé un contrôle externe des tests rapides par immunochromatographie des rotavirus, l'ANSM s'étant chargée ensuite de la distribution de ces réactifs biologiques aux laboratoires participant à l'évaluation de leur technique. Dans le futur, à la demande de l'agence, nous serions en mesure de préparer à nouveau ce type de contrôle externe pour les rotavirus et pour les norovirus. S'agissant des norovirus, nous avons également développé une collection d'antigènes synthétiques sous forme de VLP correspondant aux principaux génotypes de norovirus, dont les derniers variants. Ces VLP peuvent être utilisées comme contrôle externe dans les tests de détection des norovirus par immunochromatographie.

8.1.6 Recherche liées avec les missions du CNR des virus des gastro-entérites

1/ Études épidémiologiques

Poursuite de la surveillance des souches de rotavirus du groupe A et de leur dérive antigénique dans un contexte vaccinal chez l'enfant grâce à l'extension du Réseau National Rotavirus vers le Sud et l'Ouest de la France. En particulier, nous nous intéresserons à l'émergence de nouveaux génotypes ainsi qu'à l'impact de la vaccination sur la sélection préférentielle de souches de rotavirus. Nous poursuivrons également l'étude de la relation entre HBGA (antigènes tissulaires de groupes sanguins) et rotavirus, et pour laquelle nous avons acquis une solide expérience au CNR.

Surveillance des souches de norovirus épidémiques et l'émergence de nouveaux variants/génotypes dans la population. Nous évaluerons la capacité épidémique des souches qui pourraient émerger et leur fixation aux HBGA (antigènes tissulaires de groupes sanguins), ligands naturels des norovirus. Établissement des profils d'interaction et d'affinité des nouveaux variants épidémiques GII.4 et GII.17 avec les HBGA sur des salives phénotypées et par résonance plasmonique de surface.

Étude du microbiote intestinal chez les personnes âgées ayant présenté une GEA à norovirus. Les personnes âgées qui ont une diminution de la biodiversité de leur microbiote intestinal pourraient être plus vulnérables aux infections à norovirus et à leurs conséquences post-infectieuses. Les objectifs seront de déterminer les éléments du microbiote qui pourraient prédire la survenue et/ou la sévérité d'une infection à norovirus ; d'évaluer les conséquences des infections gastro-intestinales à norovirus sur la composition du microbiote intestinal chez les personnes âgées en EHPAD. Cette étude est effectuée avec le support technique de l'équipe du Pr Harry SOKOL et de la plateforme MOCALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas.

2/ Études fondamentales

Évaluation des systèmes de culture des norovirus : Un des freins à l'étude des norovirus a été pendant longtemps l'absence de système de culture du virus. Le diagnostic moléculaire de ces virus a permis de grand progrès en recherche mais aussi de développer un diagnostic efficace. En revanche, les trousseaux disponibles ne permettent pas d'évaluer le pouvoir infectieux de ces virus. Très récemment, deux systèmes de culture des norovirus humains ont été proposés dont les entéroïdes humains pour l'étude de la réplication. Le CNR travaille actuellement à l'évaluation et la faisabilité de ces deux techniques pour

évaluer le potentiel infectieux des norovirus en complément avec les technologies que nous avons pu développer avec les VLP.

Expression des HBGA et réponse Th1/Th17 au cours de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) : rôle des norovirus. À ce jour, aucune évaluation histopathologique de l'expression tissulaire des ligands des norovirus (HBGA) n'a été conduite chez des patients porteurs de MICI. Très peu d'études sur la distribution in situ des sous-populations lymphocytaires lors d'une phase active de MICI ont été conduites. Les interactions norovirus-hôte en fonction des profils génétiques de FUT2 et FUT3 dans le cadre de MICI restent également à étudier. L'objectif principal de l'étude sera de déterminer les liens éventuels des HBGA et de l'infection par les norovirus chez les patients souffrant de MICI. Le projet s'articulera en plusieurs volets : analyser le niveau d'expression des HBGA au niveau de la surface des entérocytes, chez des patients atteints de MICI ; analyser la capacité de liaison des norovirus au niveau de la surface des entérocytes de patients souffrant de MICI ; analyser la répartition tissulaire des sous-populations lymphocytaires Th1 et Th17 au niveau de la surface des entérocytes de patients atteints de MICI ; et réaliser sur tissu intestinal un phénotypage et génotypage des gènes FUT2 et FUT3.

3/ Études environnementales et agro-alimentaires en collaboration

Développement d'une méthode technico-économique réaliste pour estimer le danger lié aux norovirus humains dans les aliments à risque (collaboration industrielle). Étude des modifications physico-chimiques des VLP de norovirus (GII.4, autres) en suspension au cours de l'inactivation par oxydation (chlore ou ozone) et par la température (50-60°C) : évaluation de l'impact sur la charge globale, l'hydrophobie, la reconnaissance et l'affinité pour les HBGA ; étude des modifications des VLP de norovirus adhérents sur une matrice de type végétal frais au cours de l'inactivation par oxydation (chlore ou ozone) et par la température (50-60°C) : évaluation de l'impact sur la charge globale, l'hydrophobie, la reconnaissance et l'affinité pour les HBGA après extraction des virus par « élution - concentration » selon la méthode ISO 15216.

Étude visant à déterminer comment la transmission alimentaire des gastroentérites virales aiguës est façonnée par les pratiques alimentaires, d'hygiène et de santé et par le devenir du virus dans l'environnement. Ce projet en partenariat avec un consortium de 12 laboratoires dont l'INRA d'Avignon, vise à améliorer l'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA) liés aux infections virales dues à la consommation de légumes-feuilles crus et à l'origine de gastroentérites aiguës, en intégrant toutes les étapes de la production à la consommation des légumes-feuilles. Les livrables seront (i) une base de données réunissant les résultats des expériences, de la surveillance et des enquêtes du projet, (ii) un modèle multicritère couplant devenir environnemental des virus et QMRA et prenant en compte des paramètres scientifiques et des pratiques humaines, et (iii) la mise à disposition d'une typologie de situations à risques et de situations les plus favorables à la santé. Le projet revisitera les hypothèses sous-jacentes à la contamination initiale de surface ou internalisée des légumes-feuilles et au devenir ultérieur des virus ; il intégrera l'impact des pratiques individuelles en matière d'alimentation, d'hygiène et de santé, et les choix sociétaux en matière de Santé Publique et de gestion des eaux usées.

8.2. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

8.2.1 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à rotavirus

La surveillance des gastro-entérites infantiles sera poursuivie avec les 18 centres métropolitains. Nous tenterons d'impliquer des centres d'Outre-Mer, nos actions ont commencé en 2013 dans l'île de la Réunion. La poursuite de cette surveillance est importante et elle s'intègre dans une surveillance plus large, au niveau européen avec notre participation au réseau EuroRotaNet. Par ailleurs, nos collaborations avec nos **partenaires de l'Afrique Sub-Saharienne et du Maghreb** seront poursuivies afin de mieux surveiller les souches en capacité d'émergence en France.

8.2.2 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à norovirus

La surveillance des souches de norovirus et l'étude de leur évolution reste un de nos objectifs prioritaires pour 2019. Notre collaboration avec les délégations territoriales des ARS et des CIRE nous permettent de recevoir les épidémies qui surviennent sur l'ensemble de la Métropole. Nous poursuivons nos **partenariats traditionnels** comme l'IFREMER, l'ANSES et les autres CNR, mais également avec

d'autres instituts tels que l'INRA, AgroSup, ADRIA pour des recherches plus ponctuelles sur l'environnement ou la contamination des aliments.

8.3. CONTRIBUTION À L'ALERTE

Les procédures d'alerte seront poursuivies selon une procédure formalisée et actualisée. Tous événements apparaissant anormal ou nécessitant une discussion avec les épidémiologistes sont transmis à SPF via nos contacts. Les alertes européennes concernant les risques alimentaires sont diffusées par internet par le réseau FBVE-Net. SPF, ANSES et IFREMER sont également informées et par les mêmes voies que notre CNR.

8.4. ACTIVITÉ D'INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL

8.4.1 Modalités de diffusion de l'information et des résultats

Le site internet est pour nous un moyen de communication ou d'information important. Il détaille les conditions de prélèvements de selles, de leur conservation et de leur acheminement au CNR (www.cnr-ve.org). L'évolution du site internet pour les prochaines années concernera le développement d'un **serveur sécurisée des résultats** qui permettra de réduire les délais de rendus et d'échange avec nos partenaires.

8.4.2 Collaboration/expertises auprès d'instances nationales ou internationales

Comme par le passé, le CNR des virus des gastro-entérites apportera son aide ou ses conseils aux établissements publics, aux établissements de soins ou d'hébergement (publics ou privés), aux administrations qui lui en feraient la demande et aux Ministères. Sous certaines conditions, nos conseils peuvent être dispensés aux entreprises privées.

8.4.3 Activité de formation

L'activité de formation se fera essentiellement par l'accueil et l'encadrement de stagiaires, la mise en place de conférences et/ou séminaires ainsi que via des enseignements postuniversitaires et des publications didactiques ou de vulgarisation. Le CNRvge proposera à la rentrée 2019 un module d'enseignement « virologie » de 20h dans la formation initiale des ingénieurs agro-alimentaires d'AgroSup Dijon ainsi que 6h dans un M2R international.