

Mars 2016

Auteurs

Garry Pascal, Le Saux Jean-Claude, Hervio-Heath Dominique et Le Guyader Soizick

Collaborateurs :

Caprais Marie-Paule, Garry Pascal, Gourmelon Michèle, Hubert Françoise, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cédric, Le Mennec Cécile, Le Quintrec Estelle, Loiseau Véronique, Lozac Solen, Maillot Jessica, Menanteau Chantal, Ollivier Joanna, Parnaudeau Sylvain, Piquet Jean-Côme, Quenot Emmanuelle, Schaeffer Julien, Vallade Emilie, Véron Antoine

Rapport d'activités 2015

Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie

Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages



SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	5
2. RAPPEL DES OBJECTIFS	5
3. MOYENS ET EFFECTIFS	7
3.1 Personnels Ifremer : Cadres – T/A.....	7
3.2 Doctorants.....	8
3.3 Post-doctorants	8
3.7 Equipement.....	9
4. ACTIONS LIEES AUX MISSIONS DE LNR	9
4.1 Démarche qualité.....	9
4.2 Coordination technique des laboratoires agréés	10
4.3 14^{ème} workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l’Union européenne	12
4.4 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015	12
4.5 Assistance à l’administration.....	13
4.6 Normalisation	13
4.7 Analyses officielles	14
4.8 Participation aux essais du LR-UE et PHE.....	15
4.9 Diffusion de l’information à l’administration et/ou aux laboratoires agréés.....	17
4.10 Validation européenne de méthodes d’analyse.....	17
4.11 Développement de méthode	17
5. PROJETS	19
5.1 CAPVIRO	19
5.2 NOROCOQURAY	19
5.3 COMPARE	20
5.4 DEPVIRO	21

5.5 NOVPROTOYS.....	22
5.6 QUIPROCO.....	22
5.7 RISKMANCHE	23
5.8 BACPATH.....	24
5.9 VIBOBS	25
6. COORDINATION REMI.....	27
7. ACTIVITES ANALYTIQUES EN SOUS-TRAITANCE	27
8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 2016.....	28
ANNEXES	29
Production scientifique et technique	29
Participation à la formation	35
Expertise.....	37

1. Introduction

La Microbiologie sanitaire, thème de recherche fédérant notre laboratoire, nous a permis d'obtenir des résultats intéressants qui sont présentés dans ce rapport et ont été valorisés par des publications ou la participation des membres de l'équipe à des congrès scientifiques. Cette thématique nous permet surtout des collaborations variées au travers des projets de recherche portés par l'équipe. L'élargissement de nos activités en intégrant la coordination REMI constitue un point important à souligner complétant nos actions de référence, d'expertise et de recherche.

L'attrait et l'intérêt scientifique suscité par la microbiologie sanitaire a été démontré par le succès rencontré par le colloque organisé à Brest en lien avec la fin du projet européen RiskManche.

Ce rapport présente une synthèse des actions, travaux menés par l'équipe, accompagnée par des stagiaires, doctorants, post doctorants ou visiteurs qu'il est important de remercier pour leur contribution.

2. Rappel des objectifs

Le Laboratoire a pour mandat de :

- développer une recherche sur les microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme, connus ou émergents. A cette fin, des techniques de biologie moléculaire visant les principaux virus et bactéries entériques et les vibrons impliqués ou susceptibles d'être impliqués dans des toxi-infections liées aux coquillages seront mises au point et validées ;
- étudier les mécanismes de survie et de dissémination en milieu marin des micro-organismes présentant des risques pour la santé humaine et en particulier de rechercher des moyens analytiques pour évaluer leur pouvoir pathogène, qu'ils soient cultivables ou non ;
- effectuer des travaux de recherche sur des systèmes de prévention de la contamination des zones de production et des techniques de purification des coquillages et de les valider ;
- anticiper l'apparition de nouveaux agents pathogènes (veille bibliographique et épidémiologique) ;
- apporter un soutien aux Laboratoires Environnement Ressources (LER) dans le domaine de la microbiologie sanitaire lorsqu'ils sont confrontés à ce type de contamination ou à des déclarations de toxi-infections alimentaires liées à des coquillages issus des zones de production dans lesquels ils sont implantés.

Au titre de Laboratoire National de Référence microbiologie des coquillages, les missions et objectifs du laboratoire en 2015 étaient les suivants :

- coordonner des activités des laboratoires réalisant des analyses sur des coquillages dans le cadre des contrôles officiels exercés par la puissance publique,
- appuyer la puissance publique dans la mise en place et le suivi d'un réseau de laboratoires agréés pour la recherche des norovirus dans les coquillages,

- organiser des essais inter-laboratoires d'aptitude afin d'évaluer les performances des laboratoires agréés pour la réalisation d'analyses microbiologiques sur des coquillages (*E. coli*, *Salmonella* et norovirus et VHA),
- assister l'administration par l'expertise et l'appui scientifiques et techniques au plan national, européen (DG Sanco) ou international (OMS, FAO, Codex), notamment concernant les projets de réglementation ou de normalisation,
- réaliser à la demande de l'administration, des analyses bactériologiques et virologiques de contrôle officiel sur les échantillons de coquillages notamment lors des épisodes de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) liées à la consommation de coquillages, en relation avec l'InVS et la DGAI (Sous-Direction de la Sécurité Sanitaire des Aliments), à la collecte et à la gestion des informations nationales et européennes liées à des alertes sanitaires,
- réaliser des analyses bactériologiques et virologiques sur des échantillons qui lui sont confiées directement par le ministère ou à sa demande dans des situations qui ont ou peuvent avoir des incidences sur la santé publique.
- Appuyer la puissance publique sur le volet technique dans la mise en place d'une étude européenne sur la prévalence des norovirus (pathogènes pour l'homme) dans les huîtres.

3. Moyens et effectifs

Le Laboratoire est bilocalisé sur les Centres Ifremer de Nantes et de Brest.

<i>Titre</i> : Laboratoire de Microbiologie - LNR Ifremer		
<i>Adresses</i>	Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03	Z.I de la pointe du diable CS 10070 29280 Plouzané

3.1 Personnels Ifremer : Cadres – T/A

Personnel permanent (pendant la période)

Laboratoire de Santé, Environnement et Microbiologie	
Responsable du laboratoire : LE GUYADER Soizick	
BREST	NANTES
CAPRAIS Marie-Paule	GARRY Pascal
COZIEN Joëlle	HUBERT Françoise
GOURMELON Michèle	KAELIN Gaëlle
HERVIO HEATH Dominique**	KERGARAVAT Cédric
LE SAUX Jean Claude	LE GUYADER Soizick*
LOISEAU Véronique	LE MENNEC Cécile
LOZACH Solen	LE QUINTREC Estelle
QUENOT Emmanuelle	MAILLOT Jessica
	MENANTEAU Chantal
	OLLIVIER Joanna
	PARNAUDEAU Sylvain
	PIQUET Jean-Côme
	SCHAEFFER Julien
	VALLADE Emilie
	VERON Antoine

* : responsable du laboratoire, ** : adjointe à la responsable du laboratoire sur Brest.

3.2 Doctorants

Nom Prénom	Début de thèse	Date de soutenan ce	Sujets	Ecoles Doctorales d'inscription	Encadrements scientifiques
BALIERE Charlotte	01/10/12	29/01/16	Les <i>Escherichia coli</i> potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral. Cas des STEC et EPEC.	ED 156 Sciences de la Mer Université Bretagne Occidentale Rennes	A. RINCE Université de Caen M. GOURMELON Ifremer
DROUAZ Najoua	01/10/11	26/10/15	Norovirus et coquillages : approche de l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux.	ED 502 Ecole Doctorale Biologie et Santé Université Nantes Nantes	S. LE GUYADER Ifremer

3.3 Post-doctorants

Date début	Date fin	Sujets	Nom Prénom	Encadrements scientifiques
09/03/15	09/10/2016	NOVPROTOY: Efficacy of enzymatic pre-treatments to enhance viral depuration from oysters. Disrupting norovirus ligands.	POLO MONTERO David	S. LE GUYADER

3.7 Equipement

Outre des équipements classiques de microbiologie et biologie moléculaire le LSEM s'est équipé d'un système de purification de l'eau de mer. Il s'agit d'un prototype créé pour répondre spécifiquement au besoin du laboratoire. Cet équipement va permettre au laboratoire de réaliser des contaminations de coquillages dans de meilleures conditions en limitant les contaminations. Ceci est particulièrement utile pour la préparation des échantillons destinés aux EILs, mais également pour le développement ou la validation de méthode nécessitant des coquillages contaminés. Ce prototype peut également être utilisé dans le cadre de programme de recherche portant par exemple sur la dépuración des coquillages.

4. Actions liées aux missions de LNR

4.1 Démarche qualité

L'audit Cofrac du 6 et 7 mai 2015 a confirmé l'accréditation du laboratoire sur le programme 59 du Cofrac pour le dénombrement d'*Escherichia coli* (méthode NPP selon ISO/TS 16649-3 et méthode impédancemétrie selon NF V 08-106) et la recherche de *Salmonella* spp. (norme NF EN ISO 6579). Les évaluateurs du Cofrac n'ont rédigé aucun écart.

Des audits internes ont également été organisés en novembre et décembre, respectivement pour le manuel qualité et pour la bactériologie. Les conclusions de ces deux évaluations montraient la confiance des auditeurs dans les dispositions prises par le laboratoire et la qualité des résultats obtenus.

Le laboratoire a pour objectif de demander en 2016 l'extension de l'accréditation à la détection et à la quantification des norovirus et du virus de l'hépatite A, selon les normes XP CEN ISO/TS 15216-1 et 2. Un plan d'actions a été défini et les premiers documents techniques ont été rédigés en 2015. Dans le cadre de cette accréditation il est nécessaire de présenter un dossier de validation de la méthode sur les principales matrices analysées au laboratoire. La première partie des essais de validation (validation de la PCR) a été réalisée au 4^{ème} trimestre 2015.

Concernant les activités de recherche à Nantes et à Brest, il a été maintenu le suivi des équipements mis en place depuis plusieurs années (balances, pipettes, étuves). L'effort sera poursuivi dans ces activités en prenant en compte les exigences liées à la certification ISO 9001 de l'Ifremer.

A noter également l'organisation en mars 2016 de la revue de Direction au niveau de l'Unité SG2M couvrant les activités de référence et de recherche du LSEM et du LGPMM.

4.2 Coordination technique des laboratoires agréés

- **Organisation des essais d'aptitude pour les laboratoires agréés- Appui à la démarche d'accréditation des laboratoires**

E. coli /*Salmonella*

Dans le cadre de la coordination des laboratoires agréés, le laboratoire a organisé, comme chaque année, deux campagnes d'essais inter-laboratoires d'aptitude, pour les critères *E. coli* et *Salmonella*.

Le premier essai d'aptitude a eu lieu le 17 mars 2015 sur la matrice « huître », et le deuxième le 6 octobre 2015 sur la matrice « moule ». Chaque essai d'aptitude porte sur les deux paramètres réglementaires *E. coli* et *Salmonella* avec envoi aux participants de cinq échantillons pour l'essai *E. coli* et deux échantillons pour l'essai *Salmonella* (deux positifs en mars et octobre). Le nombre de participants est donné dans le Tableau 1 et les résultats obtenus par les laboratoires sont reportés dans le Tableau 2. Chacun des laboratoires peut utiliser une ou plusieurs méthodes pour chacune des bactéries cibles.

Tableau 1 : Bilan des participations à ces essais

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
Mars 2015	33 laboratoires (41 couples laboratoire/méthode)	28 laboratoires (45 couples laboratoire/méthode)
Octobre 2015	34 laboratoires (42 couples laboratoire/méthode)	20 laboratoires (32 couples laboratoire/méthode)

Tableau 2 : Résultats des participants (couples laboratoire/méthode) à ces essais d'aptitude

	<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella</i>	
	Satisfaisant	Discutable	Insatisfaisant	Satisfaisant	Insatisfaisant
Mars 2015	97,5 % (40 couples)	0 %	2,5% (1 couples)	100%	0 %
Octobre 2015	88,1% (37 couples)	11,9% (5 couples)	0%	100%	0 %

Remarque : deux laboratoires espagnols (INTECMAR, Pontevedra et IRTA, Sant Carles de la Ràpita) ont participé à l'essai d'aptitude *E. coli*.



Figure 1 : Contamination des coquillages par bioaccumulation

Norovirus

Suite à l'essai inter-laboratoire pour la détection des norovirus dans les coquillages de septembre 2014, il a été organisé les 20 et 21 janvier 2015 une formation portant sur la norme XP CEN ISO/TS 15216-2 de juin 2013 (Méthode horizontale pour la recherche des virus de l'hépatite A et norovirus dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 2: Méthode de détection qualitative). Cette formation a concerné les cinq laboratoires agréés.

Le laboratoire a également organisé le 14 septembre 2015 un essai inter-laboratoire pour la recherche des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les coquillages. Les 10 laboratoires participant à cet essai ont reçu un échantillon d'huîtres creuses (*C. gigas*), un échantillon de tissus digestifs de *C. gigas* et deux échantillons d'acides nucléiques viraux. Les résultats attendus sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats attendus dans le cadre des EILs norovirus

Echantillon	NoV GI	NoV GII	VHA
1	Négatif	Positif	Négatif
2	Positif	Positif	Négatif
3	Positif	Positif	Positif
4	Négatif	Négatif	Positif

En raison d'un problème de stabilité des acides nucléiques seuls les résultats obtenus sur les échantillons 1 et 2 ont été pris en compte.

Les résultats montrent la bonne application de la norme CEN-ISO/TS dans sa totalité (traitement d'échantillons d'huîtres et de tissus digestifs) par huit laboratoires sur dix qui ont correctement détecté la contamination virale. Les laboratoires agréés ont tous obtenus des résultats satisfaisants.

Un essai complémentaire portant uniquement sur le virus de l'hépatite A a été proposé aux laboratoires le 29 novembre 2015. Les laboratoires ont reçus 2 échantillons (Echantillons 1 : présence de VHA et Echantillon 2 : absence de VHA).

Les 10 laboratoires ont tous obtenus des résultats satisfaisants.

□ Expertises, avis, assistance technique

L'assistance technique a principalement concerné le suivi de la performance des laboratoires participant aux essais inter-laboratoires d'aptitude avec les deux méthodes de référence pour le dénombrement des *E. coli* (NF EN ISO 16649-3 - Technique NPP et NF V08-106 - Technique par impédancemétrie).

Le laboratoire a réalisé des audits internes (qualité et technique) de laboratoires agréés pour l'analyse microbiologique des coquillages. Il a également été sollicité par quelques laboratoires sur l'utilisation de la table NPP. Le LNR a apporté son appui pour interpréter quelques courbes d'impédancemétrie.

Le laboratoire a aussi apporté son assistance aux laboratoires dans l'application de la norme XP CEN ISO/TS 15216-2 pour la détection des norovirus et plus particulièrement dans le cadre de la réalisation du plan de surveillance norovirus dans les huîtres mises sur le marché organisé par la DGAI.

4.3 14^{ème} workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union européenne

Le laboratoire a organisé le 14^{ème} workshop des LNRs microbiologie des coquillages (20-22 mai), réunissant 37 personnes représentant 26 pays.



Les thématiques habituelles ont été abordées :

- contrôles officiels/ Surveillance et classification des zones de production
- les vibrions marins
- les virus (norovirus, VHA)

Le laboratoire a présenté les résultats de différents travaux :

- Détection des *E. coli* dans les oursins
- Persistance des norovirus et leur implication dans des TIAC
- Développement d'une technique NPP miniaturisée couplée à la PCR pour la quantification des *Vibrio parahaemolyticus* totaux et enteropathogènes dans les coquillages.

Ce workshop a permis également d'organiser une visite du laboratoire ainsi qu'une dégustation d'huîtres !

Le 15^{ème} workshop se déroulera du 25 au 27 mai 2016 à Berlin.

4.4 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015

La journée Santé Environnement et Microbiologie a été organisée sur le centre de Nantes et a rassemblé 125 personnes, dont des représentants de l'administration centrale (DGAI et INVS), de l'administration locale (ARS, DDTM, DDPP, CIRE) des agences de l'eau, des professionnels (CRC) et des laboratoires agréés.

Au-delà des thèmes récurrents (bilan des activités du LNR et des essais d'aptitude, point sur la réglementation et la normalisation), un point sur la surveillance 2014 (Ifremer et DGAI) a été fait.

Différents exposés ont ensuite été réalisés par le LSEM ou des partenaires du laboratoire :

- La salubrité microbiologique des coquillages : une longue histoire (Ifremer)
- Shellfish production in land-based systems: how to manage shellfish quality (LNR Netherland)
- Etude de la contamination des oursins par *E. coli* (Ifremer)
- Rôle des pratiques d'affinage en claire pour la qualité microbiologique des coquillages. (Ifremer)
- Exemple d'une TIAC à coquillage dans un EHPAD, aspect épidémiologique et environnemental (INVS-Cire Pays de la Loire, Ifremer)
- Les Toxi-Infections Alimentaires en Pays de la Loire - Rôle de la Cellule de Veille et Alerte (ARS des Pays de la Loire)
- Bilan des TIAC à norovirus en lien avec la consommation de coquillages entre janvier 2012 et septembre 2014 (INVS Cire Pays de la Loire)

4.5 Assistance à l'administration

En tant que Laboratoire National de Référence, le laboratoire a assisté à différentes réunions:

- Le 29 janvier copil surveillance dans les locaux de la DGAI,
- Le 12 mars Entretien sur la traçabilité des coquillages, Brigade nationale d'enquêtes vétérinaires et phytosanitaires : Mmes C. Armangaud et MC. Boucher
- Le 17 mars Présentation « Etude VHA baie de Paimpol et suite(s) » / Maisons Alfort.
- les 10 avril et 16 octobre pour la mise en place des plans de surveillance et plans de contrôle (dans les locaux de la DGAI),
- le 5 mai journée de la référence, dans les locaux de l'Anses,
- le 9 novembre collège de la référence au ministère de l'agriculture.

La commission européenne met en place une étude au niveau européen sur la prévalence de norovirus dans les huîtres au niveau des zones de production et des centres d'expédition. Le LNR a assisté la DGAI lors des premières discussions techniques pour la définition de cette étude (avis sur les documents techniques, participation à des réunions techniques). Cet appui doit se poursuivre en 2016.

4.6 Normalisation

Le laboratoire est membre de la Commission Afnor V08B et de ses groupes de travail, ainsi que ceux du CEN :

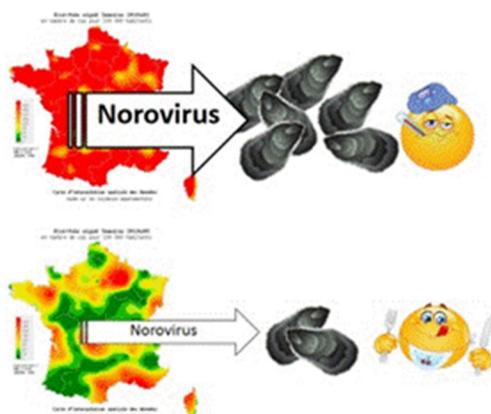
- GT « Statistiques - Incertitudes de mesure » et GT « Validation » sur les questions statistiques relatives aux normes CEN et ISO et la révision de la norme EN ISO16140 validation des méthodes d'analyse ;
- GT « *Vibrio* » : pour préparer les propositions françaises concernant les normes ISO pour la recherche des *Vibrio spp*, potentiellement entéropathogènes ;
- CEN/TC 275 WG 6 TAG3 "Utilisation de la PCR en microbiologie" : projet de norme sur la recherche des *Vibrio parahaemolyticus* totaux et potentiellement pathogènes dans les aliments (techniques de numération et de détection par hybridation ou par PCR temps réel) et projet d'une nouvelle norme ISO/TS 21872 Recherche des *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* dans les aliments ;
- CEN/TC 275 WG 6 TAG4 "Les virus dans les aliments".

4.7 Analyses officielles

❑ Toxi-infections alimentaires collectives

Les toxi-infections alimentaires collectives (Tiac) déclarées et liées à la consommation de coquillages, rapportées à l'Ifremer à la date du 31 décembre 2015 sont de 23 foyers en France pour 281 cas connus sur 1010 exposés. Ce nombre de foyers, peu élevé, est lié prioritairement à la faible ampleur de l'épidémie hivernale de gastro-entérite aiguë d'origine virale dans la population.

Sur ces 23 Tiac, quatre n'ont pas fait l'objet d'analyse sur les coquillages suspectés et trois sont en cours d'investigations. Concernant les 15 foyers clôturés, nous avons reçus 27 échantillons, dont 26 lots d'huîtres et un de moules. Les analyses ont concerné 26 recherches de NoV uniquement sur des échantillons d'huîtres (15 positives, 11 négatives). La seule recherche de *Vibrio parahaemolyticus* demandé sur un échantillon de moule s'est révélée négative. Ces 23 foyers ont fait l'objet de 20 saisines de la DGAI et de l'émission de 17 rapports d'essais.



Selon l'ampleur de l'épidémie hivernale de gastro-entérites dans la population, le nombre et/ou le niveau de contamination des zones littorales par les norovirus sera plus ou moins élevé.

Source cartes : réseau Sentinelles. INSERM/UPMC.

Figure 2 : Incidence de l'intensité de l'épidémie de GEA sur la contamination des coquillages par norovirus

❑ Notifications RASFF

Une notification RASFF en provenance de l'Italie suite à un contrôle positif en NoV a été émise en septembre sur des huîtres originaires de la zone Agon Nord (Manche), mais sans analyse demandée.

❑ Alerte sur les dysfonctionnements des structures d'assainissement d'eaux usées en période d'épidémie hivernale GEA

Une alerte d'un dysfonctionnement sur un réseau d'eaux usées sur l'étang de Leucate en juin. Sur saisine nous avons reçu trois échantillons (deux lots d'huîtres et un de palourdes), qui se sont révélés négatifs en norovirus.

□ Analyse plan de surveillance

La DGAI a réalisé un plan de surveillance norovirus dans les huîtres mises sur le marché. 612 échantillons d'huîtres ont été prélevés sur l'ensemble de la France. Sur ces échantillons les laboratoires agréés réalisaient la recherche des norovirus des génogroupes I et II ainsi que le dénombrement des *E. coli*. Lorsque des norovirus étaient détectés les laboratoires envoyaient au LNR les acides nucléiques extraits ainsi que les tissus digestifs de ces échantillons correspondants afin que le LSEM réalise la quantification. Pour 6,6 % des lots d'huîtres analysés un résultat positif en norovirus a été trouvé. Les analyses de quantification sont en cours.

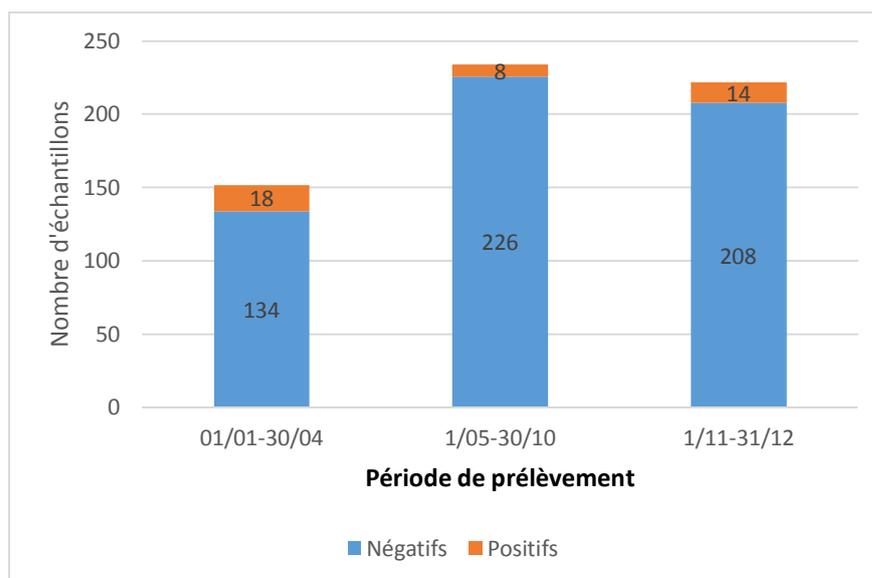


Figure 3 : Résultats de la recherche des norovirus dans les huîtres en fonction de la période de prélèvement.

4.8 Participation aux essais du LR-UE et PHE

Le LSEM a participé à différents essais inter-laboratoires européens au cours de l'année 2015. Ces essais sont organisés par le laboratoire référence de l'union européenne (CEFAS) ou par PHE (Public Health England).

□ *E. coli* et *Salmonella*

Pour le dénombrement des *E. coli* et la recherche des *Salmonella*, le laboratoire a participé à deux essais sur lenticules organisés par le PHE pour le dénombrement et à un essai sur coquillages entiers organisé par le LRUE – CEFAS. Les résultats sont présentés sur les Tableaux 4 et 5.

Tableau 4: Résultats obtenus par le LSEM aux EILs organisés par le PHE, sur lenticules

	Méthode d'analyses	Essais	
		Mars	Juillet
Dénombrement <i>E. coli</i>	NF V 08-106	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant
Recherche <i>Salmonella</i> spp.	NF EN 6579	Score = 2/2 - Satisfaisant	Score = 2/2 - Satisfaisant

Tableau 5 : Résultats obtenus par le LSEM aux EILs organisés par le CEFAS, sur coquillages

	Méthode d'analyses	Echantillon	
		N° 1 (Moules)	N° 2 (Huîtres)
Dénombrement <i>E. coli</i>	NF V 08-106	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 09/12 - Discutable
	ISO 16649-3	Score = 09/12 - Discutable	Score = 12/12 - Satisfaisant

□ Norovirus

Un EIL concernant la recherche qualitative et quantitative de norovirus et virus de l'hépatite A a été organisé par le Cefas sur des lenticules Nos résultats sur les deux lenticules sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Résultats de l'EILs européens norovirus et virus de l'hépatite A

	Echantillon	virus	+/-	Conc cARN	Valeurs de référence du Cefas (6échantillons)
Juillet 2015	Lenticule 1*	NoV GI	-		
		NoV GII	-		
		VHA	-		
	Lenticule 2*	NoV GI	+	3,5 x 10 ³	2,03 x 10 ² - 3,76 x 10 ²
		NoV GII	+	1,9 x 10 ³	2,53 x 10 ² - 6,59 x 10 ²
		VHA	+	9,8 x 10 ³	9,45 x 10 ² - 2,70 x 10 ³

* Pour les lenticules la concentration est exprimée par lenticule

Vibrio

Concernant les EILA *Vibrio* spp. organisés par le PHE, le laboratoire a participé à deux essais comportant chacun deux échantillons (lenticules) par distribution (Tableau 7).

Tableau 7 : Résultats des EILA *Vibrio* spp. organisés par PHE

	Mars V043		Novembre V045	
	V0126	V0127	V0130	V0131
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant
<i>Vibrio cholerae</i>	Résultat correct faible valeur reportée	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant
<i>Vibrio vulnificus</i>	Satisfaisant	Satisfaisant	Résultat correct faible valeur reportée	Satisfaisant

4.9 Diffusion de l'information à l'administration et/ou aux laboratoires agréés

Liste des documents diffusés à l'administration :

- Rapport d'activités LNR 2014 et relevé des dépenses (Convention LNR – DGA1 2014)
- Rapports des essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella* sur des échantillons d'huîtres du 17 mars 2015 et sur des échantillons de moules du 6 octobre 2015.
- Rapport de l'essai d'aptitude norovirus et VHA sur des huîtres du 14 septembre 2015
- Rapport de l'essai d'aptitude complémentaire VHA du 30 novembre 2015
- Compte rendu et résolutions du workshop des LNR (20 au 22 mai 2015, Ifremer, Nantes)
- Synthèse de la journée santé environnement et microbiologie (22 septembre 2015)

4.10 Validation européenne de méthodes d'analyse

□ CEN virus

La validation des méthodes ISO/TS 15216-1 et -2 étant terminée le document a été évalué par les différents pays. Le laboratoire a participé à la relecture de la version française (et validation de la traduction) et a transmis à l'AFNOR et l'ISO les commentaires sur les points techniques. Une dernière réunion permettant de prendre en compte les commentaires des différents pays est prévue en février 2016 avant publication finale de la norme.

□ CEN *Vibrio*

Dans le cadre de l'action *CEN Vibrio* (Mandat M/381), le LSEM a participé à la validation et à la révision de la méthode horizontale pour la recherche des *Vibrio* spp. potentiellement entéropathogènes, *i.e.* *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus* (ISO/DTS 21872). A l'issue de ces révisions, le LSEM a participé à un essai inter-laboratoires organisé par le LR-UE/CEFAS (13 et 11 laboratoires européens participants, respectivement ; 9 pays) à partir de broyats de crevettes cuites congelées-décongelées contaminés par *V. parahaemolyticus* (*Vp*), *V. cholerae* (*Vc*) et/ou *V. vulnificus* (*Vv*) (deux niveaux de contamination par *Vv* et *Vc* et un niveau de contamination par *Vp* – n=32). Les trois *Vibrio* spp. étaient identifiés par test biochimique, PCR conventionnelle et/ou PCR en temps réel. Les résultats obtenus pour cet essai sont globalement satisfaisants pour les matrices fortement contaminées alors qu'une variabilité importante a été observée pour les échantillons faiblement contaminés, les plus faibles sensibilités étant observées pour *V. vulnificus*. L'identification de *V. cholerae* et du gène *trh* chez *V. parahaemolyticus* par PCR en temps réel n'étant pas fiable, ces PCR n'ont pas été retenues dans la méthode horizontale. L'ensemble de ces résultats figurent en annexe de l'ISO DIS 21872 (enquête DIS en cours, finalisation de la norme prévue en juin 2017, AFNOR/V08B).

4.11 Développement de méthode

La digitale PCR (dPCR) est une nouvelle méthode alternative à la PCR en temps réel (rRT-PCR) qui permet la quantification d'acides nucléiques sans comparaison avec une gamme standard. Son principe repose sur le partitionnement de l'échantillon dans les micro-puits d'une puce. Le but est

d'individualiser les cibles pour qu'après amplification en point final, les puits contenant une cible puisse être dénombrés et le nombre de copies déterminé via la loi de Poisson. L'adaptation des rRT-PCR utilisées au laboratoire pour la détection et la quantification des norovirus vers la dPCR a fait l'objet de différents essais, en particulier sur les types de marquage de sonde afin de maximiser la discrimination de fluorescence entre les puits négatifs et positifs (cf figure 4).

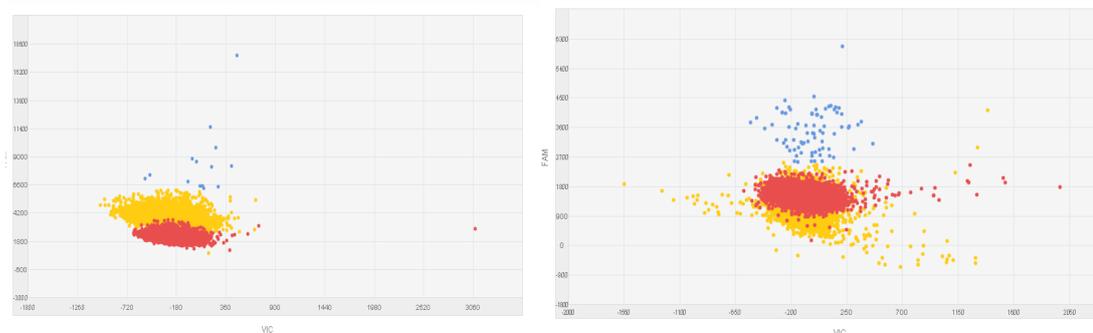


Figure 4 : graphique de discrimination entre les fluorescences des puits négatifs (ROX en jaune) et positifs (FAM en bleu). Le résultat d'une puce ne contenant que de l'eau, témoin négatif (en rouge), a été superposé pour aider à la validation des deux nuages positif et négatif.

Le résultat de ces tests nous a conduits à privilégier le marquage FAM/ZEN pour la réalisation de nos dPCR.

5. Projets

5.1 CAPVIRO

L'essentiel des travaux dans le cadre de ce projet avait pour but d'améliorer les capacités d'adsorption des membranes par des mucines, glycoprotéines reconnues spécifiquement par les norovirus (NoV). Le dépôt de mucines sur les membranes a été optimisé sur des membranes adaptées aux protéines (nitrocellulose, PVDF). Une augmentation de l'adsorption sur les membranes recouvertes de mucines (50% par rapport au témoin) a été observée mais le protocole développé nécessite d'être amélioré car les résultats sont difficilement reproductibles.

Par ailleurs, les capacités d'adsorption des membranes sont augmentées, jusqu'à 40 fois, sur des échantillons dilués par rapport aux échantillons non dilués. Les capacités d'adsorption ont été confirmées sur les eaux d'entrée de quatre stations d'épuration et sur l'eau de mer contaminée artificiellement, montrant une bonne reproductibilité et une limite de détection de l'ordre de 2 à 3 Log₁₀. Les différents types de membranes ont des rendements d'adsorption allant de 0,16 à 1,18% après 24h d'exposition.

La capture a été élargie aux sapovirus, entérovirus et rotavirus, ainsi qu'aux bactéries telles que *Vibrio* et bactéroïdales.

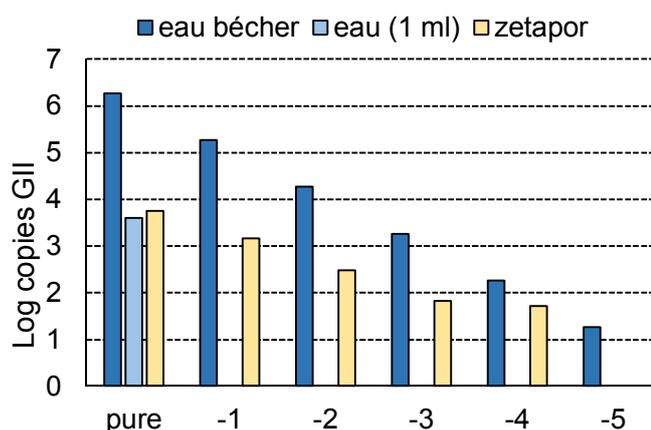


Figure 5 : Quantités de génome de NoV GII détectées sur la membrane Zetapor exposée à de l'eau us e.

5.2 NOROCOQAURAY

Ce projet piloté par le CRC Bretagne Sud et l'Ifremer a débuté en octobre 2012 et s'est achevé par la remise du rapport en avril 2015. L'objectif était d'explorer l'impact de la rénovation d'une station de traitement des eaux usées sur la contamination virales des coquillages des zones conchylicoles en aval de la station. En effet, à la fin la première moitié de l'étude le système de traitement des eaux brutes de type lagunaire a été remplacé par un système membranaire. Les analyses des prélèvements d'eaux de la station ont montré une nette amélioration de la qualité microbiologique des eaux traitées par l'installation du système d'ultrafiltration membranaire (cf figure 6).

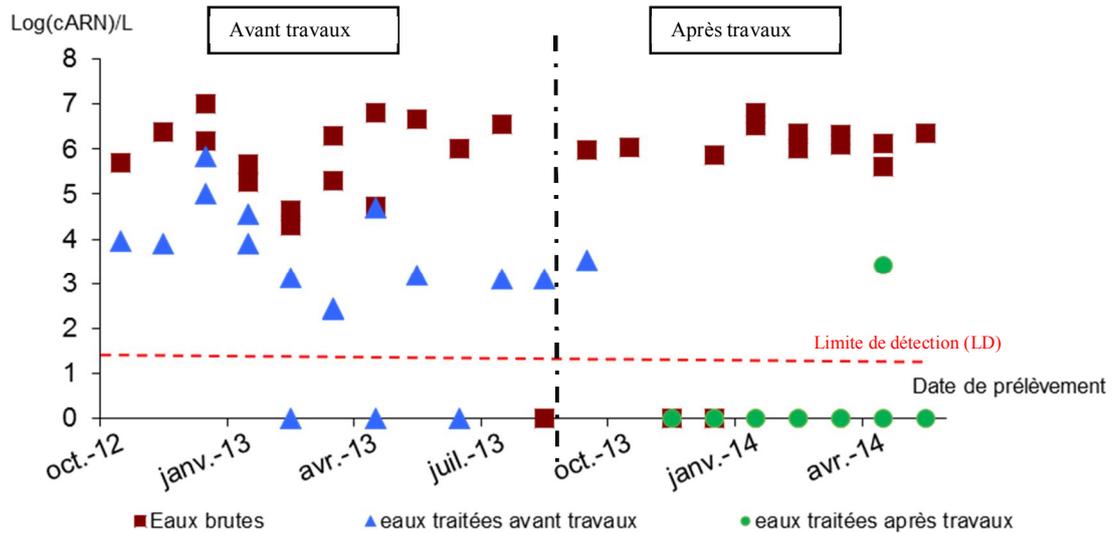


Figure 6: concentrations en NoV dans les eaux brutes et traitées (les valeurs inférieures à la limite de détection de la méthode sont représentées à « 0 »).

L'analyse des coquillages (6 points de prélèvement) a montré une contamination par les norovirus durant la période hivernale pendant les deux années du suivi, confirmant la présence d'apports autre que la station d'épuration. Des rivières du bassin versant (6 points de prélèvement) ont également été échantillonnées, mais les difficultés d'analyse ne permettent pas de mettre en relation la présence des norovirus dans ces rivières et dans les coquillages situés en aval.

Cette étude montre que malgré la diminution des concentrations en virus dans les rejets de la station d'épuration, pour améliorer la qualité microbiologique des coquillages des zones de production, la totalité des apports du bassin versant doit être considérée.

5.3 COMPARE

Compare (COllaborative Management Platform for detection and Analyses of (Re-) emerging and foodborne outbreaks in Europe) est un projet H2020 financé par l'Union Européenne réunissant un consortium de 23 partenaires. Ce projet a pour ambition d'accélérer la détection et la prise de décision face aux épidémies chez l'homme et l'animal grâce à l'utilisation des nouvelles techniques de séquençage (cf figure 7). A terme une plateforme en ligne de bio-informatique permettra de traiter les données de séquençage par rapport aux mêmes références et de générer des bases de données.

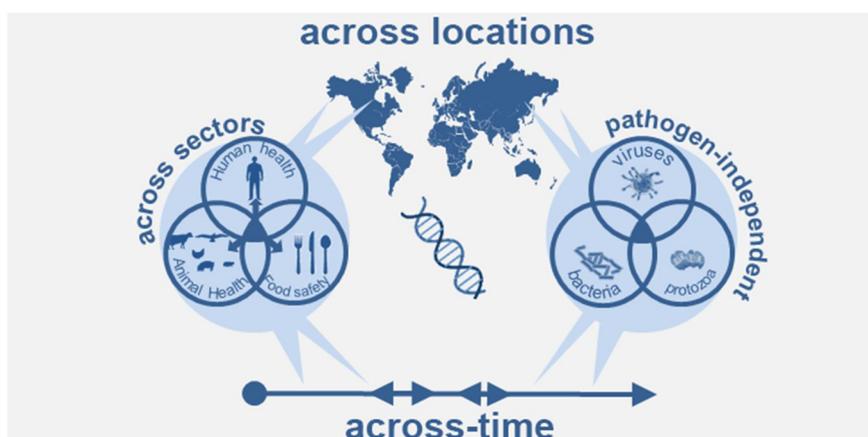


Figure 7 : représentation de l'information génétique commune aux différents agents pathogènes à travers les lieux, les secteurs et le temps.

Au travers de ce projet les nouvelles techniques de séquençages NGS sont développées. A ce titre le laboratoire a participé à deux essais inter-laboratoires sur des souches de norovirus et d'*Escherichia Coli* pour comparer les aptitudes de chaque laboratoire à produire des séquences. L'expertise du laboratoire intervient au niveau de l'analyse d'échantillons environnementaux (huîtres et effluent de station d'épuration) dont les protocoles sont en cours d'élaboration.

5.4 DEPVIRO

Cette étude a pour objectif de répondre à deux questions soulevées lors des opérations de décontamination des huîtres et moules contaminées par des norovirus (NoV) : existe-t-il un risque de contamination croisée ? Combien de temps le virus persiste dans les moules ?

Après contamination par balnéation de lots d'huîtres et de moules avec des selles humaines, ces coquillages ont été rincés puis placés dans un bac en présence de coquillages non contaminés.

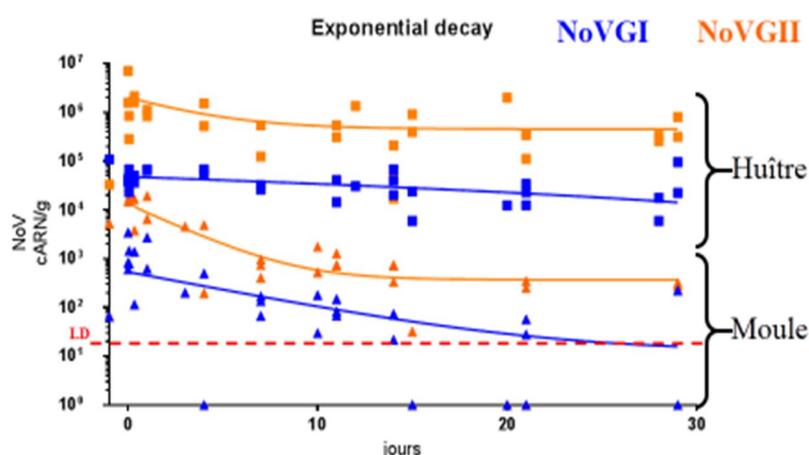


Figure 8: Persistance des NoV GI et GII dans les tissus digestifs de moules et d'huîtres.

Cette étude confirme l'inefficacité de la purification en circuit fermé, pour éliminer les NoV des tissus digestifs, même en présence d'un traitement de l'eau aux ultra-violets. Les résultats obtenus dans les huîtres confirment ceux observés lors d'un travail de thèse avec une $\frac{1}{2}$ vie supérieure à 8 jours. Dans les moules, la persistance est plus brève quelle que soit la souche de NoV. Cette étude démontre par ailleurs la possible contamination croisée en NoV, entre deux lots de coquillages immergés à proximité dans un même bassin de traitement en circuit fermé.

5.5 NOVPROTOYS

Basé sur l'observation de ligands spécifiques pour les norovirus dans les tissus d'huître, ce projet se propose de les rompre pour favoriser la purification. Ces ligands sont des glycannes qui peuvent être détruits par des protéases ou des agents chimiques tels que le périodate de sodium. Les premiers mois ont été dédiés à la sélection de divers composés d'origine naturelle (papaine, amylase, trypsine...) ou chimique et à la mise au point d'un système d'essai en micro-plaque, utilisant des tissus d'huître contaminées par balnéation en présence de selles humaines positives en norovirus. Les premiers essais ont permis la sélection de trois composés, présentant des résultats prometteurs.

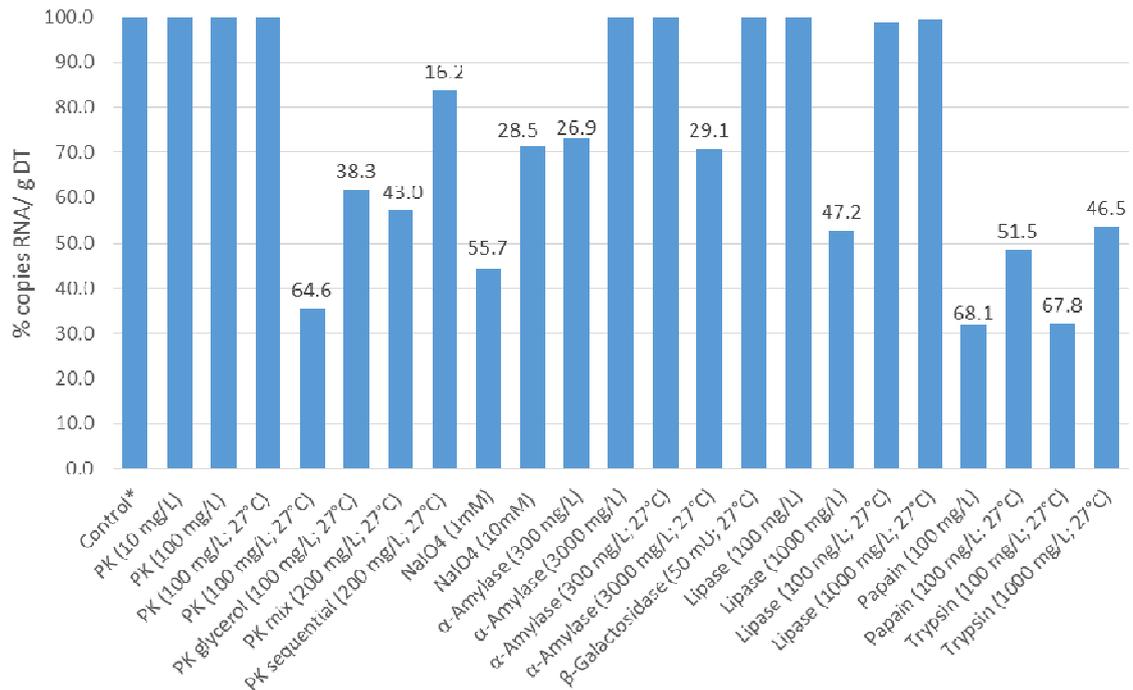


Figure 9 : Effet des différents composés sur les tissus contaminés dans le système en microplaque. Les valeurs indiquées sur les histogrammes représentent le % de réduction du nombre de copies de génome/g de tissus.

5.6 QUIPROCO

L'objectif général de ce projet, réalisé en partenariat avec l'université de Reims et le LER Normandie, vise à comprendre le rôle du milieu marin, et en particulier des coquillages, sur la sélection des souches de virus ou de protozoaires humains ou animaux. Le projet s'est déroulé de janvier 2014 à décembre 2015. La première année du projet a permis l'optimisation du protocole de détection des parasites (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* et *Toxoplasma gondii*) dans les coquillages ainsi que l'étude de la bioaccumulation des virus humains (norovirus et rotavirus) et parasites (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum* et *Toxoplasma gondii*) dans les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*), huîtres plates (*Ostrea edulis*) et moules (*Mytilus edulis*). La deuxième année était consacrée à l'étude environnementale dont l'objectif était d'évaluer la contamination d'échantillons d'huîtres et de moules collectés dans des zones de production par les différents pathogènes (virus et parasites). Les prélèvements ont été réalisés mensuellement pendant 12 mois sur des zones de production en exploitation sur trois sites de production de moules et sur trois sites de production d'huîtres.

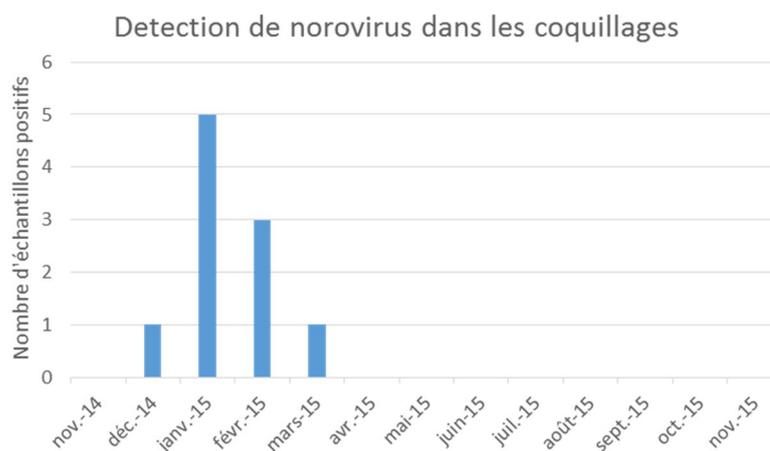


Figure 10: Détection des norovirus dans les coquillages.

Ce travail a également permis d'obtenir les premières données de contamination des coquillages par les trois parasites au niveau de zones d'élevage classées B, soumises à des apports d'origine agricole et humaine. Pour *Toxoplasma gondii*, des contaminations ont été observées dans un échantillon d'huître et moule, tandis que les deux autres parasites (*Giardia intestinalis*, *Cryptosporidium parvum*) n'ont pas été détectés dans les coquillages.

Concernant les norovirus humains (GI, GII, GIV), les contaminations sont observées principalement pendant les mois d'hivers et printemps, conséquence de la circulation hivernale de ce virus dans la population.

5.7 RISKMANCHE

RiskManche, projet inter-régional à l'échelle européenne (Interreg IVA : France–Angleterre ; 2012-2015) s'est achevé cette année. Sur les sites en France, l'identification des sources de contamination fécale et la prévalence de bactéries entériques et marines et celle de norovirus ont été évaluées chaque mois de février 2013 à janvier 2015 au niveau des coquillages de trois zones conchylicoles (une située en Bretagne et deux en Normandie) et/ou au niveau des eaux des bassins versants. Les activités réalisées en 2015 ont consisté en la réalisation des derniers prélèvements et analyses microbiologiques et en la caractérisation des souches bactériennes isolées.

La recherche des marqueurs *Bacteroidales* associés à l'hôte a montré une contamination généralement mixte au niveau des rivières des différents bassins versants avec, par exemple, la détection du marqueur Humain (HF183), Ruminants (Rum2Bac) et Porc (Pig2Bac) respectivement dans 37 %, 74% et 29 % des eaux analysées sur le site breton (n=120).

Si les salmonelles et les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes (*E. coli* producteurs de Shiga-toxines, STEC et *E. coli* entéropathogènes, EPEC) ont été rarement isolés dans les coquillages, des *Campylobacter* spp. ont été isolés dans plus de 25 % des coquillages et 59 % des échantillons d'eaux des bassins versants, avec une majorité de *C. jejuni* et *C. coli* dans les eaux de rivière et de *C. lari* dans les coquillages. Une présence de ces bactéries entériques variable en fonction de différents paramètres a été mise en évidence (Figure 11).

Les norovirus, quant à eux, ont été détectés dans 19 % des 184 lots de coquillages analysés, principalement en période hivernale, correspondant au rejet par la population de ces virus. Enfin, des bactéries marines tels que les *Vibrio parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae* ont été détectées dans les coquillages et les eaux de mer, lorsque la température de l'eau dépassait 15 °C, sur les trois sites, soit principalement en période estivale.

Ce projet a permis d'obtenir une meilleure compréhension des mécanismes de contamination des coquillages et des éléments pour mieux apprécier le risque lié à la présence de microorganismes

potentiellement pathogènes pour l'Homme dans l'environnement. Il a permis également d'obtenir une collection de souches environnementales de salmonelles, de *Campylobacter*, *E. coli* pathogènes et *Vibrio* potentiellement pathogènes pour l'Homme.

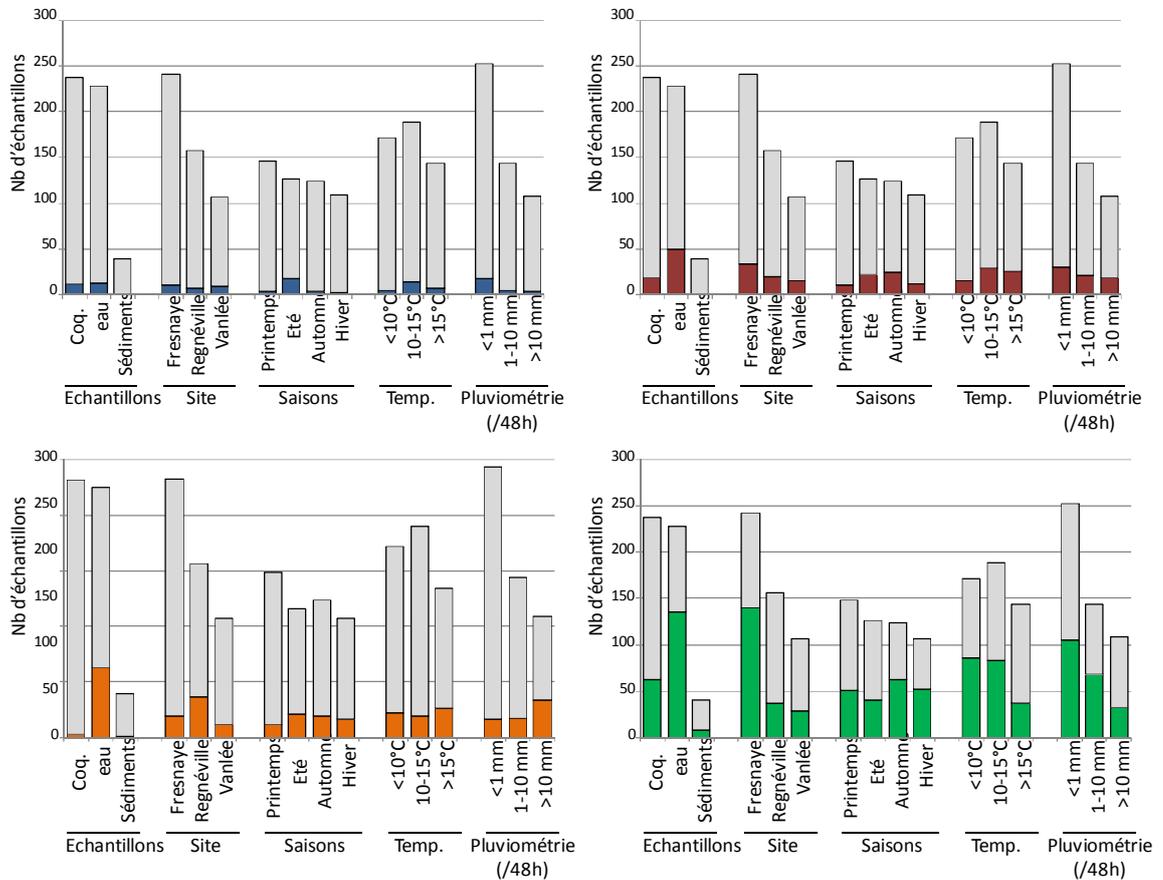


Figure 11 : Répartition des échantillons comportant au moins une bactérie entérique isolée en fonction du type d'échantillon analysé, du site étudié, de la saison, de la température et de la pluviométrie. Les résultats obtenus lors de la recherche des STEC sont en bleu, des EPEC en marron, des *Salmonella* en orange et des *Campylobacter* en vert.

5.8 BACPATH

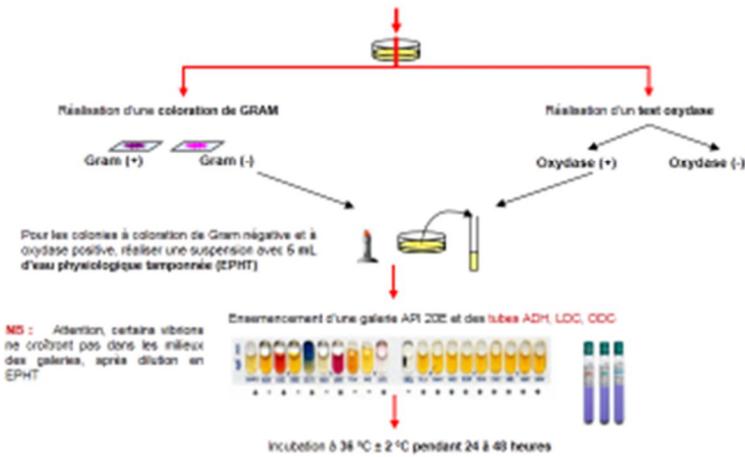
Dans le cadre d'une thèse (Charlotte Balière ; co-financement Ifremer / Agence de l'Eau Loire-Bretagne ; 2012-2015), des souches pathogènes de *Escherichia coli* (*E. coli* producteurs de Shiga-toxines, STEC ; possédant le gène *stx* et des *E. coli* entéropathogènes, EPEC ; possédant le gène *eae*) ont été caractérisés. Ces souches ont été isolées à partir de coquillages, d'eaux et de sédiments issus des sites breton et normand sélectionnés dans le projet RiskManche présenté ci-dessus. Cette caractérisation avait pour but d'évaluer le pouvoir pathogène de ces souches environnementales. Pour cela, 75 gènes de virulence ont été recherchés par PCR haut débit (système *Fluidigm*, laboratoire de sécurité alimentaire de l'ANSES, plateforme Identypath, Maisons-Alfort). Ces gènes ont été sélectionnés en fonction de leur rôle dans la virulence chez *E. coli* et leur disposition à être responsables de pathologies graves chez l'Homme et les animaux. En parallèle, les variants des gènes *stx* et *eae* ont été caractérisés par PCR classique et par séquençage.

Sur un total de 28 souches STEC et 75 souches EPEC, 17 profils de virulence avec de 2 à 47 gènes détectés ont été identifiés pour les souches STEC (figure 12) et 56 profils de virulence avec

Analyse des vibriens halophiles

Jour n°4

● **Identification :** Pour chaque souche isolée précédemment, réaliser à partir d'une colonie isolée sur la gélose nutritive saumée une coloration de Gram et un test oxydase



Jour n°5

Lecture de la galerie API 20E et des tests ADH, LDC, ODC

Réaliser un test d'halophilie en cas de suspicion de *Vibrio cholerae* → Suite

Identification biochimique

NB : En cas de présence de l'espèce *V. cholerae* :

- Expédier les souches à Ifremer (Brest) pour confirmation moléculaire d'identification et recherche éventuelle de pathogènes (test d'agglutination sérogroupes O1 et O139 et recherche de gènes par PCR) >>> expédier les souches identifiées *V. cholerae* O1/O139 au CNRVC (Institut Pasteur, Paris)

- En cas de présence des espèces *V. parahaemolyticus* et *V. vulnificus* :

-- Expédier les souches à Ifremer (Brest) pour confirmation moléculaire d'identification et recherche éventuelle de pathogènes (recherche de gènes par PCR)

Ifremer

Procédure technique de dénombrement de *Vibrio* spp. et de recherche d'espèces de *Vibrio* dans les eaux marines et estuariennes

Figure 13 : Identification biochimique de *Vibrio* spp. (procédure consolidée - H-P77-2015-04212-FR - Avril 2015).

6. Coordination REMI

Le LSEM assure, via la coordination nationale du REMI, le pilotage du projet « surveillance microbiologique ». Le projet inclut les actions liées aux conventions DGAL pour la mise en œuvre du REMI et la réalisation d'études de zones. Dans le cadre du REMI, 389 lieux de prélèvement ont été suivis en 2015. 3901 résultats ont été obtenus dont 242 dans le cadre d'alertes, suite à des épisodes de contamination avérés ou suspectés. Le nombre de résultats en légère diminution, s'explique principalement par un nombre d'alertes moindre en 2015.

Par ailleurs, une convention a été établie avec la DGAL pour la réalisation de 12 études sanitaires sur la période 2015-2017. Ces études basées sur (i) l'identification et l'évaluation des flux contaminants et (ii) une campagne d'échantillonnage permettront le classement sanitaire de nouveaux secteurs conchylicoles ou l'optimisation de la stratégie d'échantillonnage REMI sur des zones de production déjà classées.

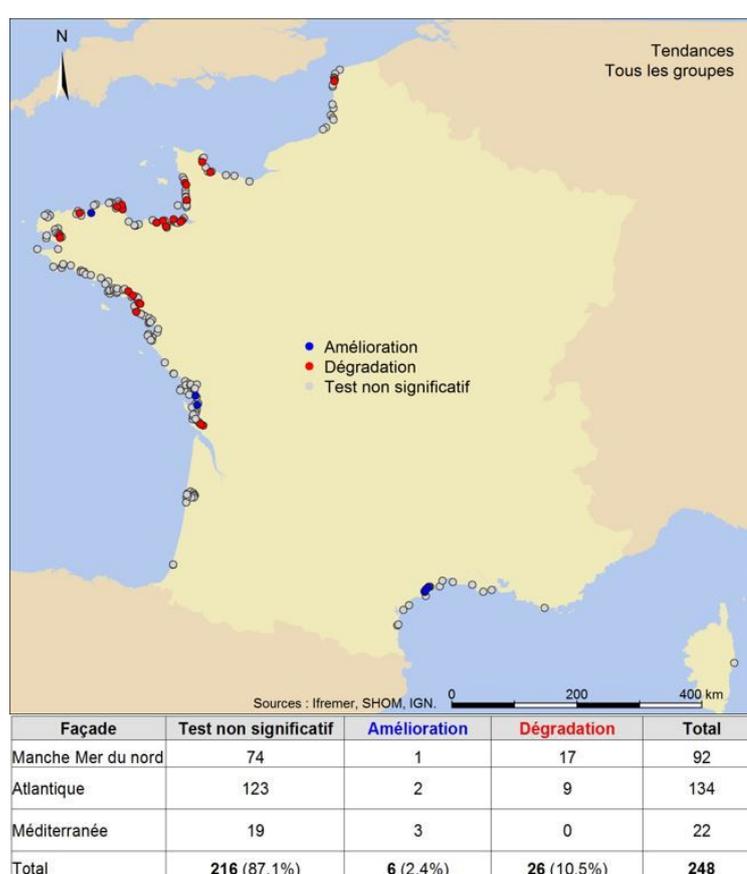


Figure 14 : tendances des niveaux de contamination en *Escherichia coli* dans les coquillages – REMI, période 2004-2013.

7. Activités analytiques en sous-traitance

Au total 484 échantillons de coquillages ont été analysés (dénombrement des *E. coli*) à la demande du Laboratoire Environnement Ressources (LER/MPL) de l'Ifremer Nantes dans le cadre du contrôle de la contamination microbiologique des 34 zones de production conchylicoles (Loire -Atlantique et Nord Vendée) et d'études réalisées par le laboratoire.

8. Conclusion et perspectives 2016

L'année 2015 aura été riche en évènement concernant la microbiologie, avec la réception des divers Laboratoires Nationaux de Référence Européen mais surtout en décembre l'organisation d'une journée scientifique (plus de 100 participants) présentant les divers résultats du projet européen Riskmanche. Les données obtenues lors de cette année permettent d'espérer une année 2016 riche en résultats scientifiques avec la poursuite du projet H2020 Compare qui entre dans sa seconde année.

D'autres projets vont se mettre en place comme Bactrac portant sur les traceurs de sources microbiennes, sujet important pour nos diverses activités recherche mais également dans le développement des études de zone (coordination REMI). En collaboration avec un laboratoire de l'université de Liège (Belgique), différentes approches vont être évaluées pour estimer le pouvoir infectieux des norovirus. Sur cette même thématique, une étude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres va permettre d'obtenir des données importantes pour la mise en place de la future réglementation.

L'appui du LSEM *via* la coordination REMI va se poursuivre pour l'évolution de ce réseau de surveillance, et les pistes pour évoluer vers un observatoire/état de vigilance des pathogènes humains ou animaux vont être développées.

ANNEXES

Production scientifique et technique

Revue à comité de lecture

Balière Charlotte, Rince Alain, Blanco Jorge, Dahbi Ghizlane, Harel Josee, Vogeeler Philippe, Giard Jean-Christophe, Mariani-Kurkdjian Patricia, Gourmelon Michèle (2015). Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in shellfish-harvesting areas and their watersheds. *Frontiers in Microbiology*, 6(1356), 1-15.

Balière Charlotte, Rince Alain, Thevenot Delphine, Gourmelon Michèle (2015). Successful detection of pathogenic Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish, environmental waters and sediment using the ISO/TS-13136 method. *Letters in Applied Microbiology*, 60(4), 315-20.

Chatel Amélie, Faucet-Marquis Virginie, Gourlay-France Catherine, Pfohl-Leszkowicz Annie, Vincent-Hubert Françoise (2015). Genotoxicity and activation of cellular defenses in transplanted zebra mussels *Dreissena polymorpha* along the Seine river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 114, 241-249.

Drouaz Najoua, Schaeffer Julien, Farkas Tibor, Le Pendu Jacques, Le Guyader Soizick (2015). Tulane virus as a potential surrogate to mimic Norovirus behavior in oysters. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(15), 5249-5256.

Esteves Kevin, Hervio-Heath Dominique, Mosser Thomas, Rodier Claire, Tournoud Marie-George, Jumas-Bilak Estelle, Colwell Rita R., Monfort Patrick (2015). Rapid proliferation of *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* and *Vibrio cholerae* during freshwater flash floods in French Mediterranean coastal lagoons. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(21), 7600-7609.

Esteves Kevin, Mosser Thomas, Aujoulat Fabien, Hervio-Heath Dominique, Monfort Patrick, Jumas-Bilak Estelle (2015). Highly diverse recombining populations of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* in French Mediterranean coastal lagoons. *Frontiers in Microbiology*, 6. Loury P., Le Guyader Soizick, Le Saux Jean-Claude, Ambert-Balay K., Parrot P., Hubert B. (2015). A norovirus oyster-related outbreak in a nursing home in France, January 2012. *Epidemiology and Infection*, 143(12), 2486-2493.

Marques Souza Doris Sobral, Miura Takayuki, Le Mennec Cecile, Monte Barardi Celia Regina, Le Guyader Françoise S. (2015). Retention of Rotavirus infectivity in mussels heated by using the French recipe moules marinières. *Journal of Food Protection*, 78(11), 2064-2069.

Michel Cecile, Vincent Hubert Françoise (2015). DNA oxidation and DNA repair in gills of zebra mussels exposed to cadmium and benzo(a)pyrene. *Ecotoxicology*, 24(9), 2009-2016.

Guillois Yvonnick, Abravanel Florence, Miura Takayuki, Pavo Nicole, Vaillan Veronique, Lhomme Sebastien, Le Guyader Soizick, Rose Nicolas, Le Saux Jean-Claude, King Lisa, Izopet Jacques, Couturie Elisabeth. High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clinical and Infectious Diseases*

Ouvrages – Chapitre d’ouvrage :

Bellon Fontaine Marie-Noëlle, Dulas Alice, Garry Pascal, Hermon Christophe (2015). Hygiène. Guide pratique pour la réalisation d'essais d'adhésion microbienne. ACTIA.

Thèses

Drouaz Najoua (2015). Norovirus et coquillages : approches pour l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux. Thèse de Doctorat de l'Université de Nantes-Angers-Le Mans.

Rapports scientifiques et techniques

Garry Pascal (2015). Essais d'aptitude - Programme Coquillages vivants - Bilan pluriannuel (période mars 2012 à octobre 2014) : Dénombrement des *Escherichia coli* - Recherche de *Salmonella* spp.

Garry Pascal (2015). Synthèse de la journée microbiologie sanitaire 2014.

Garry Pascal, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cedric (2015). Rapport d'essai d'aptitude - Programme Coquillages vivants - Essai du 17 mars 2015 : dénombrement des *Escherichia coli* dans les huîtres.

Garry Pascal, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cedric (2015). Rapport d'essai d'aptitude - Programme Coquillages vivants - Essai du 17 mars 2015 : recherche des *Salmonella* spp. dans les huîtres.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2015). Rapport d'activités 2014 Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie - Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages.

Ollivier Joanna, Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2015). Rapport d'essai d'aptitude - Essai du 14 Septembre 2015 : Recherche des norovirus et VHA dans les coquillages.

Le Saux Jean-Claude, Le Mennec Cecile, Parnaudeau Sylvain, Le Guyader Soizick (2015). Pré-étude sur la purification des norovirus des mollusques bivalves.

Treguier Cathy, Schaeffer Julien, Le Saux Jean-Claude, Cochenec-Laureau Nathalie, Le Guyader Soizick (2015). Contamination des coquillages par les norovirus en rivière d'Auray (Norocoqauray).

Rapports de stages

Gilbert Solenne Détection des norovirus par les mucines, Rapport de stage de Licence pro, université de Nantes 37 pages

Imbert Mathilde Identification de *Vibrio* spp. Isolés de l'environnement littoral Rapport de stage Licence Université de Bretagne Sud 14 pages

Keomurdjian Natacha Caractérisation et expression de la virulence chez *Vibrio parahaemolyticus* Rapport de stage Master 2 Recherche Université de Poitiers 34 pages

Le Comte Cyrielle Recherche d'un marqueur de contamination fécale spécifique de la volaille. Rapport de stage Master 1 Université de Rouen

Communications dans des colloques et congrès

Debray Noélie, Piquet Jean-Côme (2015). Etudes de zones prévues en vue du classement sanitaire. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015, Nantes.

Balière Charlotte, Gourmelon Michèle (2015). Prevalence and characterization of STEC in shellfish-harvesting areas and their upstream catchments during a two-year study in France. VTEC 2015 Satellite Symposia - Food Safety from Farm and Field to Plate. Sept. 13th 2015, Boston, USA.

Garry Pascal (2015). Actualités en surveillance LNR Microbiologie des coquillages. Copil - Comité de Pilotage Surveillance Sanitaire des Coquillages de la DGAl, 29 janvier 2015, Paris.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2015). Mollusques et virus : origine et maîtrise des contaminations. SILLIKER - 4èmes Rencontres Scientifiques, 5 février 2015, Paris, France.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2015). Shellfish Microbioly quality: from *Escherichia coli* to norovirus? BSFM 2015, Belgian Society for Food Microbiology, Twentieth Conference on Food Microbiology. 8 and 9 October 2015, Brussels, Belgium.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2015). Virus entériques et coquillages : Qu'en est-il? Journées scientifiques 2015, Adilva, 18-19 novembre 2015, St Malo, France

Gourmelon Michèle, Balière Charlotte, Caprais Marie-Paule, Cozien Joëlle, Hervio Heath Dominique, Hubert Céline, Le Saux Jean-Claude, Lozach Solen, Quénot Emmanuelle, Le Guyader Soizick, Parnaudeau Sylvain, Strubbia Sofia, Garry Pascal, Véron Antoine, Cheve Julien, Jarde Emilie, Harpet Cyrille, Legeas Michèle, Bruey Quentin, Baliere Clemence, Giard Jean-Christophe, Rince Isabelle, Harrault Loic, Jeanneau Laurent, Petitjean Patrick, Rince Alain (2015). RiskManche - Action 2.3 Hazard evaluation - Occurrence of bacteria and enteric viruses potentially pathogenic for humans and detection of Microbial Source Tracking markers in environmental waters and shellfish from Brittany, France. INTERREG RiskManche, Knowledge Exchange Event/Echange de connaissances. 17th, 18th February 2015. Portsmouth, England.

Gourmelon Michèle, Balière Charlotte, Quénot Emmanuelle, Cozien Joëlle, Hubert Céline, Lozach Solen, Caprais Marie-Paule, Hervio Heath Dominique, Le Saux Jean-Claude, Parnaudeau Sylvain, Strubbia Sofia, Le Guyader Soizick, Jarde E., Balière Cl., Bruey Q., Giard J. C., Rince I., Le Hello S., Rince A. (2015). Occurence of bacterial and viral enteric pathogens and marine bacteria and discrimination of faecal sources in shellfish-harvesting areas and their catchment in France. ICMSS 2015 - 10th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 15-20 March 2015, Puerto Varas, Chile.

Gourmelon Michèle, Harrault Loic, Quénot Emmanuelle, Jeanneau Laurent, Lozach Solen, Petitjean Patrice, Marin Charlotte, Hubert Celine, Jarde Emilie (2015). Chemical and microbial MST tools: discrimination of fecal sources in shellfishharvesting or bathing areas and their catchments in France. SETAC Europe 25th Annual Meeting, 3-7 May 2015, Barcelona.

Gourmelon Michele, Balière Charlotte, Caprais Marie-Paule, Cozien Joëlle, Garry Pascal, Hervio Heath Dominique, Hubert Céline, Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick, Lozach Solen, Parnaudeau Sylvain, Quenot Emmanuelle, Strubia S., Véron Antoine, Balière Cl., Bruey Q., Giard J-C, Rince I., Jarde E., Harrault L., Jeanneau L., Petitjean P., Cheve Julien, Rince Alain (2015). Recherche de bactéries potentiellement pathogènes et de norovirus dans de zones conchylicoles de Bretagne et Normandie et leurs bassins versants. Identification des sources de contamination fécale. QSPA 2015 - Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques, 17, 18-19 Juin 2015, Boulogne-sur-Mer.

Gourmelon Michèle, Balière Charlotte, Quénot Emmanuelle, Cozien Joëlle, Lozach Solen, Caprais Marie-Paule, Hervio Heath Dominique, Le Saux Jean-Claude, Parnaudeau Sylvain, Le Guyader Soizick, Balière Clémence, Bruyey Quentin, Giard Jean-Christophe, Rince Isabelle, Jarde Emilie, Le Hello S., Rince Alain (2015). Discrimination of faecal sources and occurrence of bacterial and viral enteric pathogens and marine bacteria in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. Water Micro2015 - 18th International Symposium on Health-Related Water Microbiology. September 13th-19th 2015 - Lisbon, Portugal.

Hervio Heath Dominique, Gourmelon Michèle, Quénot Emmanuelle, Véron Antoine, Richard David, Caprais Marie-Paule (2015). A miniaturized MPN real-time PCR method for rapid quantification of total and enteropathogenic *Vibrio parahaemolyticus* in shellfish. ICMSS 2015 - 10th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 15-20 March 2015, Puerto Varas Chile.

Hervio Heath Dominique, Caprais Marie-Paule, Cozien Joëlle, Derrien Annick, Gourmelon Michèle, Le Mennec Cécile, Le Saux Jean-Claude, Lozach Solen, Quénot Emmanuelle, Tall Amadou, Touron-Bodilis A., Véron Antoine, Balière Clemence, Rince Alain (2015). *Vibrio* spp. in French coastal areas. 2nd Conference on bathing and shellfish water quality, 03 December 2015, Ifremer, Brest, France.

Le Guyader Soizick (2015). Les norovirus : de l'homme à la mer! Conférence à l'Université de Laval. 4 mars 2015, Québec, Canada. *Communication sur invitation*

Le Guyader Soizick (2015). Prevalence and levels of norovirus in shellfish in Europe: data are still rare! IAFP 2015 - Symposium Virus in seafood, IAFP annual meeting, 15-28 juillet 2015, Portland, USA. *Communication sur invitation*

Le Guyader Soizick (2015). Norovirus: from human to oysters. Conference Expo Milano 2015, 18 September 2015, Milano, Italia. *Communication sur invitation*

Le Guyader Soizick (2015). Shellfish contamination by norovirus: influence of ligand expression. 2nd Conference on bathing and shellfish water quality, 03 December 2015, Ifremer, Brest, France.

Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick (2015). Analyses officielles - Bilan 2014. COPIL Surveillance DGAL, 29 janvier 2015, Paris.

Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick (2015). Virus entériques humains et coquillages. ASTEE 2015, Journée scientifique et technique ASTEE, Echanges sur l'actualité des micropolluants dans l'eau petit détour par les virus dans le milieu marin, 25 juin 2015, Avranches, France.

Le Saux Jean-Claude, Ollivier Joanna, Le Guyader Soizick (2015). La baie de Paimpol et le VHA. ANSES - Groupe de travail "Evaluation des risques biologiques dans les aliments", Maison Alfort, France.

Penny Chritian, Gourmelon Michele, Cozien Joelle, Hubert Celine, Rince Alain, Baliere Charlotte, Ragimbeau C., Gauchie H. M. (2015). Occurrence of *Campylobacter* spp. in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. CHRO 2015, 1-5 November 2015, Rotorua, New Zealand.

Piquet Jean-Côme, Bouchoucha Marc, Chavanon Fabienne, Garry Pascal (2015). *E. coli* contamination in sea urchins. 14th workshop of microbiological NRLs for bivalve molluscs. 20-22 May 2015, Nantes.

Piquet Jean-Côme (2015). SANICLAIRE Affinage en claire et qualité microbiologique des

coquillages. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015, Nantes.

Piquet Jean-Côme (2015). La salubrité microbiologique des coquillages : une longue histoire. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015, Nantes.

Piquet Jean-Côme, Debray Noëlie (2015). Bilan REMI 2014. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2015, Nantes.

Présentations par affiche

Balière Charlotte, Balière Cl., Bruéy Q., Blanco J., Mariani-Kurkdjian P., Thevenot-Sergent D., Rince A., Gourmelon Michèle (2015). Occurrence of potentially pathogenic *Escherichia coli* (EPEC/STEC) in shellfish-harvesting areas and their catchments in France. Meeting RISKMANCHE, Knowledge Exchange Event/Echange de connaissances. Portsmouth, England - 17th, 18th February 2015.

Balière Charlotte, Balière Cl., Courroux C., Mariani-Kurkdjian P., Thevenot D., Fach P., Delannoy S., Blanco J., Dahbi G., Rince A., Gourmelon Michèle (2015). Evaluation of the presence of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* in shellfish and French coastal areas. VTEC 2015 Satellite Symposia - Food Safety from Farm and Field to Plate, Sept. 13th 2015, Boston, USA.

Drouaz Najoua, Le Mennec Cécile, Farkas Tibor, Le Pendu Jacques, Le Guyader Soizick (2015). Tulane virus: a surrogate to study norovirus behavior in oysters. ICMSS 2015 - 10th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 15-20 March 2015, Puerto Varas Chile.

Garry Pascal (2015). Contamination microbiologique des coquillages. QSPA 2015 - Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques, 17, 18-19 Juin 2015, Boulogne-sur-Mer.

Hervio Heath Dominique, Quénot Emmanuelle, Véron Antoine, Garry Pascal, Caprais Marie-Paule, Copin S., Guillier L. (2015). Comparaison de méthodes analytiques pour le dénombrement de *Vibrio parahaemolyticus* totaux et entéropathogènes dans les coquillages. QSPA 2015 - Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques, 17, 18-19 Juin 2015, Boulogne-sur-Mer.

Hervio Heath Dominique, Tall Amadou, Cozien Joëlle, Lozach Solen, Antajan Elvire, Delesmont Régis, Touron-Bodilis Aurélie (2015). Ecologie de *Vibrio spp.* en Manche-Mer du Nord : Abondance et diversité dans des conditions environnementales contrastées. VIIème colloque de l'Association Francophone d'Ecologie Microbienne - AFEM. 3-6 novembre 2015, Anglet, France.

Miura Takayuki, Schaeffer Julien, Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick (2015). Human rotavirus: through sewage to oysters. DSRNA 2015 - 12th International Double Stranded RNA Virus Symposium, 6-10 October 2015, Goa, India.

Parnaudeau Sylvain, Rumebe Myriam, Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick (2015). Norovirus in oysters implicated in outbreaks and follow up of the production area. ICMSS 2015 - 10th International Conference on Molluscan Shellfish Safety, 15-20 March 2015, Puerto Varas Chile.

Piquet Jean-Côme, Soudant Dominique (2015). *Escherichia coli*, un indicateur des pressions anthropiques sur le littoral. SFM 2015, 11e Congrès de la Société Française de Microbiologie. 23-25 mars 2015, Institut Pasteur, Paris, France.

Schaeffer Julien, Treguier Cathy, Le Saux Jean-Claude, Le Guyader Soizick (2015). La rénovation d'une station d'épuration : quel impact sur la contamination virale des coquillages ? QSPA 2015 Colloque Qualité et Sécurité des Produits Aquatiques, 17, 18-19 Juin 2015, Boulogne-sur-Mer.

Compte-rendus de colloques :

Garry P (2015). Synthèse des journées microbiologie sanitaire 2014.

Garry P (2015). Synthèse de la journée santé environnement et microbiologie 2015.

Mission à l'étranger et groupe de travail

Exposés dans des groupes de travail

Le Saux Jean-Claude « Etude VHA baie de Paimpol et suite(s) » Ces Biorisk ANSES le 17 mars Maisons Alfort.

Participation à la formation

Participation à un jury de thèse ou HDR

Le Guyader Soizick (2015). Jury de la soutenance de thèse d'Allison Vimont. Stratégies innovantes d'inactivation des norovirus : optimisation des paramètres opérationnels et compréhension des mécanismes d'action. Thèse de l'Université de Laval, Sciences et technologie des Aliments, 4 mars 2015, Quebec Canada.

Le Guyader Soizick (2015). Jury de la soutenance de thèse de Félicity A. Brake. Minimising the risk of norovirus contamination in Australian commercial oysters. Thèse de l'Université de Tasmania (Australie), (rapporteur, pas de soutenance orale).

Le Guyader Soizick (2015). Jury de la soutenance d'une HDR de Florence Abranavel. Diversité génétique et physiopathologie des virus des hépatites C et E. Habilitation à diriger les recherches, 28 novembre 2015, Université de Toulouse III.

Le Guyader Soizick (2015). Jury de la soutenance de thèse de Najoua Drouaz. Norovirus et coquillages : approches pour l'évaluation de la persistance et du pouvoir infectieux. Thèse de l'Ecole doctorale Biologie Santé Nantes-Angers, Université de Nantes, soutenance le 26 octobre 2015.

Hervio-Heath Dominique (2015). Jury de la soutenance de thèse de D. Sanhueza. L'effet des conditions environnementales sur la croissance et l'expression génique de *Mycobacterium ulcerans*, l'agent causatif de l'ulcère de Buruli. Ecole doctorale GAIA, Université de Montpellier, 7 Décembre 2015.

Formation donnée

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
Le Guyader Soizick	Université Pierre et Marie Curie, Paris VI	Master 2 MAPES-QUESS, Composantes hygiéniques de la qualité, maîtrise des risques	Virus entériques humains et environnement	2
Le Guyader Soizick	Ministère de l'Agriculture	Séminaire Personnes Ressources produits de la mer de d'eau douce	Norovirus : pathogénécité, analyse et coquillages	4
Le Guyader Soizick	Université François Rabelais, Tours	Master 2 Infectiologie	Contamination virale de l'environnement	2
Le Guyader Soizick	Institut Pasteur, Paris	Master 2 Virologie Fondamentale,	Calicivirus : épidémiologie et rôle de l'environnement	1h30

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
Le Guyader Soizick	Université de Nantes	Master 2, Science de l'Aliment	Les virus dans les produits de la mer : épidémiologie et techniques de détection,	2h
Le Guyader Soizick	Oniris, Nantes	Master 2 MAN-IMAL	Shellfish and human enteric viruses	2
Le Saux Jean-Claude	Faculté de Médecine de Brest	Master.2 ADSN	Toxi-infections alimentaires collectives liées à la consommation de coquillages : Production-Règlementation-Surveillance-Tiac	1h30
Parnaudeau Sylvain	Oniris Nantes	Ingénieurs 3eme année QSE "Biosécurité des aliments"	Contamination virologique des coquillages et de l'aliment	2
Garry Pascal & Ollivier Joanna	Laboratoires agréés DGAI	Responsable labo/Technicien	Mise en application de la norme iso cen 15216-2	15
Gourmelon Michèle	Université Bretagne Occidentale, Brest	Master II Master Biologie et Santé	Contamination microbienne du littoral	3
Gourmelon Michèle	Université Bretagne Occidentale, Brest	Master II Alimentation, Nutrition, Droit, Santé	Contamination microbienne du littoral - Identification des sources de contamination fécale	1h30

Expertise

Jean-Côme Piquet:

EU working group on the Microbiological Monitoring of Bivalve Mollusc Harvesting Areas"

Pascal Garry :

- Commission AFNOR V08B - Microbiologie des aliments
- Comité d'experts spécialisés Biorisk de l'ANSES.
- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages

Dominique Hervio-Heath:

- CEN/TC 275– food analysis, WG 6 – Microbial contamination TAG 15, *Vibrio*.

Soizick Le Guyader:

- ILSI-Europe (International Life Sciences Institute), groupe de travail ‘Microbial food safety task force control options for viruses in food processing expert group’
- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages (depuis 2002-)
- Groupe CEN/TC 275– food analysis - horizontal methods, WG 6 – Microbial contamination TAG 4, Detection of viruses in food.
- EFSA, groupe de travail ‘Scientific and technical assistance on the baseline survey of norovirus in oysters’