

Avril 2017

**Auteurs**

Garry Pascal, Hervio-Heath Dominique et Le Guyader Soizick

**Collaborateurs :**

Cellier Kelly, Desdout Marion, Gourmelon Michèle, Hubert Françoise, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cédric, Le Mennec Cécile, Le Quintrec Estelle, Le Saux Jean Claude, Loiseau Véronique, Lozach Solen, Maillot Jessica, Menanteau Chantal, Ollivier Joanna, Parnaudeau Sylvain, Piquet Jean-Côme, Quenot Emmanuelle, Schaeffer Julien, Vallade Emilie, Véron Antoine

**ifremer**

## Rapport d'activités 2016

**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
<b>3.1 Personnels Ifremer : Cadres – T/A.....</b>	<b>7</b>
<b>3.2 Doctorants.....</b>	<b>8</b>
<b>3.3 Post-doctorants.....</b>	<b>8</b>
<b>3.4 Stagiaires.....</b>	<b>8</b>
<b>3.5 Apprentis en alternance.....</b>	<b>9</b>
<b>3.6 Equipement.....</b>	<b>9</b>
4. ACTIONS LIEES AUX MISSIONS DE LNR.....	10
<b>4.1 Démarche qualité.....</b>	<b>10</b>
<b>4.2 Coordination technique des laboratoires agréés.....</b>	<b>10</b>
<b>4.3 15<sup>ème</sup> workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union européenne.....</b>	<b>12</b>
<b>4.4 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016.....</b>	<b>13</b>
<b>4.5 Assistance à l'administration.....</b>	<b>13</b>
<b>4.6 Normalisation.....</b>	<b>14</b>
<b>4.7 Analyses officielles.....</b>	<b>14</b>
<b>4.8 Participation aux essais du LR-UE et PHE.....</b>	<b>15</b>
<b>4.9 Diffusion de l'information à l'administration et/ou aux laboratoires agréés.....</b>	<b>17</b>
<b>4.10 Etude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres.....</b>	<b>18</b>
<b>4.11 Développement de méthode.....</b>	<b>18</b>
<b>4.12 Suivi de la contamination en NoV d'une zone de production en lien avec des TIACs.....</b>	<b>20</b>
5. PROJETS.....	21
<b>5.1 Projet VIBOBS (A090101E).....</b>	<b>21</b>

5.2 Projet COMPARE (A090102I).....	21
5.3 Projet NOVPROTOYS (A090102H) .....	23
5.4 Virologie - Culture cellulaire et infectiosité virale (A090102).....	24
5.5 Projet IQUINOR (A090102J).....	24
5.6 Bactériologie (A090101).....	25
5.7 BACPATH (A090104).....	27
5.8 BACTRAC (A090104D).....	27
5.9. Projet MERLIN-MICROPLASTIQUES (A501203).....	28
6. COORDINATION REMI.....	28
8. CONCLUSION ET PERSPECTIVES 2017 .....	29
ANNEXES.....	30
<b>Production scientifique et technique .....</b>	<b>30</b>
<b>Participation à la formation .....</b>	<b>34</b>
<b>Expertise.....</b>	<b>35</b>

# 1. Introduction

Ce rapport présente une synthèse des actions, travaux menés par l'équipe, accompagnée par des stagiaires, doctorants, post doctorants qu'il est important de remercier pour leur contribution. Cette année 2016 a de nouveau été une année riche en résultats innovants qui permet à notre équipe d'être reconnue au niveau national et international. En effet la Microbiologie sanitaire, thème de recherche fédérant notre laboratoire, thématique à l'interface de la santé publique, de la qualité des eaux côtières et des coquillages, nous permet de développer nos activités sur le terrain ou sur une approche plus fondamentale. Les résultats obtenus nous permettent d'exercer notre activité de Laboratoire National de Référence, en apportant connaissance scientifique et expertise technique.

## 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 vibrions 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 zone 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 DGAl (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
<i>Téléphone</i>	(33) 2 40 37 40 52	(33) 2 98 22 44 18
<i>Fax</i>	(33) 2 40 37 40 27	(33) 2 98 22 45 94
<i>Messagerie</i>	<a href="mailto:Soizick.Le.Guyader@ifremer.fr">Soizick.Le.Guyader@ifremer.fr</a>	

#### 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	
COZIEN Joëlle	T - 80%	DESDOUIT Marion (depuis juin)	C - 100%
GOURMELON Michèle	C - 100%	GARRY Pascal	C - 100%
HERVIO HEATH Dominique**	C - 100%	HUBERT Françoise	C - 80%
LE SAUX Jean Claude	C - 100%	KAELIN Gaëlle	C - 100%
LOISEAU Véronique	T- 50%	KERGARAVAT Cédric	C - 100%
LOZACH Solen	T - 80%	LE GUYADER Soizick*	C - 100%
QUENOT Emmanuelle	T - 80%	LE MENNEC Cécile	T - 100%
		LE QUINTREC Estelle	T - 50%
		MAILLOT Jessica	T - 80%
		OLLIVIER Joanna	C - 100%
		PARNAUDEAU Sylvain	T - 100%
		PIQUET Jean-Côme	C - 100%
		SCHAEFFER Julien	C - 100%
		VALLADE Emilie	T - 100%
		VERON Antoine	T - 100%

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

### Personnels titulaires d'un contrat à durée déterminée

Nom	Qualification	Durée
DEBRAY Noémie	Cadre	Du 20/07/15 au 19/01/17

### 3.2 Doctorants

Nom Prénom	Début de thèse	Date de soutenance	Sujets	Ecoles Doctorales d'inscription	Encadrements scientifiques
<b>BALIERE Charlotte</b>	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	M. GOURMELON
<b>STRUBBIA Sofia</b>	02/11/16		Norovirus et huître: infectiosité et approche génomique	ED 502 Ecole Doctorale Biologie et Santé Université Nantes Nantes	S. Le GUYADER

### 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.	<b>POLO MONTERO David</b>	S. LE GUYADER

### 3.4 Stagiaires

Début du stage	Fin du stage	Sujet	Nom - Prénom	Catégorie	Ecole	Encadrements scientifiques
03/02/16	05/02/16	Stage découverte professionnelle en entreprise	<b>LOISEAU Vincent</b>	Scolaire	Saint Marie Guilers	J. Cozien
15/02/16	26/02/16	Mise en situation professionnel – Recherche-développement en autres sciences physiques et naturelles	<b>CARRIER Maud</b>	Ingénieur	Agence pôle Emploi St Herblain	S. le Guyader
04/04/16	27/09/16	Norovirus et coquillages : approche génomique.	<b>STRUBBIA Sofia</b>	Master 2	Oniris - Nantes	S. Le Guyader

04/04/16	03/06/16	Détermination des communautés bactériennes dans des eaux et coquillages du littoral.	<b>MAHE Steven</b>	Master 1	Université Rennes 1	M. Gourmelon
23/05/16	15/07/16	Standardisation et validation de la PCR en temps réel pour la recherche de Vibrio Vulnificus et Vibrio Cholerae non-O1/non-O139 dans l'environnement littoral	<b>COLLET Nadia</b>	Licence Biologie L2	UBO	D. Hervio Heath
04/01/16	10/06/16	Recherche de marqueurs de contaminations fécales aviaires applicables à l'environnement et diversité bactérienne présente dans des coquillages en zone littorale	<b>SAID BACAR Mohamed Soiwami</b>	Master 2	UBO	M. Gourmelon
23/05/16	01/07/16	Recherche et persistance de Campylobacter dans l'environnement	<b>OSWALD Maud</b>	BTS Bio-Analyses et contrôle	Lycée Jean Macé Lanester	J. Cozien
01/04/16	09/06/16	comparaison de 3 méthodes de dénombrement d'E. coli dans les coquillages	<b>ROSIEK Thomas</b>	2ème année d'IUT	Laval	P. Garry

### 3.5 Apprentis en alternance

Début du contrat	Fin du contrat	Diplôme	Nom - Prénom	Ecole	Tuteur
03/09/15	31/08/17	BTS Assistante de Manager	<b>CELLIER Kelly</b>	Accipio CCI Nantes - St Nazaire	J. MAILLOT

### 3.6 Equipement

Outre des équipements classiques de microbiologie et biologie moléculaire, le LSEM a fait l'acquisition d'un appareil de fractionnement des acides nucléiques utilisé pour la préparation d'une librairie dans le cadre d'analyses NGS.

## 4. Actions liées aux missions de LNR

### 4.1 Démarche qualité

En vue de demander au Cofrac l'extension d'accréditation à la détection des norovirus (GI et GII) et du virus de l'hépatite A, selon la norme XP CEN ISO/TS 15216-2, le laboratoire a réalisé des essais de validation de la méthode sur des huîtres et des moules pour les 3 virus (étude de la fidélité, justesse, robustesse et définition des limites de détection).

L'audit Cofrac des 24 et 25 octobre 2016 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) et a permis d'obtenir l'extension de l'accréditation à la détection des norovirus (GI et GII) et du virus de l'hépatite A, selon la norme XP CEN ISO/TS 15216-2.

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

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 22 mars 2016 sur la matrice « huître », et le deuxième le 11 octobre 2016 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* (un positif et un négatif 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 2016	33 laboratoires (41 couples laboratoire/méthode)	25 laboratoires (41 couples laboratoire/méthode)
Octobre 2016	34 laboratoires (43 couples laboratoire/méthode)	26 laboratoires (40 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 2016	90,2 % (40 couples)	4,9% (2 couples)	4,9% (2 couples)	97,6%	2,4% (2 couples)
Octobre 2016	91,2% (31 couples)	5,9% (2 couples)	2,9% (1 couple)	100%	0 %



Figure 1 : Contamination des coquillages par bioaccumulation

Les résultats non satisfaisants ou discutables pour le dénombrement des *E. coli* ont été obtenus avec la méthode NF EN ISO 16649-3 et sont dus à des problèmes de fidélité. Un laboratoire a obtenu un résultat non satisfaisant aux deux EILs pour *E. coli*. Une analyse des causes est en cours.

Pour la détection de *Salmonella* un laboratoire n'a pas détecté la présence de *Salmonella* (avec 2 méthodes) en mars, l'analyse des causes a été réalisée et des actions correctives mises en place, le laboratoire a obtenu des résultats satisfaisants en octobre

### *Norovirus*

Le laboratoire a organisé le 12 septembre 2016 un essai inter-laboratoire pour la recherche des norovirus (NoV) et du virus de l'hépatite A dans les coquillages. Les 10 laboratoires participant à cet essai ont reçu deux échantillons d'huîtres creuses (échantillons 1 et 2) et un échantillon de tissus digestifs de d'huîtres creuses (échantillon 3). 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	Présence possible	Détecté	Non détecté
2	Détecté	Détecté	Détecté
3	Non détecté	Non détecté	Non détecté

La contamination en NoV GI de l'échantillon 1 étant faible et hétérogène les résultats obtenus par les laboratoires pour ce virus et cet échantillon n'ont pas été pris en compte pour leur évaluation. Les résultats montrent la bonne application de la norme CEN-ISO/TS 15216-2 (Méthode horizontale pour la recherche du virus de l'hépatite A et des NoV dans les aliments par la technique RT-PCR en temps réel - Partie 2: Méthode de détection qualitative) dans sa totalité par neuf laboratoires sur dix qui ont correctement détecté la contamination virale et interprété les résultats.

Un laboratoire a été jugé discutable en raison du non-respect de l'exigence normative liée à la prise d'essai ( $2 \pm 0,2g$ )

Le Laboratoire a organisé les 3 et 4 octobre 2016 une formation portant sur la norme XP CEN ISO/TS 15216-2. Cette formation a concerné les cinq laboratoires agréés et a été l'occasion de les informer des modalités pratiques du déroulement de l'étude européenne sur la prévalence des NoV dans les huîtres

#### □ 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 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 mise en place et du démarrage l'étude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres

### 4.3 15<sup>ème</sup> workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union européenne

Le laboratoire a participé au 15<sup>ème</sup> workshop des LNRs microbiologie des coquillages (Berlin, 25-27 mai), réunissant 42 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)
- une présentation sur le virus de l'hépatite E a également été faite par le LNR allemand.

Le laboratoire a présenté ses résultats sur les travaux d'optimisation de la PCR digitale pour la quantification des norovirus et son application à des coquillages naturellement contaminés.

Le 16<sup>ème</sup> workshop se déroulera du 3 au 5 mai 2017 à Split, Croatie.

## 4.4 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016

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 2015 (Ifremer et DGAI) a été réalisé.

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

- Présentation du projet EcoAntibio relatif à la résistance bactérienne des *E.coli* isolés de coquillages (*Anses*)
- Présentation du rôle/de la place du laboratoire Européen de référence (*EURL, Cefas UK*)
- Le risque parasitaire (*Université de Reims*)
- Quantification de la contamination par les virus et les parasites protozoaires dans les coquillages (*LSEM Ifremer, Université de Reims*)
- Les *Escherichia coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC et des EPEC (*LSEM, Ifremer*)

## 4.5 Assistance à l'administration

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

- Le 24 mars copil surveillance dans les locaux de la DGAI,
- le 30 mars avril journée de la référence, dans les locaux de l'Anses,
- le 18 novembre collège de la référence au ministère de l'agriculture
- le 18 novembre audition dans le cadre du groupe de travail attribution des sources de l'Anses

Participation du laboratoire en tant qu'expert EFSA à la définition de l'étude européen sur la prévalence de norovirus dans les huîtres au niveau des zones de production et des centres

d'expédition., participation aux réunions et rédaction de différents documents (fiche de prélèvement, de résultats...).

## 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 sur 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 2016 sont de 53 foyers en France pour 268 cas connus sur 790 exposés.

Concernant ces 53 foyers clôturés, nous avons reçus 109 échantillons, dont 95 échantillons d'huîtres, 15 de moules et 2 de palourdes.

Les analyses ont concerné 105 recherches de NoV sur 94 échantillons d'huîtres, 9 de moules et 2 de palourdes. Ces analyses ont conduits à la mise en évidence de NoV dans 41 échantillons, les 64 autres ayant été détecté négatifs selon la méthode utilisée.

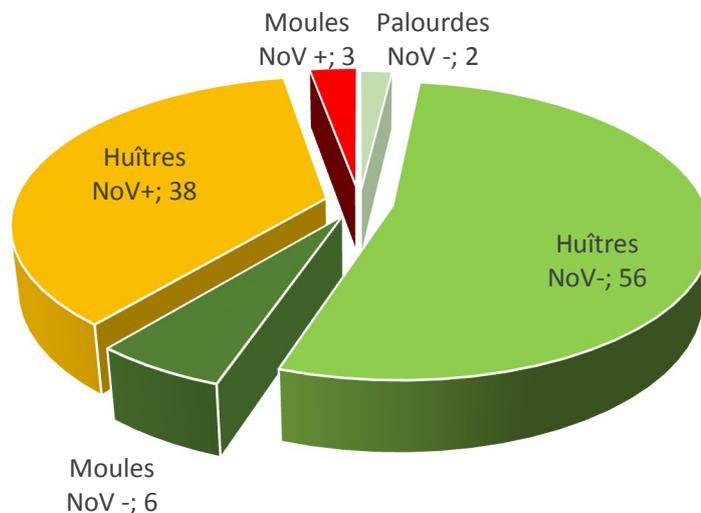


Figure 2 : Résultats de recherches de norovirus de coquillages en lien avec des TIACs

Des recherches de *Vibrio parahaemolyticus* et des gènes de pathogénicité ont été réalisées sur six échantillons de moule et un échantillon d'huîtres. Elles se sont toutes révélées négatives.

Ces 53 foyers ont fait l'objet de 53 saisines de la DGAI et de l'émission de 94 rapports d'essais.

#### ❑ **Notifications RASFF**

Deux notifications RASFF en provenance de suède et du Danemark ont conduit à la recherche de NoV dans deux lots d'huître qui se sont révélées négatives.

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

Aucune alerte de dysfonctionnement sur un réseau d'eaux usées n'a conduit à des analyses.

## 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 2016. 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	
		Février	JUIN
<b>Dénombrement <i>E. coli</i></b>	NF V 08-106	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant
<b>Recherche <i>Salmonella</i> spp.</b>	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 (Huîtres)	N° 2 (Huîtres)	N° 3 (Broyat d'huîtres)
<b>Dénombrement <i>E. coli</i></b>	NF V 08-106	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant
	ISO 16649-3	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant	Score = 12/12 - Satisfaisant
<b>Recherche <i>Salmonella</i> spp.</b>	NF EN 6579	Score = 2/2 - Satisfaisant	Score = 2/2 - Satisfaisant	Score = 2/2 - Satisfaisant

### □ Norovirus

Au cours de l'année 2016, le LSEM a participé à deux essais inter-laboratoire pour la recherche et la quantification des norovirus et du virus de l'hépatite A, organisés par le LRUE (Cefas) : un premier essai sur huîtres et lenticules (PT61) et un deuxième essai sur lenticules (PT65).

Tableau 6 : Résultats obtenus à l'EIL (PT 61) organisé par le LRUE

Echantillon	Virus cible	Détection	Concentration (ARN copies/g de TD)	Valeur de référence du Cefas (ARN copies /g TD ou lenticule)
Huitres 1	NoV GI	DéTECTÉ	$4,0 \times 10^1$	$2,99 \times 10^2$ – $1,75 \times 10^3$
	NoV GII	DéTECTÉ	$2,29 \times 10^3$	$7,17 \times 10^3$ – $8,29 \times 10^3$
	VHA	Non détecté	-	-
Huitres 2	NoV GI	Non détecté	-	-
	NoV GII	Non détecté	-	-
	VHA	Non détecté	-	-
Huitres 3	NoV GI	Non détecté	-	-
	NoV GII	DéTECTÉ	$6,26 \times 10^2$	$6,69 \times 10^2$ – $1,16 \times 10^3$
	VHA	DéTECTÉ	$7,47 \times 10^2$	$7,29 \times 10^2$ – $1,86 \times 10^3$
Huitres 4	NoV GI	DéTECTÉ	$1,13 \times 10^3$	$1,66 \times 10^3$ – $2,17 \times 10^3$
	NoV GII			Non considéré
	VHA	DéTECTÉ	$4,43 \times 10^3$	$4,78 \times 10^3$ – $8,49 \times 10^3$
Lenticule 1	NoV GI	DéTECTÉ	$7,3 \times 10^2$	$2,57 \times 10^3$ – $3,11 \times 10^3$
	NoV GII	DéTECTÉ	$5,44 \times 10^2$	$6,41 \times 10^2$ – $9,41 \times 10^2$
	VHA	DéTECTÉ	$1,72 \times 10^4$	$1,04 \times 10^4$ – $1,61 \times 10^4$
Lenticule 2	NoV GI	Non détecté	-	-
	NoV GII	Non détecté	-	-
	VHA	Non détecté	-	-

Pour les échantillons d'huîtres la performance a été jugée satisfaisante pour les deux méthodes, qualitative et quantitative.

L'essai sur les lenticules a été satisfaisant pour la partie qualitative. Concernant l'aspect quantification les concentrations reportées par le laboratoire sont légèrement inférieures aux valeurs attendues.

Tableau 7 : Résultats obtenus à l'EIL (PT 65) organisé par le LRUE

Echantillon	Virus cible	Détection	Concentration (ARN copies/g de TD)	Valeur de référence du Cefas (ARN copies /g TD ou lenticule)
Lenticule 1	NoV GI	Déecté	1,7x10 <sup>3</sup>	1,6x10 <sup>4</sup> – 2,86x10 <sup>4</sup>
	NoV GII	Non détecté	-	-
	VHA	Non détecté	-	-
Lenticule 2	NoV GI	Non détecté	-	-
	NoV GII	Déecté	1,6x10 <sup>3</sup>	1,72x10 <sup>3</sup> – 2,81x10 <sup>3</sup>
	VHA	Déecté	1,7x10 <sup>5</sup>	3,01x10 <sup>4</sup> – 4,24x10 <sup>4</sup>

La performance de laboratoire a été totalement satisfaisante pour la méthode qualitative et quantitative.

### *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 8).

Tableau 8 : Résultats des EILA *Vibrio* spp. organisés par PHE

Distribution	Mars V046		Novembre V048	
Echantillon	V0132	V0133	V0136	V0137
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant
<i>Vibrio cholerae</i>	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant
<i>Vibrio vulnificus</i>	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant	Satisfaisant

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

Liste des documents diffusés :

- Rapport d'activités LNR 2015 et relevé des dépenses (Convention LNR – DGA1 2015)
- Rapports des essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella* sur des échantillons d'huîtres du 22 mars 2016 et sur des échantillons de moules du 11 octobre 2016.
- Rapport de l'essai d'aptitude norovirus et VHA sur des huîtres du 22 septembre 2016
- Compte rendu et résolutions du 15<sup>ème</sup> workshop des LNR (25 au 27 mai 2015, Berlin)
- Etude sur la prévalence de norovirus dans les huîtres : Protocole pour la réalisation des analyses, la conservation et le transfert des échantillons (octobre 2015) Document à destination des laboratoires agréés impliqués dans l'étude Efsa.
- Fiche de prélèvement et de rendus de résultats pour les échantillons prélevés et analysés dans le cadre de l'étude Efsa (Documents à destination des laboratoires agréés et DDPP impliqués dans l'étude Efsa.)

## 4.10 Etude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres

La commission européenne a mis 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. Dans le cadre de cette étude qui se déroule de novembre 2016 à octobre 2018, le LSEM, dans sa mission de LNR, assiste la DGAI à la fois au niveau technique, organisationnel et analytique.

Dans le cadre de cette l'étude pour la France 241 points de prélèvement ont été sélectionnés (74 zones de production dont 10 claires et 167 centres d'expédition). Les prélèvements sont réalisés tous les deux mois sur chacun des points ce qui représente un total de 2892 échantillons prélevés. Sur chacun des échantillons la recherche des norovirus est réalisée (par le réseau de laboratoires agréés et les norovirus sont quantifiés sur les échantillons positifs par le LSEM Le laboratoire réalisera la validation des résultats et s'assurera de la qualité des données associées aux prélèvements. Le LSEM assura la saisie des résultats et données associée dans la base EFSA.

## 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. Cette technique a été appliquée à des échantillons impliqués dans des épidémies ainsi permettant de quantifier plus précisément les NoV présents (Tableau 9).

Par ailleurs la collaboration avec nos collègues des LERs qui avaient congelés des échantillons suites aux alertes déclenchées dans le cadre de la surveillance du REMI nous a permis de mettre en évidence la présence d'une contamination par les NoV 19 jours avant la collecte des coquillages impliqués dans les cas cliniques, montrant que des épidémies pourraient être évitées (Polo et al., 2016).

Tableau 9 : Caractéristiques des épidémies, échantillons d'huîtres analysés et concentrations en NoV obtenues par dPCR.

Epidémies		Informations épidémiologiques			Echantillons analysés		NoV (RNAC/huître)	
No.	Echantillon	Date de consommation	No malade/ No exposé	Durée des symptômes <sup>a</sup>	[date de prél. – date de conso.]	Lieux de prélèvement	GI	GII
1	3486	23 fev. 2014	7/16	0.5	4	même lot	nd	1.09 x 10 <sup>2</sup>
	3488				7	zone de production	nd	nd
	3489				7	zone de production	nd	2.96 x 10 <sup>2</sup>
2	3498	27 fev 2014	3/4	2	5	zone de production	nd	3.72 x 10 <sup>2</sup>
3	3519	16 Mar. 2014	4/4	1	2	zone de production	nd	2.02 x 10 <sup>2</sup>
	3517				5	zone de production	nd	6.81 x 10 <sup>2</sup>
	3518				2	zone de production	3.80 x 10 <sup>2</sup>	6.15 x 10 <sup>2</sup>
	3531				15	zone de production	1.08 x 10 <sup>3</sup>	nd
	3532				15	zone de production	3.88 x 10 <sup>2</sup>	nd
4	3703	12 Dec. 2014	3/3	pas de données	6	même lot	1.18 x 10 <sup>2</sup>	nd
	3694				- 4	zone de production	nd	1.70 x 10 <sup>2</sup>
5	3704	14 Dec. 2014	2/2	1.5	3	même lot	nd	1.21 x 10 <sup>2</sup>
	3705				3	même lot	2.74 x 10 <sup>2</sup>	44.1
	3695				- 6	zone de production	nd	43.2
	3698				- 6	zone de production	1.18 x 10 <sup>2</sup>	nd
	3700				- 6	zone de production	1.1 x 10 <sup>3</sup>	9.50 x 10 <sup>2</sup>
6	3733	27 Dec. 2014	3/6	0.5	6	même lot	nd	1.26 x 10 <sup>2</sup>
7	3740	09 Jan. 2015	3/4	1.5	3	même lot	9.20 x 10 <sup>2</sup>	nd
	3738				- 3	zone de production	1.17 x 10 <sup>3</sup>	nd
	3739				- 3	zone de production	6.38 x 10 <sup>2</sup>	53.4
8	3816	29 Mar. 2015	16/36	2	3	lot consommé	nd	82.1
	3817				3	même lot	1.85 x 10 <sup>2</sup>	nd
	3791				- 19	zone de production	nd	1.87 x 10 <sup>2</sup>
	3792				- 19	zone de production	8.28 x 10 <sup>2</sup>	nd
	3822				10	zone de production	1.28 x 10 <sup>2</sup>	nd

a : nombre de jours entre la date de consommation et le prélèvement nd: not detected.



## 5. Projets

### 5.1 Projet VIBOBS (A090101E)

Dans le cadre de ce projet, la procédure DRD/P77/VIB (Juin 2007) et la procédure consolidée « Dénombrement de *Vibrio spp.* et recherche d'espèces de *Vibrio spp.* dans les eaux marines et estuariennes par mise en culture à 37°C et identification biochimique » (Réf. H-P77-2015-04212-FR - Avril 2015) ont été appliquées simultanément à l'analyse de 48 échantillons d'eaux de mer prélevés lors de campagnes de surveillance écologique des cinq sites électronucléaires (avril à novembre 2015).

Sur l'ensemble de ces analyses, les volumes d'eau de mer filtrés sélectionnés ont permis de dénombrer les colonies caractéristiques des vibrions sur TCBS. Les teneurs en vibrions totaux (UFC/L) calculées selon les deux procédures (2007 : après identification et confirmation du nombre de colonies comme étant des *Vibrio* ; 2015 : à partir du nombre total de colonies caractéristiques de *Vibrio spp.* sur TCBS) », d'un diamètre supérieur à 1mm) montrent qu'elles sont significativement plus élevées pour l'ensemble des échantillons analysés selon la procédure 2015 ( $p < 0.05$ , Figure 4).

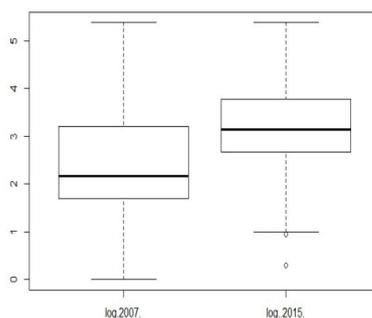


Figure 4 : Box-plots des résultats de dénombrement des *Vibrio spp.* selon les procédures "2007" et "2015".

L'identification moléculaire (PCR) sur un grand nombre de souches a permis de valider le choix de cette méthode pour l'identification de *V. cholerae*, *V. vulnificus* et *V. parahaemolyticus*. En effet, 100% des souches préalablement identifiées *V. cholerae* et *V. parahaemolyticus* et 94% des souches identifiées *V. vulnificus* par les tests biochimiques (% ID > 90%) ont été confirmées à l'espèce par PCR. Il est important de noter que plusieurs souches appartenant à ces trois espèces ont également été identifiées comme telles alors que le pourcentage d'identification était inférieur à 90%.

### 5.2 Projet COMPARE (A090102I)

Dans le cadre de ce projet, les activités réalisées en bactériologie ont consisté à acquérir des données de génomes complets de 19 souches de *Salmonella* Typhimurium et de son variant monophasique isolées précédemment au laboratoire dans l'environnement ainsi que de cinq souches de *E. coli* pathogènes (*E. coli* producteur de Shiga-toxine, STEC ou

*E. coli* entéropathogène, EPEC). Les données acquises ont été déposées dans la base de données européenne (ENA, European Nucleotide Archive).

Les résultats concernant les salmonelles montrent une faible diversité des souches en analysant les données MLST (6 ST19, 11 ST34 et 2 ST99 ; ST, Sequence Type). Le typage des souches sera complété par une approche basée sur les SNP (single-nucleotide polymorphism ; collaboration avec l'ANSES, Maisons-Alfort) et la présence de gènes de virulence et de résistance aux antibiotiques sera également recherchée. Concernant les souches *E. coli* sélectionnées, l'approche WGS a permis de compléter l'identification des gènes de virulence présents dans ces souches, recherchés par la PCR haut débit (système *Fluidigm*) lors de la thèse de Charlotte Balière (Balière *et al.*, 2016).

Les données acquises sur les souches de *Salmonella* seront utilisées pour développer une approche de « Source Attribution » au niveau européen dont l'objectif est de permettre d'identifier l'origine de salmonelles impliquées dans des toxi-infections.

Pour la partie virologie, en partenariat avec Erasmus Medical Center (EMC), des échantillons d'eau usée, de coquillages naturellement ou artificiellement contaminés ont été analysés. L'un des défis pour le séquençage NGS des échantillons environnementaux est de détecter les virus entériques humains présents en très faible abondance par rapport au microbiome global. Des étapes de concentration dans le protocole d'extraction des acides nucléiques, comme la précipitation de PEG (polyéthylène glycol) et une capture NoV lors de la production des bibliothèques ont été testées.

Les résultats indiquent que ces étapes permettent d'obtenir des génomes complets de norovirus et d'en apprécier la diversité. Ce protocole reste cependant à valider sur un plus grand nombre d'échantillons.

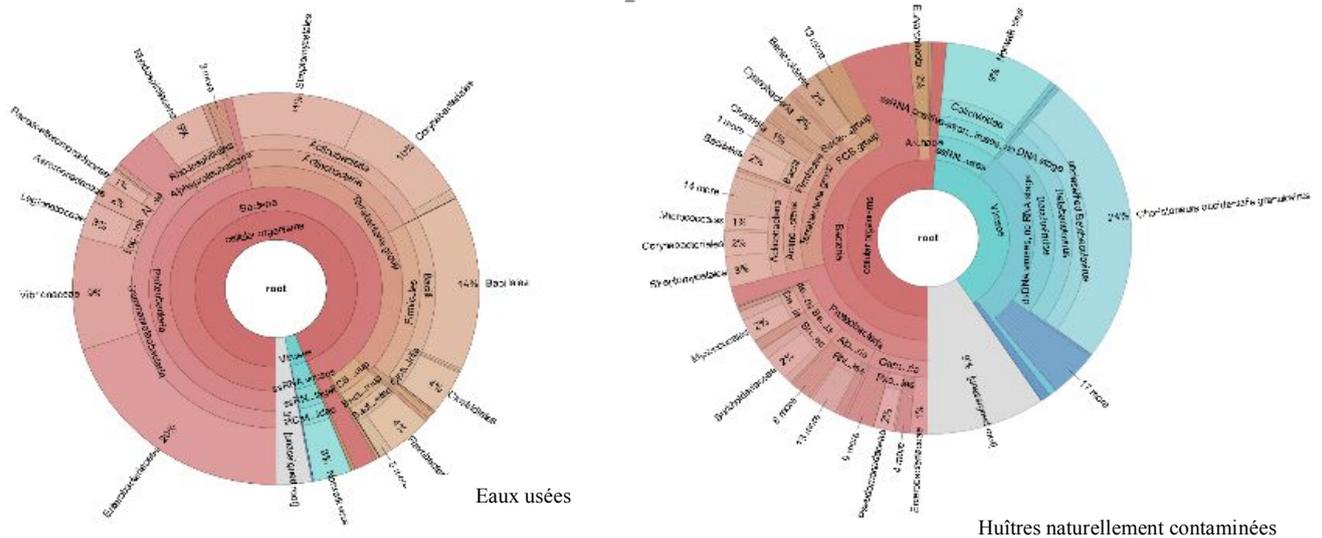


Figure 5 : Représentation de la distribution de la diversité des organismes cellulaires (rose) et des virus (bleu).

### 5.3 Projet NOVPROTOYS (A090102H)

The reduction or elimination of microbial contaminants from oysters via the process of filter feeding can occur in either the natural environment in unpolluted seawater (relaying) or in land based facilities (deuration). The efficiency of deuration for the removal of NoV is questionable. This study was to evaluate the efficacy of deuration in removing NoV from oysters through a review of the literature (Part 1), and to undertake pilot laboratory experiments to investigate a novel deuration approach (Part 2).

The literature review has identified at least 17 published articles which report illness outbreaks of NoV and hepatitis A virus (HAV) from the consumption of oysters that were subjected to deuration. Reported concentrations of NoV in oysters post deuration were between  $10^2$  and  $10^3$  genome copies/g oyster tissue, far in excess of the infectious dose which is estimated to be as low as 10 viral genome copies. On the other hand, relaying has been more successful, with NoV reduced to around the LoD of the test method when oysters are placed in clean open seawater for around 4 weeks, and no illnesses have been reported to be associated with relayed products.

Deuration approaches which include a step to exploit/disrupt the specific linkage between NoV and HBGAs in oysters may enhance the reduction of NoV. As pilot study (Part 2) was undertaken to investigate if such an approach holds promise. The eight different compounds were tested on the basis of their activity against HBGAs, with the hypothesis that the treatment would destroy the ligands and lead to the release of NoV particles inside the oyster tissues during deuration.

Firstly, ten deuration trials were conducted in which oysters contaminated with NoV were dipped in one of the selected compounds and then subjected to deuration; and secondly an *in vitro* approach was used to evaluate compound efficacy, this involved treating the digestive tissue and gills of oysters that had accumulated NoV with different compounds in cell culture plates.

The results of the dipping and *in vitro* experiments showed that two compounds, proteinase K and papain, have promise in further reducing NoV concentrations during deuration (Figure 6).

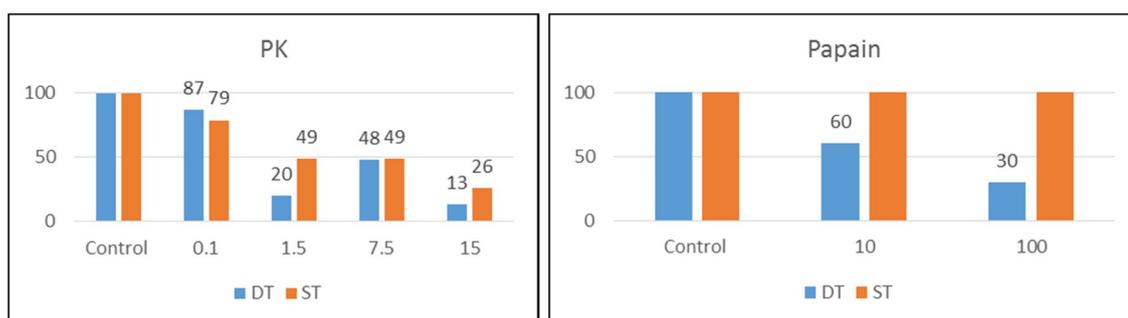


Figure 6 : Comparison of NoV GII.3 levels (detected by an *in vitro* assay) in the digestive tissue (DT) (blue bars) and supernatant (ST) components (orange bars) of oysters treated with PK (proteinase K) and papain. Compound concentrations are expressed in units for PK and mg/L for papain.

The development of the *in vitro* test was valuable and allowed more rapid screening of potentially effective compounds. Further experiments are recommended to confirm the potential of these compounds to enhance deuration, including quantitation to evaluate efficacy of the compounds; test of proteinase K and papain effect on low level

contaminated oysters, optimisation of delivery system of the compounds (e.g. microencapsulation).

## 5.4 Virologie - Culture cellulaire et infectiosité virale (A090102)

La détection des acides nucléiques viraux dans les échantillons d'eaux usées ou de coquillages pose la question du risque infectieux associé à cette présence virale. Pour mesurer ou mettre en évidence le pouvoir infectieux d'un virus, la technique de référence consiste à infecter des cellules en culture. Jusqu'à présent, les norovirus n'étaient pas cultivables dans de tels systèmes. Pour approcher cette question, le virus Tulane, un Calicivirus simien aisément cultivable, a été utilisé. Ce modèle avait préalablement été validé par comparaison de la persistance de ses acides nucléiques à ceux des norovirus dans les tissus d'huîtres (Drouaz et al, 2015). L'étape suivante a été de bioaccumuler ce virus pendant 24h dans des huîtres dans un environnement contrôlé sur la plateforme de Bouin, et d'en mesurer le titre infectieux après extraction entre 24h et 5 semaines après la bioaccumulation. En parallèle, le titre d'acides nucléiques était également mesuré. Cette étude a permis de montrer la persistance du virus Tulane infectieux pendant 2 semaines, et une décroissance plus rapide de l'infectiosité comparée à la concentration en acides nucléiques (Figure 7A) (Polo et al, en préparation). Plus récemment, une nouvelle technique permettant la réplication des norovirus sur des organoïdes intestinaux humains a été mise en évidence par l'équipe de M. Estes (BCM, Texas) (Etteyabi et al, 2016). En collaboration avec cette équipe, nous avons développé la technique au LSEM et déjà pu cultiver deux souches de norovirus à partir d'échantillons de selles (Figure 7B). La mise au point du protocole d'extraction des norovirus, basé sur celui utilisé pour le Tulane, est en cours et permettra prochainement d'évaluer l'infectiosité des norovirus après bioaccumulation.

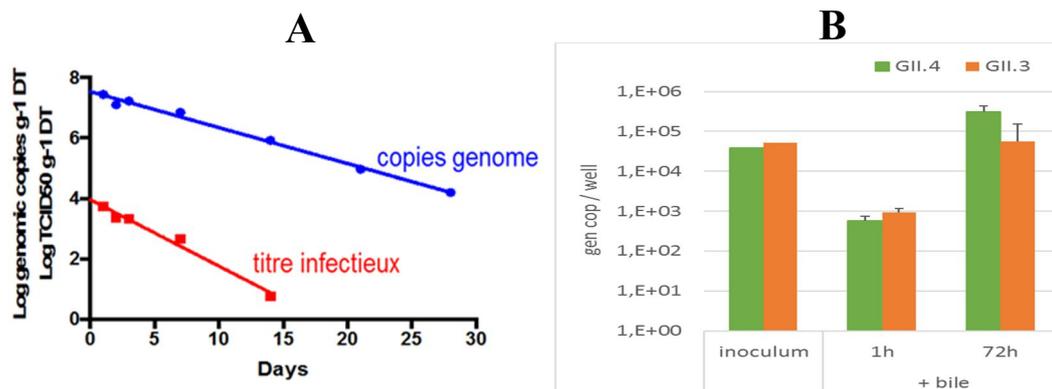


Figure 7 : **A.** Concentration du virus Tulane mesurée en acides nucléiques (bleu) et en virus infectieux (rouge) dans du tissu digestif d'huîtres (temps en jours après bioaccumulation).

**B.** Concentration en acides nucléiques de deux souches de norovirus (GII.4, vert ; GII.3, orange) dans l'inoculum et le milieu de culture de cellules intestinales humaines 1h et 72h après infection.

## 5.5 Projet IQUINOR (A090102J)

La détermination de la dose infectieuse en équivalents génomiques a déjà été expérimentalement déterminée pour le virus de Norwalk (NoV GI.1) sur des volontaires

humains (Atmar *et al.*, 2014). Cependant, les experts ont souligné que les étapes-clés des méthodologies appliquées, sont toujours l'extraction du matériel nucléaire et sa concentration à partir de l'échantillon brut (Gensberger & Kostic, 2013).

De plus, il entre en considération les paramètres tels que l'infectiosité, la pathogénicité des différentes souches et une sensibilité individuelle variable (Frenck *et al.* 2012; Thebault *et al.*, 2013). De ce fait la détermination sur cette unique base d'équivalents génomiques pour la sécurité des aliments pourrait se révéler peu fiable.

Ce projet, menée en collaboration avec l'université de Liège, se propose de développer et de comparer à la 'binding long-range RT-PCR', une méthode alternative sur la base de l'utilisation du PMA associée à la cytométrie de flux et ou la spectrométrie de masse, et de déterminer quels sont les paramètres à prendre en compte pour obtenir une corrélation parfaite entre copies génomiques détectées et particules infectieuses. Ce projet est essentiellement basé sur l'approche mollusques bivalves, matrice alimentaire régulièrement impliquée dans les toxi-infections alimentaires collectives. Le norovirus murin sera utilisé comme modèle avant validation avec les norovirus humains.

Dans ce projet qui a démarré en 2016 le LSEM est impliqué sur la fourniture d'échantillons d'huîtres, dans des zones d'élevage en lien avec des foyers de toxi-infections alimentaires collectives. Le laboratoire procédera également à la bioaccumulation d'huîtres avec du norovirus murin et avec du norovirus humain.

## 5.6 Bactériologie (A090101)

- *Diversité bactérienne en zone côtière : étude des communautés bactériennes et séquençage de génome complet*

Le marqueur le plus utilisé pour évaluer la structure des communautés bactériennes (métabarcoding) dans l'environnement est l'ARNr 16S. Cependant, en raison de la faible résolution taxinomique de cette région pour le genre *Vibrio*, nous avons considéré de nouveaux marqueurs génétiques pour les analyses NGS et dessiné des amorces ciblant les principaux groupes (clades) *Vibrio spp.* et les principales espèces de pathogènes humain et animal. Nous avons sélectionné cinq gènes parmi ceux utilisés pour les analyses MLST permettant d'identifier la diversité des vibrions (Sawabe *et al.* 2007), les gènes sélectionnés devant présenter une bonne couverture taxinomique (nombre d'espèces représentées pour chaque gène candidat) ainsi qu'un nombre assez important de séquences disponibles. Les séquences nucléotidiques ont été traitées par l'algorithme de KASpOD afin de repérer les régions hautement spécifiques au genre *Vibrio* et deux couples d'amorces ont été dessinés et testés pour leur spécificité et sensibilité et utilisés pour une première analyse en métabarcoding sur des mélanges d'ADN de *Vibrio spp* et des eaux de mer naturellement contaminées (plateforme Genotoul, Toulouse). L'analyse des séquences est en cours.

Dans le cadre de l'action Bactériologie, l'analyse des données acquises lors de l'évaluation de la composition des communautés bactériennes dans une sélection de lots de coquillages de la baie de la Fresnaye (Côte d'Armor, Bretagne), prélevés en 2013-2014 (n=61) et d'échantillons d'eaux de mer (n=8) et d'eaux des bassins versants (n=46)

en amont, par séquençage NGS (Next Generation Sequencing) Illumina MiSeq (parties V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S) a été initiée en collaboration avec T. Pitkanen (THL, Finlande).

Les premiers résultats montrent une grande diversité bactérienne dans ces échantillons et une composition variable de ces communautés selon les espèces de coquillages et les eaux analysées avec une faible proportion de bactéries potentiellement d'origine fécale. Les OTU (Operational Taxonomic Unit) les plus fréquemment isolées dans les coquillages et les eaux appartiennent aux Flavobacteriales (Figure 8). Une analyse plus approfondie de ces données sera réalisée pour identifier des séquences d'intérêt pour définir, par exemple, de potentiels marqueurs bactériens de contamination fécale applicables aux coquillages.

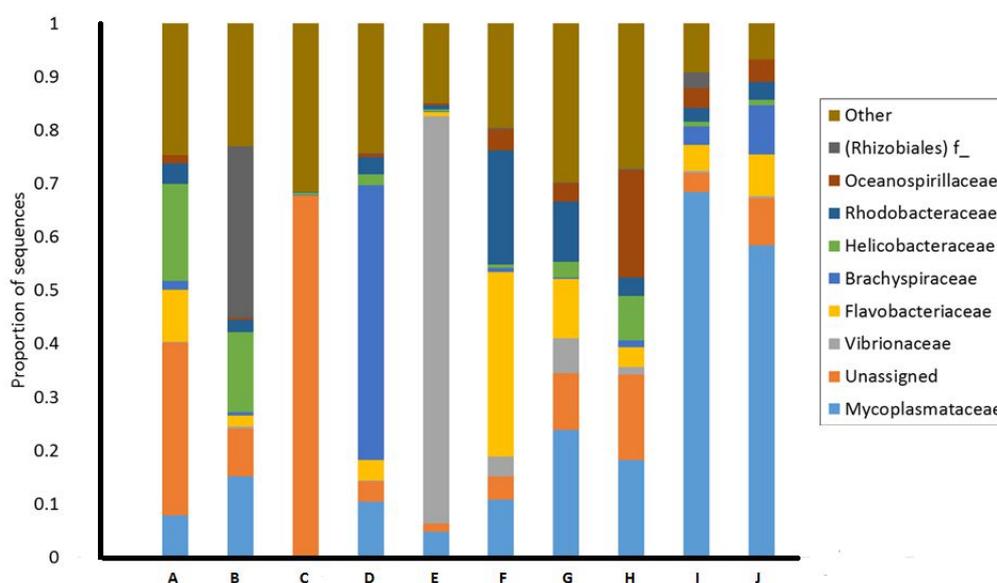


Figure 8 : Proportions relatives des familles bactériennes retrouvées dans une sélection de 10 lots d'huîtres (analyse des liquides intervalvaires), prélevés dans la baie de La Fresnaye (22).

La caractérisation des bactéries entériques potentiellement pathogènes pour l'homme les plus fréquemment isolées dans les coquillages du site d'étude de la baie de La Fresnaye soient les *Campylobacter spp.*, a été poursuivie en analysant les données de séquençage de génome complet (WGS ; Whole Genome Sequencing) d'une sélection de souches de *Campylobacter lari* isolées de ce site en collaboration avec C. Penny (LIST, Luxembourg). L'analyse préliminaire des données (telles que les données MLST ; Multilocus sequence typing) montre une grande diversité des souches présentes dans les coquillages et permet d'émettre l'hypothèse d'une autre source de contamination des coquillages que les eaux de rivières en amont telle que les oiseaux de bord de mer, par exemple. L'analyse sera approfondie pour permettre la comparaison de ces données WGS à celles qui seront acquises à partir de souches isolées chez les oiseaux marins.

## 5.7 BACPATH (A090104)

Cette action s'est terminée par la soutenance de la thèse de Charlotte Balière le 28 janvier sur les *E. coli* potentiellement pathogènes dans l'environnement littoral : cas des STEC, *E. coli* producteur de Shiga-toxine et des EPEC, *E. coli* entéropathogène.

## 5.8 BACTRAC (A090104D)

L'approche Traceur de Source Microbienne ou « Microbial Source Tracking » développée au laboratoire depuis de nombreuses années se poursuit dans le cadre du projet BacTrac, Bactéries fécales, traceurs des sources de contamination dans les eaux qui a débuté en juin 2016 (projet coordonné par le LPL, Laboratoire des Pyrénées et des Landes, avec la participation du laboratoire EPOC, de l'Université de Bordeaux et financé par la Région Adour Garonne, les communautés d'agglomération Sud Pays basque et Côte Basque-Adour et le syndicat intercommunal du bassin d'Arcachon ; 2016-2019).

Dans le cadre de ce projet, différents marqueurs aviaires de PCR en temps réel : marqueur général Oiseaux (GFD ; ciblant la bactérie *Helicobacter*) et marqueurs associés à la volaille (dont principalement, le marqueur LA35 ciblant la bactérie *Brevibacterium* présente essentiellement dans la litière de volaille, source potentielle de contamination de l'environnement par les volailles) ont été testés sur des échantillons fécaux cibles et non cibles collectés sur différents sites en France. Les résultats préliminaires obtenus montrent une sensibilité et une spécificité respectivement de 41,1 % (n=90 échantillons de fientes d'oiseaux et de litières de volaille) et de 98,1 % (n=54 échantillons de fèces humaines, bovines, équines et porcines et d'eaux de stations d'épuration) pour le marqueur GFD et une sensibilité et une spécificité respectivement de 83,1 % sur les échantillons de litière de volaille (n=31) et de 100 % (n=80 échantillons de fèces humaines, bovines, équines, porcines et oiseaux autres que la volaille et d'échantillons d'eaux de stations d'épuration) pour le marqueur LA35 (Tableau 10). Le développement de marqueurs oiseaux sera poursuivi en analysant les communautés bactériennes présentes dans une sélection de fientes d'oiseaux sauvages et domestiques par une approche NGS illumina MiSeq.

Tableau 10 : Détection des marqueurs de PCR en temps réel associés aux oiseaux (GFD) et à la litière de volaille (LA35) dans des échantillons fécaux

Sources des échantillons testés	Nb d'échantillons testés	Marqueur général Oiseau GFD Ech positifs	Marqueur litière de volaille LA35 Ech positifs
Fèces de volaille	33	11 (33,3 %)	4 (12,1 %)
Litière de volaille	31	11 (35,5 %)	26 (83,9 %)
Fèces d'oiseaux autres que volaille	26	15 (57,7 %)	0 (0 %)
Fèces humaines	11	0 (0 %)	0 (0 %)
Fèces bovines	13	0 (0 %)	0 (0 %)
Fèces porcines	15	1 (6,7 %)	0 (0 %)
Fèces équines	9	0 (0 %)	0 (0 %)
Eaux de station d'épuration	6	0 (0 %)	0 (0 %)

## 5.9. Projet MERLIN-MICROPLASTIQUES (A501203)

Le lancement du projet MERLIN Microplastiques a eu lieu à Brest en juin 2016. L'unité SG2M intervient dans le Work Package 3.2 Sous action Espèces : les Micro plastiques vecteurs d'organismes pathogènes et toxiques, et plus particulièrement dans les sous-tâches 3.2.1 « Rechercher les micro-organismes pathogènes pour les coquillages et pour l'homme et les micro-algues toxiques » et 3.2.2 « Caractériser les interactions micro-organismes pathogènes-micro plastiques ». Une réunion pour le WP3 a eu lieu en septembre 2016 pour coordonner les actions à mener (échantillonnage, développement de méthodes, choix des polymères). Les premiers échantillons de macroplastiques ont été réceptionnés au LSEM en janvier 2017 à Brest. Les analyses seront effectuées à partir d'avril 2017.

## 6. Coordination REMI

Le LSEM assure également, 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 oeuvre du REMI et la réalisation d'études de zones. Dans le cadre du REMI, 392 lieux de prélèvement ont été suivis en 2016.

Par ailleurs, deux conventions ont été établies avec la DGAL pour la réalisation de 12 études sanitaires sur la période 2015-2017, et de 5 supplémentaires sur la période 2016-2018. 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.

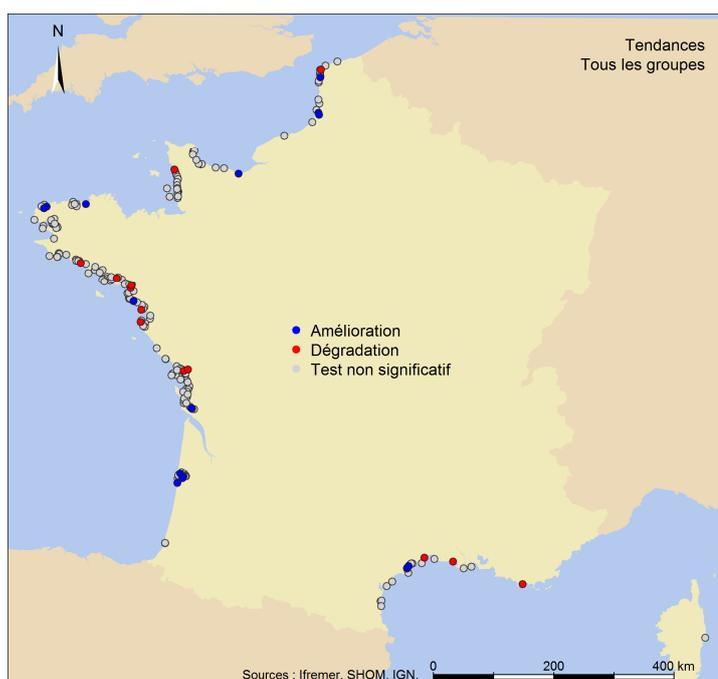


Figure 9 : Tendances des niveaux de contamination en *Escherichia coli* dans les coquillages – REMI Période 2007-2016

## 8. Conclusion et perspectives 2017

Ce bilan montre la diversité de nos actions effectuées en 2016 alliant, comme par les années précédentes, référence, expertise et recherche, tryptique qui nous permis de constituer un groupe performant sur ces axes divers. Les perspectives 2017 sont dans cette continuité avec la poursuite de nos actions de LNR, notre accompagnement dans l'AMO pour la surveillance mais également notre engagement dans les projets de recherche. Le travail d'accréditation va se poursuivre ainsi que notre implication dans l'aide aux réseaux de laboratoires agréés, missions étendues aux prélèvements sur le terrain. Le support à la normalisation va se poursuivre aux travers des méthodes développées sur les vibrions, et l'étude sur la prévalence des norovirus dans les huîtres au niveau européen va contribuer à établir une cartographie au niveau national mais également européenne.

La transition de la microbiologie basée sur la culture ou sur l'identification de micro-organismes ciblés vers une évaluation plus globale de la diversité de la flore microbienne par l'approche de séquençage global est amorcée. Les études mises en place avec l'accueil de doctorant ou stagiaire vont nous permettre de progresser et d'acquérir de nouvelles données et compétences tout en transmettant notre savoir-faire.

## ANNEXES

### Production scientifique et technique

#### Revue à comité de lecture

Baliere C., Rince A., Delannoy S., Fach P., Gourmelon M. (2016). Molecular Profiling of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Enteropathogenic *E. coli* Strains Isolated from French Coastal Environments. *Applied And Environmental Microbiology*, 82(13), 3913-3927.

Bouchoucha M., Piquet J., Chavanon F., Dufresne C., Le Guyader S. (2016). Faecal contamination of echinoderms: first report of heavy *Escherichia coli* loading of sea urchins from a natural growing area. *Letters In Applied Microbiology*, 62(2), 105-110.

De Graaf, M., Beck R., Caccio S.M., duim B., Fraaij P.L.A., Le Guyader F.S., Lecuit M., Le Pendu J., de Witt E., Schultsz C. Sustained fecal-oral human to human transmission following a zoonotic event. *Cur. Op. Virol.* accepté

Durand C., Fournet N., camberlin-Defrocourt S., Le Saux J-C., Le Guyader F.S., Donguy M-P., Ambert-Balay K., Mouly D. Toxi-infection alimentaire collective a novorius liée à la consommation d'huîtres lors d'un repas d'entreprise, étude de cohorte, Toulouse, Janvier 2015. *Bull. Epid. Hebd.* 2016, 26-27: 438-443.

Gagnière B., Burel O., Chauvel M-A., Rabu A., Guillois Y., Tillaut H., Le Goff D., Le Saux J-C., Le Guyader F.S., Pivette M. Toxi-infection alimentaire associée aux huîtres lors d'un mariage, Morbihan, Septembre 2015. *Bull. Epid. Heb.* 2016, 19: 1-5.

Guillois Y., Abravanel F., Miura T., Pavio N., Vaillant V., Lhomme S., Le Guyader S., Rose N., Le Saux J., King L., Izopet J., Couturier E. (2016). High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clinical Infectious Diseases*, 62(3), 351-357.

Guillois Y. Abranavel F. Miura T., Pavio N., Vaillant V., Lhomme S., Le Guyader F.S., Rose N., Le Saux J-C., King L.A., Izopet J., Couturier E. Epidémie d'hépatite E associées à la consommation d'un porcelet grille à la broche, Bretagne, 2013. *Bul. Epid. Heb.* 2016, 26-27, 444-449.

Klouch K., Schmidt S., Andrieux-Loyer F., Le Gac M., Hervio-Heath D., Qui-Minet Z., Quere J., Bigeard E., Guillou L., Siano R. (2016). Historical records from dated sediment cores reveal the multidecadal dynamic of the toxic dinoflagellate *Alexandrium minutum* in the Bay of Brest (France). *Fems Microbiology Ecology*, 92(7), fiw101.

Le Menec C., Parnaudeau S. Rumebe M., Le Saux J-C., Piquet J-C., Le Guyader F.S. Follow up of norovirus contamination in an oyster production area linked to repeated outbreaks. *Food Env Virol. On line*

Martinez-Urtaza J., Powell A., Jansa J., Castro Rey J., Paz Montero O., Garcia Campello M., Zamora Lopez M., Pousa A., Faraldo Valles M., Trinanés J., Hervio-Heath D., Keay W., Bayley A., Hartnell R., Baker-Austin C. (2016). Epidemiological investigation of a foodborne outbreak in Spain associated with U.S. West Coast genotypes of *Vibrio parahaemolyticus*. *Springerplus*, 5, -.

Miura T., Lhomme S., Le Saux J., Le Mehaute P., Guillois Y., Couturier E., Izopet J., Abranavel F., Le Guyader F.S. (2016). Detection of Hepatitis E Virus in Sewage After an Outbreak on a French Island. *Food And Environmental Virology*, 8(3), 194-199.

Polo D., Schaeffer J., Fournet N., Le Saux J., Parnaudeau S., Mcleod C., Le Guyader F.S. (2016). Digital PCR for Quantifying Norovirus in Oysters Implicated in Outbreaks, France. *Emerging Infectious Diseases*, 22(12), 2189-2191.

### **Rapports scientifiques et techniques**

Dupont J., Kergaravat C., Veron A., Menanteau C., Vallade E., Catherine M., Garry P. (2016). Enumeration of Escherichia coli in live bivalve molluscs. Calibration of the direct impedance technique using the BacTrac 4300 analyser. Adjustment of calibration line coefficients.

Garry P., Kaelin G., Kergaravat C., Vallade E., Veron A. (2016). Rapport d'essai d'aptitude - Programme Coquillages vivants. Essai du 22 mars 2016 : dénombrement des Escherichia coli dans les huîtres.

Garry P., Kaelin G., Kergaravat C., Vallade E., Veron A. (2016). Rapport d'essai d'aptitude - Programme Coquillages vivants. Essai du 22 Mars 2016 : recherche des Salmonella spp. dans les huîtres.

Garry P., Le Mennec C., Schaeffer J., Le Guyader S. (2016). Bilan plan de surveillance norovirus dans les huîtres au stade consommation. 1er janvier au 31 décembre 2015.

Piquet J. (2016). Document de prescription "Surveillance Microbiologique". Inventaire cartographique des points de prélèvement REMI et des zones classées et surveillées.

Quintin J., Sottolichio A., Derriennic H., Doremus S., Agion T., Peset S., Hervio Heath D., Sautour B., Parra R., Nowaczyck A., Bachelet G., Leconte M. (2016). Surveillance Ecologique du site du Blayais - Année 2015.

### **Ouvrages – Chapitre d'ouvrage :**

Koopmans M., Le Guyader F.S., Bosch A. Viruses, Chap. 12, Elsevier

### **Thèses**

### **Rapports de stages**

Détermination des communautés bactériennes dans des eaux et coquillages du littoral. Mahé Steven. Master 1, Université de Rennes 1. 20 p.

Développement de marqueurs aviaires pour une identification des sources de contamination de l'environnement. SAID BACAR Mohamed Soiwami. Master 2. UBO, 44 p.

Recherche et persistance de *Campylobacter* dans l'environnement. Oswald Maud. BTS Bio-Analyses et contrôle. Lycée Jean Macé, Lanester.

Mise en place et application d'une chaîne de traitement de données de métabarcoding. Leroi Laura. Master 2 Bioinformatique. Univ. de Rouen.

Standardisation et validation de la PCR en temps réel pour la recherche de *Vibrio vulnificus* et *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 dans l'environnement littoral. Collet Nadia. Licence Biologie L2, UBO.

### **Communications dans des séminaires colloques et congrès**

Garcia C., Garry P. (2016). Transfert des méthodes aux laboratoires agréés. Séminaire de la Référence DGAL, 18 Novembre 2016, Paris.

Garry Pascal (2016), Bilan des activités 2015 Laboratoire National de Référence microbiologie des coquillages. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016, Nantes.

Garry Pascal, Ollivier Joanna, Vallade Emilie, Villena Isabelle, Le Guyader Soizick Quantification de la contamination par les virus et les parasites Protozoaires dans les Coquillages(QuiProCo) . Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016, Nantes.

Hossen Virginie, Paré Aïnhua, Ollivier Joanna, Plan européen d'étude de la prévalence de norovirus dans les huîtres Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016, Nantes.

Klouch K., Schmidt S., Christen R., Andrieux-Loyer F., Le Gac M., Hervio Heath D., Nohemy Quiminet Z., Quere J., Madec L., Bigeard E., Guillou L., Siano R. (2016). Multidecadal dynamics of protists and toxic dinoflagellates revealed from paleogenetic analyses of dated sediments of the Bay of Brest (France). ICHA2016 - 17th International Conference on Harmful Algae. 9-14 October 2016, Brazil.

Le Guyader F.S., Drouaz N., Schaeffer J., Farkas T., Le Pendu J. Norovirus and oysters: impact of the species and of its genetic diversity. 2d International conference on calicivirus : Norovirus and beyond-glycans as drivers in viral infection, Lubeck 17-19 mars 2016.

Le Guyader F.S., Polo D., Schaeffer J. Garry P. Digital PCR applied to norovirus quantification in oysters. 15<sup>th</sup> workshop of Microbiology NRL's, Berlin 25-27 mai 2016. Le Guyader F.S. Norovirus persistence in oysters : Tulane virus as a potential surrogate. Special workshop 'How to deal with the infection risk of waterborne pathogenic viruses?', Sendai (Japon) 12 septembre 2016, *communication sur invitation*

Le Guyader F.S. Norovirus and other human enteroviruses : from sewage to oysters. 5<sup>th</sup> International Society for Food and Environmental Virology conference, Kusats (Japon) 13-16 septembre 2016, *state of the art, communication sur invitation*.

Le Guyader F.S. Comparing Tulane and Norwalk viruses in oyster: tissue distribution and persistence. 6<sup>th</sup> Calicivirus conference, Savannah, US October

Le Guyader F.S., Recent developments in acquiring infectious norovirus: possible applications. Foodborne Viruses: Challenges & Perspectives for the Food Industry, Gloucester (UK), Thursday 24th November 2016, *communication sur invitation*.

Pepin J., Travers M., Bechemin C., Soletchnik P., Le Moine O., Guesdon S., Lapegue S., Benabdelmouna A., Hervio Heath D., Bierne N. (2016). Projet MORBLEU. Mortalités des moules bleues dans les Pertuis Charentais et Vendée 2014-2015 : de l'expertise aux actions de recherche. Description des conditions associées aux épisodes de mortalité. Point d'information sur l'étude en cours. Journée de la Santé des mollusques marins et Journées de l'Observation conchylicole. 02 au 04 février 2016, Ifremer, Nantes, France.

Piquet Jean-Côme (2016), Bilan REMI. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016, Nantes.

Piquet Jean-Côme (2016), Etudes de zone. Journée Santé Environnement et Microbiologie, 22 septembre 2016, Nantes.

### ***Présentations par affiche***

Le Guyader F.S., Drouaz N., Schaeffer J., Farkas T., Le Pendu J. Impact of the oyster species and of its genetic diversity on norovirus ligand expression. 2d International conference on calicivirus : Norovirus and beyond-glycans as drivers in viral infection, Lubeck 17-19 mars 2016.

Gourmelon M., Lozach S., Garry P., Balliere C., Sauvageot N., Le Hello S., Rince A. (2016). Prevalence and characterization of Salmonella spp. in three shellfish-harvesting areas in France. I3S - International Symposium Salmonella and Salmonellosis. 6-7-8 June 2016, Saint-Malo, France.

Guesdon S., Travers M., Hervio Heath D., Derrien A., Genauzeau S., Schmitt A., Leroi L., Pepin J. (2016). Equilibre microbien et initiation des épisodes de mortalité de moules. Y aurait-il un lien? Journées ODE. 8-9 novembre 2016. Logonna Daoulas, France.

Polo D. Norovirus quantification in contaminated oysters by digital PCR<sup>6<sup>th</sup></sup> Calicivirus conference, Savannah, US October

### **Exposés dans des groupes de travail**

Garry P., Le Guyader S. (2016). Quantification de la contamination par les virus et les parasites Protozoaires dans les Coquillages (QuiProCo). Comité d'Expert Spécialisé Biorisk "Evaluation des risques biologiques dans les aliments". 2016, Maisons-Alfort, France.

Garry P. (2016). Actualités en surveillance LNR Microbiologie des coquillages IFREMER, LSEM. Copil 2016 Surveillance de la DGAL. 24 mars 2016, Paris.

Le Saux J., Parnaudeau S., Le Guyader S. (2016). Analyses officielles. Toxi-Infections Alimentaires Collectives, Rapid Alert System Food and Feed, Dysfonctionnements réseaux d'eaux usées. Bilan 2015. Copil 2016 Surveillance de la DGAL. 24 mars 2016, Paris.

Piquet J. (2016). Bilan REMI 2015. Copil 2016 Surveillance de la DGAL. 24 mars 2016, Paris.

## Participation à la formation

### Participation à un jury de thèse ou HDR

D. Hervio-Heath. Rapporteur de l'HDR de T. Grard « Qualité, fraîcheur et authenticités des produits aquatiques ». ULCO, Boulogne sur Mer, 30 mai 2016.

### Formation donnée

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
Garry Pascal & Ollivier Joanna	Laboratoires agréés DGAI	Techniciens	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 h
Gourmelon Michèle	Université Bretagne Occidentale, Brest	Master II Alimentation, Nutrition, Droit, Santé	Contamination microbienne du littoral – Identification des sources de contamination fécale	1h30
Piquet Jean-Côme		Agent DDTM	Etudes sanitaires	4
Soizick Le Guyader	Université François Rabelais, Tours	Master 2 Infectiologie	Contamination virale de l'environnement	2
Soizick Le Guyader	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
Soizick Le Guyader	Université de Nantes	Master 2, Science de l'Aliment	Les virus dans les produits de la mer : épidémiologie et techniques de détection,	2
Soizick Le Guyader	Institut Pasteur, Paris	Master 2 Virologie Fondamentale,	Calicivirus : épidémiologie et rôle de l'environnement	1,5
Soizick Le Guyader	Oniris, Nantes	Master 2 MAN-IMAL	Shellfish and human enteric viruses	2

## 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:*

- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages (depuis 2002- )
- EFSA, groupe de travail ‘Scientific and technical assistance on the baseline survey of norovirus in oysters’
- Antigone Dalhem workshop, Bergen 25-29 janvier, travail sur ‘to identify key factors facilitating zoonotic pathogens to gain efficient transmissibility between humans (i.e. AFTER breaking intra-human barriers)’.
- EFSA-EFSA, Workshop on foodborne viruses, Londres 23-25 février
- CEN/TC 275/WG6/TAG4, discussions of responses to comments from the enquiry stage on ISO 15216-1 and corresponding changes to the document, Bruxelles 2-3 février
- EFSA, groupe de travail sur ‘Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters’.