Auteurs :
Desdouit Marion, Garry Pascal, Gourmelon Michèle, Hervio-Heath Dominique, Hubert Françoise, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cédric, Le Mennec Cécile, Le Guyader Soizick, Loiseau Véronique, Lozach Solen, Maillot Jessica, Ollivier Joanna, Parnaudeau Sylvain, Piquet Jean-Côme, Quenot Emmanuelle, Rocq Sophie, Schaeffer Julien, Serghine Joëlle, Vallade Emilie, Véron Antoine, Wacrenier Candice.
Collaborateurs :
Besnard Alban, Bouberk Amine, Brochard Solène, Polo David, Sorée Marion, Strubbia Sofia.

RAPPORT D'ACTIVITES 2018

Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie
Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages

Fiche documentaire

Titre du rapport : Rapport d'activités 2018 – Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie.	
Référence interne : RBE/SG2M/LSEM 18-1 **Diffusion :** ☒ libre (internet) ☐ restreinte (intranet) – date de levée d'embargo : AAA/MM/JJ ☐ interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	**Date de publication :** 04/2019 **Version :** 1.0.0 **Référence de l'illustration de couverture** IFREMER/LSEM 2018 **Langue(s) :** Français
Résumé/ Abstract : Ce rapport présente une synthèse des actions, et travaux réalisés par le laboratoire Santé Environnement et Microbiologie pendant l'année 2018. Les divers projets de recherche sont résumés et les derniers développements ou résultats sont brièvement évoqués. Les actions en tant que Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages et les activités pour la coordination du réseau REMI sont également présentées.	
Mots-clés/ Key words : Microbiologie sanitaire, bactéries entériques, vibrions, virus entériques humains, norovirus, coquillage. Activité de référence, REMI.	
Comment citer ce document :	
Disponibilité des données de la recherche :	
DOI :	

Commanditaire du rapport :
Nom / référence du contrat : ☐ Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) ☒ Rapport définitif (réf. interne **du rapport intermédiaire** : R.DEP/UNIT/LABO AN-NUM/ID ARCHIMER)

Projets dans lesquels ce rapport s'inscrit (programme européen, campagne, etc.) :	
Auteur(s) / adresse mail	**Affiliation / Direction / Service, laboratoire**
Garry Pascal	RBE/SG2M/LSEM
Le Guyader Soizick	RBE/SG2M/LSEM
auteur 3	
auteur 4	
Encadrement(s) :	
Destinataire :	
Validé par :	

Sommaire

1. introduction 6
2. Rappel des objectifs 6
3. Moyens et effectifs 7
3.1 Personnels Ifremer : 7
3.2 Doctorants 8
3.3 Post-doctorants 8
3.4 Stagiaires 9
3.5 Accueil chercheurs étrangers 10
3.6 Equipement 10
4. Actions liées aux missions de LNR 11
4.1 Démarche qualité 11
4.2 Coordination technique des laboratoires agréés 11
4.2.1 Organisation des essais d'aptitude pour les laboratoires agréés - Appui à la démarche d'accréditation des laboratoires 11
4.2.2 Expertises, avis, assistance technique 12
4.3 Impact délai/température 13
4.4 16ème workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union européenne pour la microbiologie des coquillages 13
4.5 1er Workshop organisé par le LRUE virus 17
4.6 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 18 octobre 2018 17
4.7 Assistance à l'administration 17
4.8 Normalisation 18
4.9 Analyses officielles 18
4.10 Participation aux essais du LR-UE et PHE 21
4.11 Diffusion de l'information à l'administration et/ou aux laboratoires agréés 22
4.12 Etude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres 22
4.13 Développement /validation de méthode 24
4.13.1 Développement de la Digitale PCR 24
4.13.2 Comparaison des appareils d'extraction d'acide nucléiques : Minimag et Egen'up (Biomerieux) : 24
5. Actions liées aux Projets de Recherche 25

5.1 Campyshell – Campylobacter dans les coquillages : sources de contamination et risque pour l'homme 25
5.2 Projet COMPARE 26
5.3 Capture des norovirus par des mucines porcines 28
5.4 Projet Envicopas 29
5.5 Culture cellulaire et infectiosité virale 30
5.6 Projet IQUINOR 31
5.7 DEVIB 32
5.8 BACTRAC 33
5.9. Projet MERLIN-MICROPLASTIQUES 34
5.10 Projet Vivaldi 34
5.11 IGA – Vibrions halophiles 35
5.12 ENdYMIC : Fluctuations environnementales en milieu littoral : quel impact sur la diversité et la dynamique des communautés microbiennes et des populations de Vibrio spp.? 35
5.13 GLYNOVENT Glycannes liant norovirus et enterobacter : quel impact pour la sécurité sanitaire des eaux littorales ? 36
5.14 Projet ROME 37
6. Coordination REMI 38
7. Conclusion et perspectives 2019 40
ANNEXES 41
Production scientifique et technique 41
Expertise 48
Sigles / abréviations 50

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 2018 a de nouveau été une année riche en résultats innovants, procurant à notre équipe une reconnaissance nationale et internationale. 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).

Au titre de Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des coquillages, les missions et objectifs en 2018 étaient les suivants :

- coordonner des activités des laboratoires réalisant des analyses microbiologiques sur des coquillages dans le cadre des contrôles officiels exercés par la puissance publique,
- appuyer la puissance publique dans le suivi de réseaux de laboratoires agréés pour la recherche des norovirus, des *Salmonella* et le dénombrements des *E. coli* 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),
- 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 Santé publique France 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 le déroulement 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.

Titre : Laboratoire de Microbiologie - LNR Ifremer		
Adresses	Rue de l'Ile d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03	Z.I de la pointe du diable CS 10070 29280 Plouzané
Téléphone	(33) 2 40 37 40 52	(33) 2 98 22 44 18
Fax	(33) 2 40 37 40 27	(33) 2 98 22 45 94
Mail	Soizick.Le.Guyader@ifremer.fr	

3.1 Personnels Ifremer :

Personnel permanent (pendant la période)

Laboratoire de Santé, Environnement et Microbiologie

Responsable du laboratoire : LE GUYADER Soizick*

BREST		**NANTES**	
GOURMELON Michèle	C - 100%	DESDOUIT Marion	C – 100%
HERVIO HEATH Dominique**	C - 100%	GARRY Pascal	C - 100%
LOISEAU Véronique	T- 50%	HUBERT Françoise	C - 80%
LOZACH Solen	T - 80%	KAELIN Gaëlle	C - 100%
QUENOT Emmanuelle	T - 80%	KERGARAVAT Cédric	C - 100%
SERGHINE Joëlle	T - 80%	LE MENNEC Cécile	T - 100%
		MAILLOT Jessica	T – 80%
		OLLIVIER Joanna	C - 100%
		PARNAUDEAU Sylvain	T - 100%
		PIQUET Jean-Côme	C –100%
		ROCQ Sophie	C – 100%
		SCHAEFFER Julien	C - 100%
		VALLADE Emilie	T - 80%
		VERON Antoine	T - 100%
		WACRENIER Candice	T- 100%

* : responsable du laboratoire, ** : adjointe à la responsable du laboratoire sur Brest.
C: cadre, T : technicien

Personnels titulaires d'un contrat à durée déterminée

Nom - Prénom	Qualification	Date arrivée	Date départ	Type contrat	Site
LEGEAY Erwan	Technicien	01/07/17	30/08/18	Projet micro-plastiques	Brest
BESNARD Alban	Cadre	06/08/18		Etude EFSA	Nantes
LE FLOCH Anaël	cadre	01/08/17	31/07/18	Etude EFSA	Nantes
POLO David	Chercheur	15/07/18	20/08/18	Remplacement congé maternité Marion Desdouit	Nantes
BROCHARD Solène	Technicienne	09/07/18	-	Remplacement congé maternité Emilie Vallade	Nantes
VALLA Claire	Ingénieur Recherche	18/09/17	16/02/18	Surcroît d'activités – Projets Envicopas et Vivaldi	Brest

3.2 Doctorants

Nom - Prénom	Début de thèse	Date de soutenance	Sujets	Ecoles Doctorales d'inscription	Encadrements scientifiques
STRUBBIA Sofia	02/11/16		Norovirus et huître: infectiosité et approche génomique	ED Mer & Littoral, Université Nantes	S. Le Guyader
SOREE Marion	01/10/18		Mécanismes de virulence de *Vibrio parahaemolyticus*, bactérie potentiellement pathogène pour l'homme	ED Mer & Littoral, Université Bretagne Occidentale, Brest	D. Hervio Heath

3.3 Post-doctorants

Nom Prénom	Date début	Date fin	Sujet	Encadrement scientifique
BOUKERB Amine	21/11/16	20/05/18	Détermination des sources de contamination fécale dans les eaux et coquillages : identification de nouveaux marqueurs par séquençage haut débit et évaluation de leur persistance en microcosme complexe	M. GOURMELON

3.4 Stagiaires

Nom - Prénom	Début du stage	Fin du stage	Sujet	Catégorie	Ecole	Encadrements scientifiques
CHARIF Saïd Abdallah	04/01/18	29/06/18	Mécanismes cellulaires de l'interaction norovirus – huitres	Master II	Université Nantes	Marion Desdouits
BARILLERE Julien	15/01/18	02/03/18	Etude de la colonisation des huîtres creuses, *Crassostrea gigas,* par la bactérie marine *Vibrio parahaemolyticus*	M1 Microbiologie Microbiologie Fondamentale et Appliquée	UBO, Brest	C. Valla & D. Hervio-Heath
LE GUEN Kévin	03/04/18	08/06/18	Quelle est l'influence du couple temps/température sur al conservation des E.coli dans les coquillages.	DUT Génie chimique et Génie des procédés (2ème année)	IUT de Saint-Nazaire	Pascal Garry
BAILLY Sébastien	22/01/18	02/03/18	*Les Campylobacter* dans l'environnement : analyse de fientes d'oiseaux de bords de mer de la Baie de la Fresnaye & essais préliminaires sur la caractérisation d'une nouvelle espèce	M1, MASTER « Sciences, Technologies, Santé » Mention « Biologie et Santé »	UBO, Brest	J. Serghine & M. Gourmelon
VANRENTERGHEM Théodore	03/09/18	02/11/18	Diversité et dynamique de *Vibrio* sp. Potentiellement pathogènes pour l'homme dans les écosystèmes côtiers – Envicopas	Ingénieur agronome, Année 2 / M1	Agrocampus, Rennes	D. Hervio-Heath

3.5 Accueil chercheurs étrangers

Début de l'accueil	Fin de l'accueil	Nom – Prénom	Nationalité	Organisme	Encadrements scientifiques
06/05/18	25/05/18	Viviana Cachicas	Chili	Sección Microbiología de Alimentos Instituto de Salud Pública de Chile	S. Le Guyader
28/05/18	30/05/18	Fletcher Graham	Nouvelle Zélande	The New Zealand Institute for Plant and Food Research, Auckland, NZ	D. Hervio-Heath

3.6 Equipement

Le LSEM a fait l'acquisition d'équipements classiques de microbiologie et biologie moléculaire en remplacement d'équipement obsolète ainsi qu'un système de dissociation cellulaire utile pour le développement de la culture des norovirus. Une hotte pour manipulation des acides nucléiques a également été acquise dans le cadre du développement des activités de métagénomiques.

4. Actions liées aux missions de LNR

4.1 Démarche qualité

Le laboratoire a étendu en 2018 son périmètre d'accréditation (portée disponible sur www.cofrac.fr, n° accréditation 1-5451) avec la quantification des norovirus (GI et GII) dans les mollusques bivalves, selon la norme XP CEN ISO/TS 15216-1. Le laboratoire a ainsi réalisé des essais de validation de la méthode sur les huîtres pour les deux génogroupes portant sur l'étude de la fidélité, justesse, robustesse et définition des limites de détection et de quantification.
Des audits internes ont également été organisés, concernant le manuel qualité et la partie technique pour la bactériologie et la virologie. Les conclusions de ces deux évaluations ont montré la confiance des auditeurs dans les dispositions prises par le laboratoire et la qualité des résultats rendus.

Des évolutions ont par ailleurs été apportées au système de management de la qualité afin de répondre à la nouvelle version de la norme NF EN ISO/IEC 17025 parue fin 2017. Elles seront évaluées par le Cofrac (Comité Français d'Accréditation) début 2019.

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 a été poursuivi dans ces activités en prenant en compte les exigences liées à la certification ISO 9001 de l'Ifremer.

4.2 Coordination technique des laboratoires agréés

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

Dans le cadre de la coordination des laboratoires agréés, le laboratoire a organisé, une campagne d'essais inter-laboratoires d'aptitude, pour les critères *E. co*li et *Salmonella*, norovirus et virus de l'hépatite A le 10 avril 2018.

L'essai d'aptitude portant sur les deux paramètres réglementaires (*E. coli* et *Salmonella*), a eu lieu le 10 avril 2018 sur la matrice huître. L'envoi aux participants comportait cinq échantillons pour l'essai *E. coli* (contaminé à environ 28000 *E. coli*/100g de CLI) et deux échantillons pour l'essai *Salmonella* (un positif et un négatif). 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 aux essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella*

Escherichia coli	*Salmonella*
30 laboratoires (38 couples laboratoire/méthode)	24 laboratoires (42 couples laboratoire/méthode)

Tableau 2 : Résultats des participants (couples laboratoire/méthode) aux essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella*

	Escherichia coli			*Salmonella*	
	Satisfaisant	Discutable	Insatisfaisant	Satisfaisant	Insatisfaisant
Avril 2018	84.2 % (32 couples)	7,9 % (3 couples)	7,9 % (3 couples)	100%	

Des 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 été non satisfaisant en fidélité et discutable en justesse.
Le système d'évaluation des laboratoires pour *E. coli* a évolué, les participants étant évalué uniquement sur la justesse et la fidélité. Cependant les erreurs et incohérences sont notées sur le rapport, même si celles-ci n'ont pas d'impact sur l'évaluation du laboratoire. Le rapport a été modifié et rendu plus facile à consulter.

Le LNR a apporté son appui à ces laboratoires pour identifier les causes de ces non conformités et définir les actions correctives à mettre en place.

Pour l'essai inter-laboratoire pour la recherche des norovirus et du virus de l'hépatite A (VHA) dans les coquillages, les 13 laboratoires participant à ont reçu un échantillon d'huîtres creuses (échantillons 1), un échantillon de tissus digestifs (échantillon 2) et un échantillon d'acides nucléiques (échantillon 3). Les résultats attendus sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Résultats attendus dans le cadre des EILs norovirus/VHA

Echantillon	Matrice	NoV GI	NoV GII	VHA
1	Huitres	Détecté	Détecté	Détecté
2	Tissus digestifs	Détecté	Détecté	Non détecté
3	Acides nucléiques	Non détecté	Non détecté	Non détecté

NoV : norovirus, GI (GII) : génogroupe I (II). VHA : virus de l'hépatite A

Huit laboratoires ont présenté une performance satisfaisante pour cet essai d'aptitude, un laboratoire une performance discutable et quatre laboratoires une performance non satisfaisante. Trois laboratoires ont rendu des résultats **faussement négatifs.** Un laboratoire a fait une erreur d'interprétation et un laboratoire a commis une erreur dans le calcul du rendement d'extraction. Enfin, deux laboratoires ont obtenu un rendements d'extraction ou un contrôle d'inhibition non conformes. **Il reste des marges de progrès importantes pour les laboratoires**.

4.2.2 Expertises, avis, assistance technique

L'assistance technique a concerné essentiellement 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 un audit interne (technique) d'un laboratoire agréé pour la détection des norovirus qui suite à des problèmes d'extraction a vu son agréement suspendu.

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 l'étude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres.

4.3 Impact délai/température

Dans l'union européenne, le classement et la surveillance microbiologique des zones de production conchylicoles sont basés sur le dénombrement des *Escherichia coli* dans les mollusques bivalves (règlement (CE) n °854/2004). Cette bactérie entérique présente chez de nombreux mammifères témoigne d'une contamination fécale sans distinction d'espèce.
La norme ISO 6887-3 relative à la préparation des échantillons en vue de l'analyse microbiologique, recommande que l'analyse des coquillages vivants soit réalisée dans les 24h après prélèvement. Il est également stipulé que dans le cas d'une durée de transport supérieure à quatre heures, la température des échantillons à réception au laboratoire ne doit pas dépasser les 10 °C. Pour des raisons de logistique (horaires de marée, transport…) le laboratoire d'analyse peut se voir dans l'incapacité de réaliser l'analyse dans ce délai.
L'objectif de cette étude était d'évaluer l'impact de la conservation des échantillons au-delà du délai préconisé de 24h à une température de 13°C ± 2°C sur le dénombrement des *E. coli*.
Pour cela, trois matrices différentes (huîtres, moules et palourdes) naturellement contaminées à des concentrations comprises entre 1,8 log et 5,6 log *d'E. coli* pour 100 g de chair et liquide inter-valvaire ont été sélectionnées. Après prélèvement, les échantillons ont été conservés à 13°C et analysés après 24, 30 et 48h. La quantification des *E. coli* a été réalisée par impédancemétrie selon la norme NF V08-106. Pour un lot de coquillages, après chaque temps de conservation, cinq échantillons étaient analysés en duplicat. Au total 27 lots de coquillages ont été analysés produisant ainsi 810 résultats. L'analyse statistique des données (analyse de variance) a été réalisée séparément pour chacun des trois types de coquillage.
Cette étude a montré que la concentration en *E. coli* n'évolue pas significativement pour les trois types de coquillage conservés à une température de 13°C ± 2°C pendant 48h. Sous réserve du respect de la température, une tolérance de conservation étendue à deux jours semble être acceptable. Faciliter le travail sur le terrain de collecte des échantillons tout en préservant la qualité de l'analyse constitue un point important pour les laboratoires d'analyse.

4.4 16ème workshop des Laboratoires Nationaux de Référence de l'Union européenne pour la microbiologie des coquillages

Le laboratoire a participé au 17ème workshop des LNRs microbiologie des coquillages (Southampton, United Kingdom, 16-18 mai 2018), réunissant 30 personnes représentant 26 pays. Il s'agissait du dernier workshop des LNR microbiologie des coquillages. En raison du Brexit, et l'Europe ne souhaitant pas reconduire un LRUE de ce type, les activités seront réparties entre quatre LRUE : Virus, *Salmonella*, VTEC (pour *E. coli*) et biotoxines marines (pour les activités de

classement et surveillance des zones de production). Il est à noter que les activités *Vibrio* ne sont reprises par aucun LRUE. Lors de ce workshop les thématiques habituelles ont été abordées :

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

Centre for Environment Fisheries & Aquaculture Science

Cefas

European Union Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs

RESOLUTIONS OF THE 17TH WORKSHOP OF NRLS FOR MONITORING BACTERIOLOGICAL AND VIRAL CONTAMINATION OF BIVALVE MOLLUSCS, 16– 18TH MAY 2018, SOUTHAMPTON, UNITED KINGDOM

Future of the EURL networks

1. The EURL thanked the NRLs network for their contributions to the advancement of scientific and technical knowledge with respect to bivalve molluscs over the last 17 years. Particular improvements were noted in the development and standardisation of analytical methods, improved laboratory performance and elaboration of best practice in relation to the classification and monitoring of shellfish harvesting areas. The EURL further noted the concomitant benefits to human health over the period.

2. The workshop thanked Mr Paolo Caricato (DG Sante) for his support for the EURL and NRLs network for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs over the last seventeen years and acknowledged the stated aim of DG Sante to maintain the expertise in all aspects in the field of bivalve molluscs beyond December 31st, 2018.

3. The NRLs thanked the EURL for its organisation, support and leadership of the network and recognises the advances that have been made during their tenure.

Official Controls and Comparative testing

4. The workshop noted the publication on April 7th, 2017 of Regulation (EU) 2017/625 on Official Controls. Regulation 882/2004 Articles 32 and 33 covering the role of European Union (formerly Community) and National Reference Laboratories were replaced by Articles 95 and 101 of the new regulation respectively. NRLs were advised to familiarise themselves with these Articles which define an expanded scope for Reference Laboratories and which came into force on April 29th, 2018.

5. The workshop acknowledged the amendment prepared by the EURL to include provision of additional requirements for sample preparation of gastropods within the procedures for sampling bivalve molluscs, echinoderms and tunicates placed on the market in ISO 6887-3. This amendment will be progressed through a proposal the ISO CEN plenary meeting in June 2018.

6. The workshop noted the importance of bivalve shellfish matrix proficiency testing for bacterial and viral determinands and expressed strong concern that the future frequency of such PT within the new EURLs framework may be insufficient, particularly in respect of the expectations of national accreditation bodies.

Barrack Road, The Nothe, Weymouth DT4 8UB | www.eurlcefas.org
E: fsq@cefas.co.uk | T: +44 (0) 1305 206600 | F: +44 (0) 1305 206601

World Class Science for the Marine and Freshwater Environment

7. The workshop noted the following provision in Regulation (EU) 2017/625 Article 100 Clause 1:-

> "Member States may designate a national reference laboratory also in the cases where there is no corresponding European Union reference laboratory."

8. The workshop noted and welcomed the stated plans of Cefas (the current EURL) to continue provision of shellfish matrix-based PT schemes on a cost-recovery basis beyond the end of the current EURL framework.

9. The EURL requested that NRLs review the draft amendments to section 7.3.10 of the Good Practice Guide and section 7.3.1 and Annex 1 of the Community Principles Guide with regard to the proposals for changes to seasonal classifications, and requested comments by June 4th, 2018.

Marine Vibrios

10. The workshop noted that in order to extend the ECDC FWD-NET surveillance system to *V. parahaemolyticus* and *V. vulnificus,* requests to ECDC via the national focal points and agreement at the Member State level would be required. The workshop noted the lack of progress in this area and reconfirmed the resolution from the 16th Workshop in 2017 (Resolution 15) regarding this point.

11. Further to the above, the workshop noted the detection of *V. cholerae* non-01 non-0139 in some EU MS and the need for increased awareness of this issue across the EU, and the need for further research to investigate this potentially pathogenic bacteria in the environment and shellfish.

12. Recent developments regarding *Vibrio* control measures in the USA were outlined by the EURL and contrasted with the current absence of control measures in Europe. A range of potential future control options for the EU was outlined and discussed.

13. Further to the above, the workshop identified concerns with the lack of an EURL covering the issue of *Vibrio* in bivalve shellfish from 2019 onwards.

14. The EURL presented data regarding the use of whole genome sequencing for investigating *Vibrio*-related foodborne outbreaks. The advantages of these newer molecular methods for shellfish-associated pathogens were outlined compared to traditional subtyping techniques. These include greater resolution and the ability to determine key aspects related to the source of infections, potential transmission routes and the evolution of strains.

15. The workshop noted the recent work of TAG15 with regards to methodological approaches in relation to vibrios in shellfish. The need for the sharing of methods, in particular primer and probe sequences between members of TAG15 was reiterated. In addition, the need for strains that could challenge current PCR-based approaches was outlined.

16. The workshop noted recent method development efforts regarding vibrios carried out through CEN/TC275/WG6/TAG15 and ISO/TC34/SC9/WG27. The workshop agreed that future standardisation activities for vibrios should be carried out at the ISO level given the international importance of vibrios in seafood.

17. The workshop noted the data presented by Dr Andy Turner (Cefas) and Dr Ana Gago (EURL Marine Biotoxins) on tetrodotoxin and the potential linkages between this toxin and marine bacteria including *Vibrio* spp. The workshop recognised the need to further consider this emerging risk and supported further research in this area.

Viruses

18.The workshop noted the continued and well-established use of protocols describing norovirus outbreak-based closing and reopening criteria operated by France and Ireland and recommended that consideration should be given to development of protocols in European countries with bivalve production to help with the management of outbreaks.

19.The EURL clarified the responsibilities with respect to viruses in bivalve molluscs at EURL level. This will remain part of the competencies of the EURL for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs until December 31st, 2018. Thereafter the competency will transfer to the EURL for foodborne viruses.

20. The Workshop acknowledged the encouraging progress with the EFSA baseline survey for norovirus in oysters and noted that this study represented the culmination of the work on virus method standardisation and harmonisation carried out within the NRLs network over its lifetime.

21. The workshop noted the presentations detailing the occurrence of hepatitis E virus (HEV) in some bivalve shellfish and environmental waters. The potential increasing emergence of HEV in association with bivalve shellfish was acknowledged and the public health risks from this zoonotic pathogen were noted. Further, the workshop noted the requirement for more research in this area, in addition to development of standardised methods.

4.5 1er Workshop organisé par le LRUE virus

Le LSEM a participé au premier Workshop organisé par le LRUE virus (Uppsala, Suède). Le champs d'action de ce nouveau LRUE concerne tous type de virus pour l'ensemble des matrices alimentaires. Cette première rencontre a permis de faire la connaissance des différents LNR et de présenter notre activité sur la détection des norovirus dans les coquillages.

4.6 Journée Santé Environnement et Microbiologie, 18 octobre 2018

La journée Santé Environnement et Microbiologie a été organisée sur le centre de Nantes et a rassemblé 105 personnes, dont des représentants de l'administration centrale (DGAl et SPF), de l'administration locale (ARS, DDTM, DDPP, CIRE) des agences de l'eau, des professionnels (CRC) et des laboratoires agréés.
Les thèmes récurrents, bilan des activités du LNR et des essais d'aptitude, point sur la réglementation et la normalisation, ont été présentés. Un point sur la surveillance 2017 et les études de zone en cours et avenir a également été réalisé (Ifremer et DGAl). Un point d'avancement sur l'étude européenne norovirus a également été fait.

Différents exposés ont ensuite été présentés par le LSEM ou des partenaires du laboratoire :
- "Ethnomalacology: Integrating local knowledge to assess mollusc diversity and abundance change in the Asia-Pacific region (Ariadna Burgos, Museum national d'histoire naturelle, Paris)
- Station d'épuration modernisée: qualité des coquillages améliorée (Julien Schaeffer)
- Détection de norovirus et bactéries en milieu marin côtier à l'aide de capteurs passifs: Etude comparative (Françoise Hubert)
- *Vibrio* spp. potentiellement entéropathogènes pour l'homme dans les produits de la mer : surveillance et réglementation. (Dominique Hervio Heath).

4.7 Assistance à l'administration

En tant que Laboratoire National de Référence, le laboratoire a assisté à différentes réunions:
- le 8 mars copil de la surveillance dans les locaux de la DGAl,
- le 24 mai journée de la référence, dans les locaux de l'Anses,
- le 12 juin coordination des EILA, dans les locaux de l'Anses,
- le 22 novembre séminaire de la référence au ministère de l'agriculture

Par ailleurs le laboratoire a participé en tant qu'expert EFSA au suivi de l'étude européen sur la prévalence de norovirus dans les huîtres au niveau des zones de production et des centres d'expédition. Pour cela plusieurs réunions ont été organisées à l'EFSA (Parme, Italie).

4.8 Normalisation

Le laboratoire est membre de la Commission Afnor V08B et de ses groupes de travail (GT), 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 parahemolyticus* totaux et potentiellement pathogènes dans les aliments (techniques de numération et de détection par hybridation ou par PCR temps réel) et 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".

4.9 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 2018 concernaient 34 foyers, impliquant 359 cas connus sur 1330 exposés. Concernant ces 34 foyers, nous avons reçus 80 échantillons, dont 69 échantillons d'huîtres et 11 de moules.
Les analyses ont concerné 71 recherches de norovirus sur 69 échantillons d'huîtres, 2 de moules. Ces analyses ont conduit à la mise en évidence de norovirus dans 50 échantillons, les 21 autres ayant été détectés négatifs (Figure 2). La majorité des coquillages contaminés par des norovirus des GI et GII (Figure 3). Le virus de l'hépatite E a été recherché sur 7 échantillons de moules, aucun n'ayant donné de résultat positif.
La recherche des *Vibrio* potentiellement entéropathogène a été réalisée dans 2 lots de moules, permettant la détection de *Vibrio parahaemolyticus* ainsi que le gène de virulence trh+ dans ces deux lots.

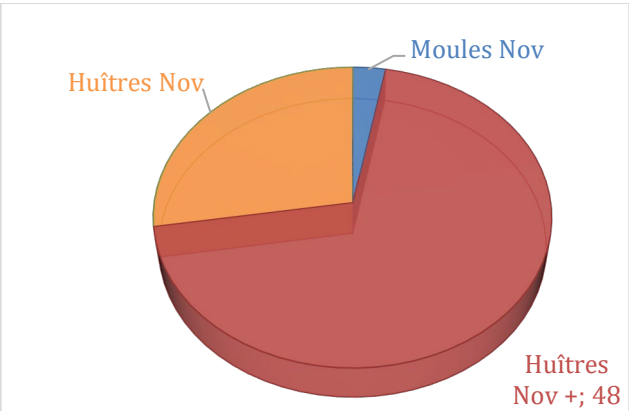

Figure 2 : Résultats de recherches de norovirus de coquillages en lien avec des TIACs
NoV + (-) : échantillons positifs en norovirus (ou négatif)

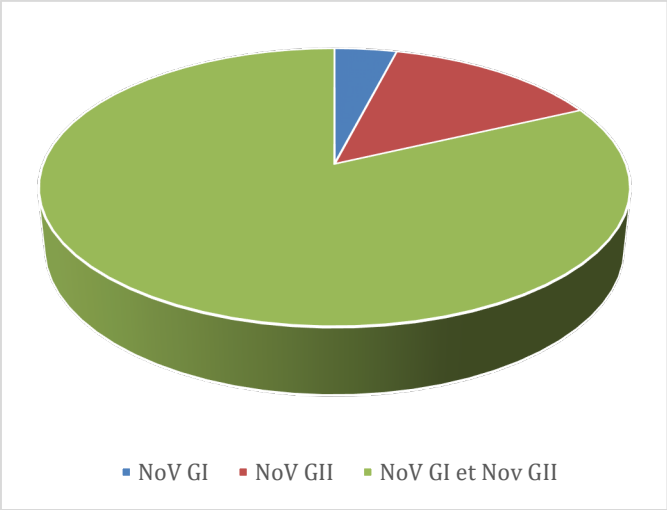

Figure 3 : Répartition des génotypes détecté sur les échantillons positifs en norovirus

Ces 80 analyses ont fait l'objet de 38 saisines de la DGAl et de l'émission de 50 rapports d'essais.

Notifications RASFF
Deux notifications RASFF ont conduit à des recherches de norovirus sur deux lots d'huître. Les résultats étaient négatifs pour les deux échantillons.

Alerte sur les dysfonctionnements des structures d'assainissement d'eaux usées en période d'épidémie hivernale gastro-entérite aigüe (GEA)
Aucune alerte de dysfonctionnement sur un réseau d'eaux usées n'a conduit à des analyses microbiologiques.

Le LSEM a participé à différents essais inter-laboratoires européens au cours de l'année 2018. 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 un essai sur lenticules organisés par le PHE 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 à EIL organisé par le PHE, sur lenticules

	Méthode d'analyses	**Score**
Dénombrement *E. coli*	ISO 116649-3	Satisfaisant
Recherche *Salmonella* spp.	NF EN 6579	Satisfaisant

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

	Méthode d'analyses	Score
Dénombrement *E. coli*	NF V 08-106	Satisfaisant
	ISO 16649-3	Satisfaisant
Recherche *Salmonella* spp.	NF EN 6579	Satisfaisant

Norovirus

Au cours de l'année 2018, le LSEM a participé à deux essais inter-laboratoire pour la recherche et la quantification des norovirus et du virus de l'hépatite A, organisé par le LRUE (Cefas), le premier Eil portait sur 1 échantillon d'huître et deux échantillons de broyat de tissus digestifs le deuxième portait sur deux lenticules.

Tableau 6 : Résultats obtenus à l'EIL (PT 72) organisé par le LRUE

Distribution	Echantillon	Virus cible	Performance du laboratoire	
			Analyse qualitative	Analyse quantitative
Distribution n°1	Huitres	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Broyat de tissus digestif	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Broyat de tissus digestif	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
Distribution n°2	Lenticule 1	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Lenticule 2	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante

La performance de laboratoire a été 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 7).

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

Distribution	Février	Novembre
Vibrio parahaemolyticus	Satisfaisant	Satisfaisant
Vibrio cholerae	Satisfaisant	Satisfaisant
Vibrio vulnificus	Satisfaisant	Satisfaisant pour un échantillon et non satisfaisant pour le deuxième échantillon

4.10 Participation aux essais du LR-UE et PHE

Le LSEM a participé à différents essais inter-laboratoires européens au cours de l'année 2018. Ces essais sont organisés par le laboratoire référence de l'union européenne (CEFAS) ou par PHE (Public Health England).

- E. coli et Salmonell : Pour le dénombrement des E. coli et la recherche des Salmonella, le laboratoire a participé à un essai sur lenticules organisés par le PHE et à un essai sur coquillages entiers organisé par le LRUE (CEFAS). Les résultats sont présentés sur les Tableaux 8 et 9.

Tableau 8: Résultats obtenus par le LSEM à EIL organisé par le PHE, sur lenticules

	Méthode d'analyses	Score
Dénombrement E. coli	ISO 116649-3	Satisfaisant
Recherche Salmonella spp.	NF EN 6579	Satisfaisant

Tableau 9 : Résultats obtenus par le LSEM aux EILs organisés par le CEFAS, sur coquillages

	Méthode d'analyses	Score
Dénombrement E. coli	NF V 08-106	Satisfaisant
	ISO 16649-3	Satisfaisant
Recherche Salmonella spp.	NF EN 6579	Satisfaisant

- Norovirus : Au cours de l'année 2018, le LSEM a participé à deux essais inter-laboratoire pour la recherche et la quantification des norovirus et du virus de l'hépatite A, organisé par le LRUE (Cefas), le premier Eil portait sur 1 échantillon d'huître et deux échantillons de broyat de tissus digestifs le deuxième portait sur deux lenticules.

Tableau 10 : Résultats obtenus à l'EIL (PT 72) organisé par le LRUE

Distribution	Echantillon	Virus cible	Performance du laboratoire	
			Analyse qualitative	Analyse quantitative
Distribution n°1	Huitres	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Broyat de tissus digestif	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Broyat de tissus digestif	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante

Distribution	Echantillon	Virus cible	Performance du laboratoire	
			Analyse qualitative	Analyse quantitative
Distribution n°2	Lenticule 1	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante
	Lenticule 2	NoV GI	Satisfaisante	Satisfaisante
		NoV GII	Satisfaisante	Satisfaisante
		VHA	Satisfaisante	Satisfaisante

La performance de laboratoire a été 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 7).

Tableau 11 : Résultats des EILA Vibrio spp. organisés par PHE

Distribution	Février	Novembre
Vibrio parahaemolyticus	Satisfaisant	Satisfaisant
Vibrio cholerae	Satisfaisant	Satisfaisant
Vibrio vulnificus	Satisfaisant	Satisfaisant pour un échantillon et non satisfaisant pour le deuxième échantillon

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

Liste des documents diffusés :

- Rapport d'activités LNR 2017 et relevé des dépenses (Convention LNR – DGAl 2017)
- Rapports des essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella* sur des échantillons d'huîtres du.
- Rapport de l'essai d'aptitude norovirus sur des huîtres
- Compte rendu et résolutions du 16ème workshop des LNR (3 au 5 mai 2017, Split)
- Etude sur la prévalence de norovirus dans les huîtres : bilan intermédiaire
- Délai entre le prélèvement et l'analyse pour le dénombrement des *E. coli* dans les mollusques bivalves vivants

4.12 Etude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres

L'étude mise en place par la Commission européenne s'est terminée à la fin du mois d'octobre pour les prélèvements et à la fin de l'année pour les dernières analyses. Pour rappel, les sites de prélèvement étaient repartis sur 74 zones de production (dont 10 zones de claires) et 167 centres d'expédition.

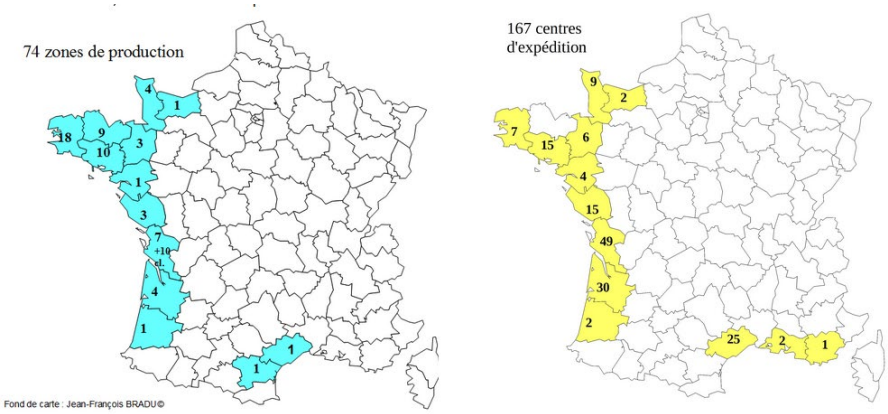

Figure 4. Répartition des sites de prélèvement

Pour l'ensemble des prélèvements le taux de réalisation a été de 93,4% (2702 prélèvements réalisés sur 2892 attendus), avec un taux de réalisation de 98,8% pour les zones de production et de 91,2% pour les centres d'expédition (nombreux centres d'expédition ont une activité saisonnière entraînant une diminution du taux de réalisation pendant la période estivale). Un faible pourcentage d'échantillon (59 échantillons pour l'ensemble de l'étude) n'a pas pu être intégré car les critères de qualité de l'analyse (efficacité d'extraction inférieure à 1%).
Parmi les 2643 échantillons analysés, moins de 10% des échantillons ont été détectés contaminés par des norovirus avec une prévalence différente selon les saisons.

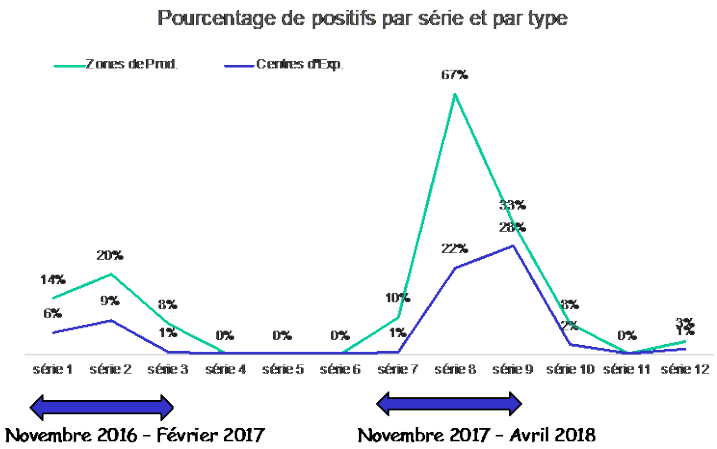

Figure 5 : Détection des norovirus dans les échantillons au cours des deux années de l'étude.

Afin de traiter et interpréter ces résultats, le groupe travail de l'EFSA a besoin des données de production mensuelle de tous les centres d'expédition (ayant participé ou non à l'étude) sur la durée de l'étude. La France possède 2437 centres d'expédition, ce qui représente un volume total attendu de 58500 données. Lorsque les données mensuelles n'ont pas pu être obtenues celle-ci ont pu être remplacées par des données annuelles. Les données, collectées par les services de l'état (DDPP), remis en forme et compilés par le LSEM ont été transmis à l'EFSA.

4.13 Développement /validation de méthode

4.13.1 Développement de la Digitale PCR

La digitale PCR (dPCR) est une méthode alternative à la PCR en temps réel (rRT-PCR) qui permet la quantification d'acides nucléiques sans comparaison avec une gamme standard. Considérant qu'il n'existe pas de référence officielle internationale la définition de cette gamme standard est dépendant de chaque laboratoire. Dans un premier temps nous avions développé la PCR digitale en deux étapes aucun kit n'étant disponible sur le marché pour quantifier directement à partir de l'ARN. Suite à une étude bibliographique, nous avons sélectionné un tampon qui, ajouté au mix de RT-PCR one step utilisé en RT-PCR en temps réel, nous permet de réaliser à présent l'approche digitale en une étape. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs et les essais se poursuivront en 2019.

4.13.2 Comparaison des appareils d'extraction d'acide nucléiques : Minimag et Egen'up (Biomerieux) :

Lors de la recherche des virus entériques humain dans les coquillages, dans le cadre des activités accréditées du LSEM, l'étape d'extraction des acides nucléiques viraux est primordiale. En effet, cette méthode doit être sensible en raison de la très faible charge virale, suffisamment stringente pour éliminer les inhibiteurs provenant de la matrice mais également protéger les acides nucléiques, ARN pour les norovirus (NoV) et virus de l'hépatite A (VHA), en vue de leurs détections par RT-PCR en temps réel ou digitale. Pour cela, une méthode semi automatisé, le minimag est utilisé. Cependant, le fournisseur, Biomérieux, nous a informé de l'arrêt de la production de cet instrument et son remplacement par le Egen'up.

La future utilisation de l'automate d'extraction Egen'up dans nos activités accréditées nécessite une comparaison afin de s'assurer de performances identiques à celles du minimag.
Cette comparaison a porté sur des échantillons artificiellement contaminés, par le NoV GII, à 2 niveaux, fort et faibles, ainsi que des huitres creuses naturellement contaminées par NoV GI et GII.
Ces échantillons ont été analysée en triplicats ainsi que des témoins négatifs pour fiabiliser les résultats obtenus.
Sur les échantillons artificiellement contaminés, des tissus digestifs d'huitres auxquels sont ajoutés une suspension virale, pas de différence significative n'est observée pour le niveau faible ou fort de contamination.

Figure 6 : extracteur Egen'up

Pour les échantillons d'huitres naturellement contaminés, les résultats sont les suivants :

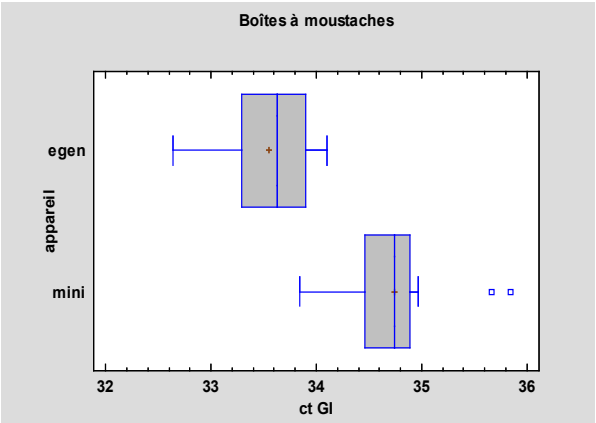

Figure 7: comparaison pour les NoV GI

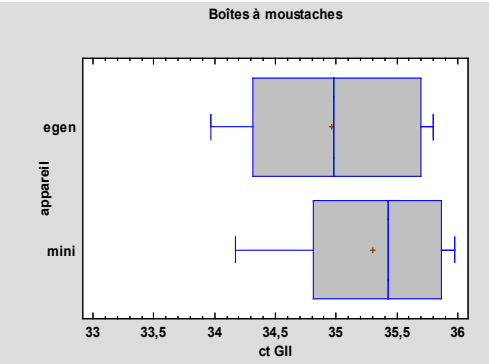

Figure 8: comparaison pour les NoV GII

Aucune différence significative n'est observée entre les 2 appareils pour l'extraction du NoV GII dans les tissus d'huitres. En revanche, une différence (P<0,05) est observée lors de la comparaison pour le NoVGI. Cette différence est en faveur de l'appareil Egen'up.
Les résultats de cette comparaison des appareils d'extraction sur des échantillons contaminés artificiellement ou naturellement permettent de valider l'utilisation de l'Egen'up lors des expériences réalisés sous accréditation.

5. Actions liées aux Projets de Recherche

5.1 Campyshell – Campylobacter dans les coquillages : sources de contamination et risque pour l'homme.

Afin d'évaluer si les oiseaux de bord de mer constituaient une possible source d'apport de *Campylobacter* spp. aux coquillages de zones conchylicoles, des fientes d'oiseaux de bord de mer ont été collectées au cours de 21 campagnes de prélèvement (dont 12 en 2018) sur trois sites en Bretagne. La présence de *Campylobacter* spp. a été recherchée selon la norme EN ISO 10272 et les isolats obtenus ont été identifiés à l'espèce par MALDI-TOF (LABEO, partenaire du projet). Un total de 457 fientes de 12 espèces d'oiseaux ont été ainsi collectées et 900 isolats de *Campylobacter* spp. ont été obtenus.
L'analyse des 19 premières campagnes (de décembre 2016 à octobre 2018 ; 762 isolats) montre une prévalence moyenne des *Campylobacter* spp. dans les fientes d'oiseaux (50.3 % ; n=403) avec une plus forte prévalence dans les fientes d'oiseaux de rivage de type échassier (86,8 % ; n=68) que dans celles des laridés et cormorans (40,3 % ; n=216) ou les canards, cygnes et oies (43,6 % ; n=101). Les *Campylobacter* ont été mis en évidence dans la totalité des espèces d'oiseaux testées excepté chez les cygnes (n=6). *Campylobacter lari* est l'espèce majoritairement retrouvée (présence dans 26,8 % des fientes testées ; chez toutes les espèces aviaires excepté les corneilles (n = 18) devant *C. jejuni* (présence dans 14,6 % des fientes), *C. coli* (6,5 %) et *C. peloridis* (6,5 %). Une répartition différente a été observée selon les espèces avec par exemple la présence de *C. jejuni*

plus fréquente chez les corneilles, de *C. coli* chez les Bernaches Cravant et Tadorne de Belon et de *C. peloridis* chez les huitriers pie.
Parallèlement, une analyse de données de séquençage de génomes complets d'une sélection de *Campylobacter lari* isolés de la zone conchylicole de la baie de La Fresnaye (22) et du bassin versant en amont a été réalisée et a permis de mettre en évidence une nouvelle espèce du groupe des *C. lari* (dénommée *C. armoricus*) dans des eaux de rivière. Cette nouvelle espèce a été également identifiée dans des souches cliniques collectées par le CNRCH (Centre National des *Campylobacter* et des *Helicobacter* ; étude collaborative principalement avec le CNRCH et le LIST, Luxembourg Institute of Science and Technology, Luxembourg).

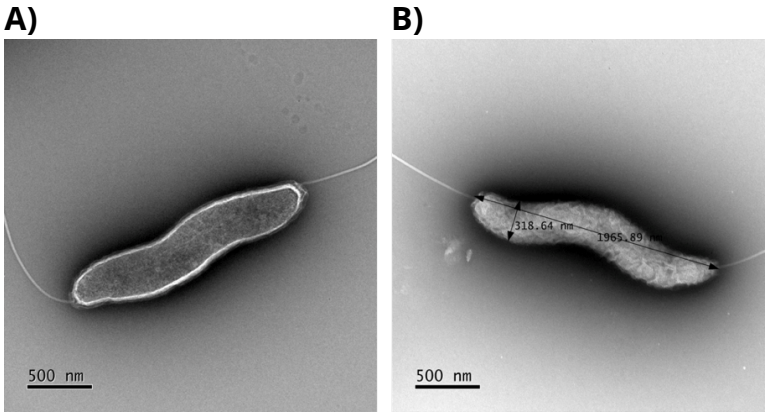

Figure 9: Images de microscopie électronique à transmission des souches CA1650 (souche clinique) (A) et CA656^{T} (souche environnementale) (B) de *Campylobacter armoricus*. Taille moyenne de 2,5 × 0,3 µm et forme de bacille hélicoïdal avec un flagelle par pôle. Barres, 500 nm (source CNRCH ; Boukerb et al., en préparation).

5.2 Projet 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 (figure 4). Tel que prévu initialement une plateforme en ligne de bio-informatique permet de traiter les données de séquençage par rapport aux mêmes références et de générer des bases de données.

Au cours de l'année 2018, une étude a été mise en place sur *Campylobacter lari*, souvent peu étudiée contrairement aux autres espèces de *Campylobacter*. Il a été retenu d'évaluer la diversité des souches de *C. lari* isolées dans différents pays. Une première comparaison des souches françaises (souches cliniques et souches environnementales : coquillages, eaux et sédiments ; n=34) et de souches danoises (souches cliniques et d'origine canine, n=13) a montré une grande diversité génétique des souches (analyse des données de séquençage de génomes complets). Toutefois, une proximité entre certaines souches cliniques danoises et des souches cliniques françaises (souches appartenant au Sequence Type ST21) a été observée. La prochaine étape consistera en une comparaison de ces souches avec des souches françaises de source animale :

chiens, bovins et oiseaux sauvages et des souches isolées dans d'autres pays (Royaume-Uni et Allemagne). L'utilisation du séquenceur de troisième génération MinIon couplé à des séquences Illumina a permis de reconstruire le génome complet ainsi que les deux plasmides d'une souche de *Campylobacter* isolée dans l'environnement.

Concernant la détection des virus, une mise au point des protocoles d'extraction et de préparation de librairies en vue d'une analyse NGS a été réalisée. Plusieurs points d'optimisation ont été évalué : l'utilisation d'hexamère sélectionné pour la synthèse du cDNA, l'élution avec du pyrophosphate de sodium et l'enrichissement des librairies avec une puce de capture (VirCapSeq, Roche). Deux runs de Nextseq ont permis d'évaluer ces points d'optimisation : une série dans un but rétrospectif de la diversité des norovirus au cours des dix dernières années (analyse de 16 échantillons d'eaux brutes de station d'épuration) et une série utilisée pour des expérimentations de bioaccumulation (33 échantillons d'huîtres bioaccumulées et des eaux brutes correspondantes). La première stratégie de sélection d'hexamère avait pour objectif d'éliminer dans le pool des 4960 combinaisons celles qui correspondent à l'ARN ribosomal de l'huître. La sélection a été réalisée en bio-informatique à partir des séquences disponibles dans Genbank. Après analyse des échantillons d'huîtres en utilisant les différents sets d'hexamère sélectionné ou non, le pourcentage de séquence d'huître représente toujours entre 80 et 90% des reads assignés. L'utilisation d'hexamères sélectionnés ne semblent pas diminution des séquences de l'hôte. Le pyrophosphate est utilisé comme détergent ionique et après incubation à température ambiante et traitement aux ultrasons son rôle est de favoriser la séparation des particules virales des débits après centrifugation. L'analyse du séquençage Illumina, montre une abondance et une diversité des reads bien plus importante pour les échantillons traités au pyrophosphate avec 1000 à 10000 fois plus de reads pour les norovirus (figure). L'assemblage des contigs est aussi de meilleure qualité avec pour certains échantillons l'obtention d'un génome complet en utilisant le pyrophosphate et des fragment inférieur à 1000 bases sans ce traitement préliminaire.
Pour les échantillons d'huître de précédentes analyses ont montrées que malgré de fortes concentrations en norovirus détectées en PCR temps réelle, après analyse NGS le nombres de reads de norovirus était très faible ou nul. Ainsi lors de la construction des librairies, l'utilisation d'un capture-array (VirCap-Seq kit, Roche) dont l'objectif est d'enrichir les librairies en séquences de virus de vertébrés a été testés sur des échantillons d'huîtres bioaccumulées. Cette approche a permis d'augmenter de façon significative le nombre de séquences virale notamment de norovirus et de construire des contig plus longues permettant de mieux les génotyper.
L'analyse des données de séquençage a été réalisé grâce à un pipeline bio-informatique construit avec l'aide de nos collègues néerlandais de l'EMC et d'Alban Besnard (CDD IFREMER). Le pipeline est constitué de plusieurs étapes : trimming qualité, normalisation des reads, assemblage *de novo,* assignation taxonomique avec blast (NCBI), mapping et visualisation de la diversité à l'aide de graphiques dynamique grâce Krona. L'utilisation de l'outil en ligne, norovirus Typing Tools V2.0, a permis le génotypage basé sur la phylogénie des norovirus. Le traitement bio-informatique est en cours ; mais l'on peut déjà noter la caractérisation de génomes complets de norovirus ainsi que d'autres virus entériques : astrovirus, adenovirus, rotavirus ou picobirnavirus. Cependant malgré les différentes stratégies utilisées pour enrichir en séquences virales la majorité des reads obtenus correspondent à l'hôte ce qui montre que des améliorations sont encore nécessaire.

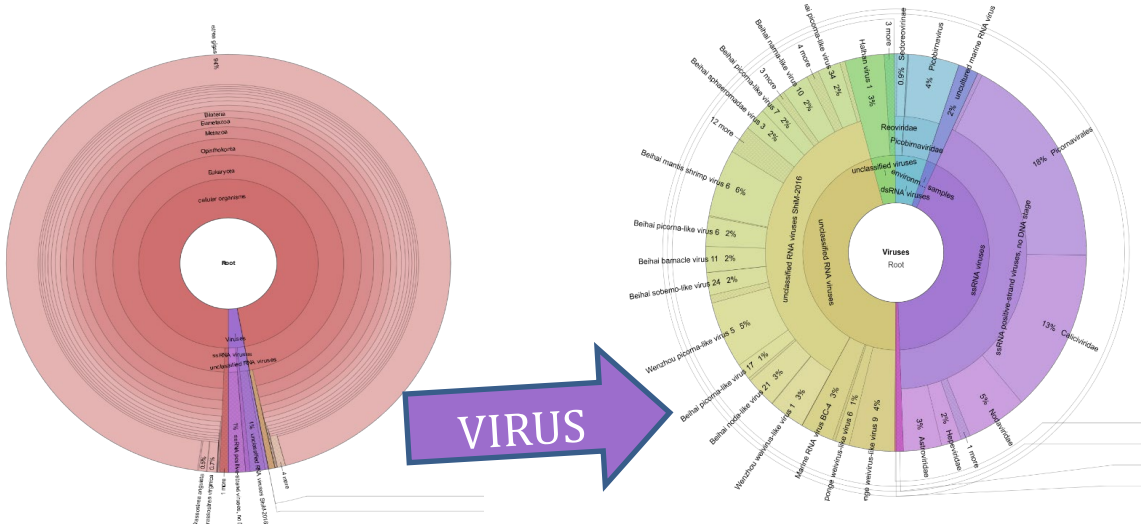

Figure 10: Diversité des séquences obtenus une huître bioaccumulée (Krona).

Nous avons participé à un ring trial sur une matrice saumon fumé dopée avec un panel de souche bactérienne, virale et de protistes. Cette comparaison a portée sur l'extraction des acides nucléiques, la préparation des librairies, ainsi que le run Miseq Illumina. Les séquences obtenues sont en cours d'analyse par l'UNIBO (Université de Bologne) organisateur du ring trial. Cette participation nous a permis d'évaluer notre compétence en métagénomique par rapport aux autres participants mais aussi de valider notre pipeline d'analyse bio-informatique.

5.3 Capture des norovirus par des mucines porcines

Les mucines sont des glycoprotéines de haut poids moléculaire produites pour des cellules spécialisées présentes sur tout l'épithélium du tube digestif. Les mucines se composent à 80% de carbohydrate et font partie de la composition du mucus et de la salive. Parmi les sucres présents à la surface des mucines, il y a les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGAs), indispensable pour l'infection des NoV. En raison de la similarité génétique entre l'homme et le cochon, les mucines du tissu digestif porcin sont utilisées pour étudier l'interaction entre virus et l'hôte (Porcine Gastric Mucins type III. ou PGM). Par exemple Les PGM ont déjà été utilisés pour étudier les effets des traitements thermiques ou désinfectants sur la capacité des NoV à se lier aux HBGAs), pour augmenter la sensibilité de détection de NoV GI et GII ainsi que pour différencier les NoV isolés selon l'intégrité de la capside virale. Toutefois, il manque à l'heure actuelle un control de spécificité entre les PGM et les NoV. Afin de répondre à cette question nous avons comparé la liaison entre NoV et PGM en utilisant des mucines bovines (BSM) comme contrôle. Ces dernières sont caractérisées par une forte présence d'acides sialiques (9-24%) comparés aux PGM (0.5-1%), qui peuvent être à l'origine de liaisons aspécifiques avec les capsides virales. Un procès de dé-sialylation chimique a donc été appliqué afin d'obtenir un contrôle supplémentaire en utilisant des mucines bovines dé-sialilés (BSMd).

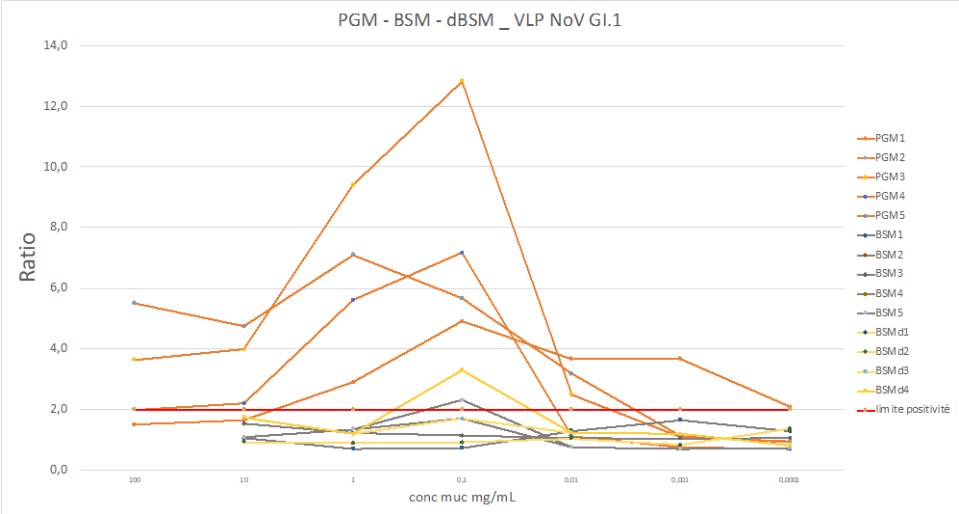

Figure 11 : Capture des NoV GI selon la concentration en PGM.

L'interaction basée sur l'intégrité de la capside virale et sur la présence/reconnaissance de sites spécifiques de liaison (HBGAs), a été mise en évidence en utilisant le test ELISA (Enzyme-Linked Immuno Assay) qui permet de détecter et comparer la présence d'immunoadsorption entre un antigène connu et un anticorps secondaire anti IgG couplé à une peroxydase. Des gammes de concentration ont été réalisées pour les PGM de 100 mg/mL à 0.0001 mg/mL et pour BSM et BSMd de 10mg/mL à 0.0001 mg/mL avec deux différentes VLPs (Virus-like particles) de NoV (GI.1 et GII.4). Nous avons mis en évidence un effet dose-réponse caractérisé par une courbe en cloche pour les PGM (le maximum de liaison aux NoV a été estimée à 0,1µg/mL) et une réponse aspécifique des BSM et BSMd qui n'ont liées qu'une seule fois les VLP (GI et GII). Aucune différence n'a été observée suite à la dé-sialylation des BSM.

5.4 Projet Envicopas

Un des objectifs de ce projet est de déterminer la structure des communautés bactériennes et la diversité des populations de *Vibrio* spp. présentes dans l'eau de mer à plusieurs périodes de l'année et *in fine* d'observer la dynamique de ces populations naturelles dans différentes conditions environnementales.
Trente-trois échantillons d'eau de mer ont été collectés de mars 2016 à février 2018 (en triplicat ; préfiltration à 8 µm puis filtration à 0.22 µm) et analysés par séquençage haut-débit (Illumina Miseq, région V3-V4 ARNr 16S). L'analyse des séquences obtenues de février à octobre 2017 montre l'homogénéité des triplicats biologiques et la plus grande diversité des communautés bactériennes obtenues à 8 µm (Figure … A). Une dynamique temporelle marquée est observée à 8 µm et met en évidence des communautés bactériennes spécifiques pour/à chaque saison (Figure 10).

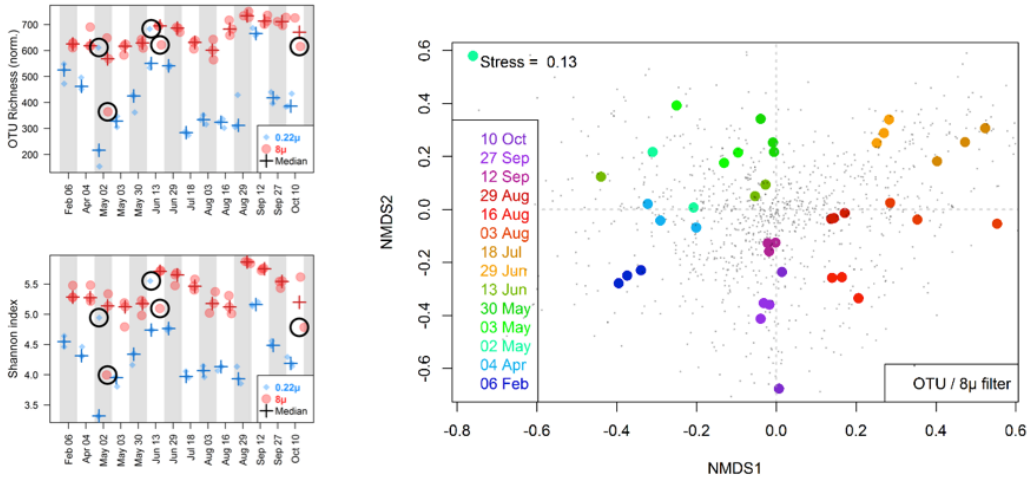

Figure 12 : Diversité et dynamique saisonnière des communautés bactériennes (8 µm et 0.22 µm) présentes dans l'eau de mer (site de La Floride, Pertuis breton, 17, France).
L'analyse de l'ensemble des données metabarcoding (mars 2016-février 2018) est en cours, ce qui permettra de comparer la structure des communautés bactériennes identifiées dans l'eau de mer en Allemagne (Sylt) et en France (Pertuis Breton).

5.5 Culture cellulaire et infectiosité virale

Jusqu'à présent, les norovirus n'étaient pas cultivables dans de tels systèmes. Le modèle de cellules souches intestinales humaines (entéroides) mis au point par nos collaborateurs de l'équipe de M. Estes (Baylor College, Houston, Texas), permet à présent de mettre en évidence la réplication de norovirus humains GII.4 et GII.3 au laboratoire. Un protocole a été optimisé pour purifier les norovirus depuis l'eau de mer en vue d'appliquer cette technique. Des expériences sont en cours pour évaluer la persistance des norovirus GII.4 et GII.3 infectieux, en comparaison avec le virus Tulane, dans l'eau de mer à 12°C. Les premiers résultats indiquent que ces souches de norovirus restent infectieuses pendant 3 à 4 semaines, et que le virus Tulane persiste moins longtemps.
Le protocole de purification des virus infectieux depuis les tissus d'huîtres est en cours d'optimisation, à partir de coquillages contaminés artificiellement car des différences de récupération ont été observées selon les souches. Par ailleurs, l'extrait à partir des coquillages présente une toxicité pour les cellules. Une approche alternative qui pourrait permettre la culture des norovirus est testée en collaboration avec N. Sauvonnet (Institut Pasteur, Paris). Elle utilise une lignée cellulaire, les Caco2, différenciées en cellules intestinales matures par une culture sous flux de milieu et sur une membrane étirable mimant le péristaltisme intestinal. Les premiers résultats sont encourageants mais doivent être confirmés.

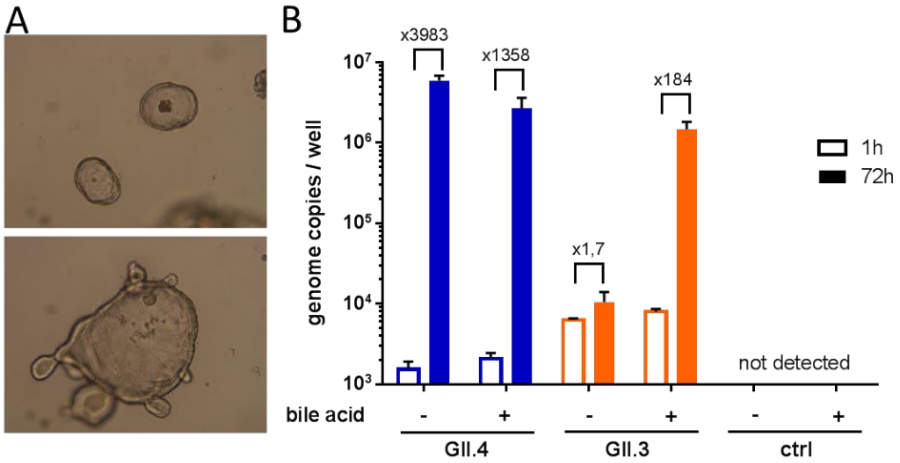

Figure 13 : Réplication de norovirus dans des entéroïdes intestinaux.
A. Entéroïdes intestinaux humains (HIE) en culture 3D, un (haut) et 5 (bas) jours après passage. B. Des suspensions de selles humaines positives pour les NoV GII.4 et GII.3 ou d'une selle négative (ctrl) ont été incubées sur des HIE différenciés en monocouche. Les acides nucléiques sont extraits après 1h ou 72h et le génome viral quantifié par rRT-PCR.

5.6 Projet IQUINOR

Ce projet, mené 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 optimale 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 est 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 lorsque nos collègues belges auront optimisé leur technique de détection. En parrallèle l'utilisation du PMAxx a été validé sur des échantillons naturellement contaminés avec une équipe espagnole. Cette étude montre que l'utilisation du PMAxx est variable selon les échantillons et ne procurent pas systématiquement une réponse claire sur l'intégrité de la capside virale (Randazzo et al. 2018).

Quantification of HuNoV GI and GII present in naturally contaminated oysters by RT-qPCR and PMAxx-Triton RT-qPCR.

Sample	Treatment	PMAxx + Triton	NoV GI[ab] (log RT-PCRU/100 µl)		NoV GII[a,b] (log RT-PCRU/100 µl)	
			Mean ± SD	R	Mean ± SD	R
13/11	Untreated	−	3.43 ± 0.21A		2.77 ± 0.06A	
		+	3.48 ± 0.18A	0	2.67 ± 0.16A	0.10
	5 min a 99 °C	−	2.99 ± 0.26A		1.93 ± 0.19B	
		+	ND	> 2.99	ND	> 1.93
13/018	Untreated	−	3.46 ± 0.08A		1.61 ± 0.23A	
		+	3.10 ± 0.10A	0.36	1.58 ± 0.20A	0.02
	5 min a 99 °C	−	3.07 ± 0.30A		1.40A[c]	
		+	2.02B[c]	1.05	ND	
14/22	Untreated	−	2.88 ± 0.34A		2.03 ± 0.13A	
		+	2.55A[c]	> 0.33	1.91 ± 0.12A	0.11
	5 min a 99 °C	−	2.02A[c]		1.35 ± 0.30B	
		+	ND	> 2.02	ND	> 1.35
14/24	Untreated	−	2.58 ± 0.51A		2.42 ± 0.58A	
		+	2.97 ± 0.09A	0	2.23 ± 0.51A	0.19
	5 min a 99 °C	−	2.33 ± 0.44A		1.66 ± 0.29A	
		+	ND	> 2.33	1.42 ± 0.02A[d]	
13/030	Untreated	−	2.67 ± 0.05A		1.85 ± 0.10A	
		+	2.57A[c]	0.10	1.13B[c]	0.72
	5 min a 99 °C	−	2.38 ± 0.10 B		ND	
		+	2.58A[c]		ND	

ND, Not Detected.
R, reduction in titers obtained between samples before and after viability pretreatment.
[a] Results are mean values from four replicates, and NoV titers were obtained by RT-qPCR using a NoV standard curve based on RT-PCRU.
[b] Values with different letters in the same column and same matrix denote significant differences between treatments ($P < 0.05$).
[c] One positive replicate out of four.
[d] Two positive replicates out of four.

Figure 14 : Quantification des NoV dans des échantillons d'huîtres naturellement contaminés par RT-PCR et apres traitement par PMAxx.

5.7 DEVIB

En 2018, la sensibilité et la spécificité des systèmes de PCR en temps réel et de la méthode NPP-PCR en temps réel sur plaques de 96 puits ont été vérifiées à partir d'ADN de souches de référence et environnementales, d'ADN plasmidique et de broyats de tissus d'huîtres et de moules artificiellement contaminés par *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 et *V. vulnificus* (Tableau 8).

Tableau 12: Détection des vibrions dans des échantillons de coquillage.

	LD Plasmides (copies de gène / puits)	**LD Broyats en CFU/g (testés : 10, 5, 1 CFU/g)**	**Inclusivité (%)**	**Exclusivité (%)**
V. cholerae	8,088	5 (huîtres)	100	100
		1 (moules)		
V. vulnificus	4,65	1 (huîtres)	100	100
		3 (moules)		

La méthode a été appliquée à des échantillons naturels (palourdes et huîtres vivantes, crevettes crues congelées) et a mis en évidence les faibles concentrations en *V. cholerae* des lots de palourdes analysés (0 à 20 UFC/g) et l'absence de contamination des huîtres. Ces concentrations sont variables mais plus élevées chez les crevettes crues (0 à $18x10^3$ UFC/g). En revanche, *V. vulnificus* n'a pas été détecté chez les lots de coquillages et crevettes analysés.

5.8 BACTRAC

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, (**Bac**téries fécales **Trac**eurs des sources de contamination dans les eaux).
Afin d'identifier les sources de contamination des eaux des bassins versants côtiers du Pays Basque, des marqueurs bactériens aviaires, détectable par PCR en temps réel, ont été tout d'abord sélectionnés de la littérature. L'efficacité de ces marqueurs, évaluée sur une collection d'extraits d'ADN d'échantillons fécaux a permis de sélectionner deux marqueurs Général Oiseaux (GFD et AV4143). Ces marqueurs ont été mis en évidence dans la moitié des échantillons aviaires testés au laboratoire (n=144 ; 52,8 % des échantillons positifs pour GFD et 46,6 % pour AV4143), et leur recherche simultanée a montré une origine aviaire dans 67,4 % de ces échantillons. Ces deux marqueurs montrent une spécificité élevée (de 100 % pour AV4143 à 96,4 % pour GFD). Un marqueur volailleLA35 a montré une présence élevée dans les litières et fumiers de volaille (87,1 % d'échantillons positifs) et une faible présence dans les fèces de volaille (29,6 %), tandis qu'un autre marqueur volaille AV43, a présenté des résultats inverse (61,3 % dans les litières de volaille et 77,8% dans les fèces de volaille). Comme pour les marqueurs General Oiseaux, ces marqueurs présentent une spécificité élevée : > 99 %.

Pour compléter le panel de marqueurs aviaires et obtenir des marqueurs plus sensibles (seuil de 80 % de sensibilité à atteindre), des séquences d'ADN bactérien spécifiques d'un hôte donné ont été recherchées par séquençage haut débit Illumina (metabarcoding ciblant la région V3-V4 du gène codant l'ARNr 16S ; plateforme Genotoul, Toulouse). Une sélection de plus de 500 fientes d'oiseaux collectées (349 échantillons d'ADN de fientes représentant 38 espèces d'oiseaux différentes, premier run) et 106 échantillons non cibles (échantillons de station d'épuration, de fèces et fumiers de bovins, de fèces et lisiers de porcs, de fèces de phoques..second run), ont été analysés. Un total de 895 OTU (Operational Taxonomic Unit ; regroupant les séquences présentant 97 % de similarité) a été obtenu lors du premier run et de 1567 OTU lors du second. Les OTU présentant une spécificité d'hôte (espèce d'oiseau) ou de groupe (espèces d'oiseaux appartenant au même genre ou groupe) ont été retenues (176 OTU ; 49 du premier run et 127 du second). Un arbre phylogénétique a été construit avec ces OTU en plus de 46 séquences supplémentaires issues de la base de données NCBI. Une pré-sélection de 38 OTU spécifiques d'une ou plusieurs sources aviaire(s) a été réalisée. Des couples d'amorces et sondes seront dessinées pour cibler ces séquences susceptibles d'être spécifiques d'un hôte aviaire.

Des expériences ont également été menées au laboratoire pour évaluer la persistance des marqueurs qPCR bactériens et d'une sélection de génotypes de *E. coli* (typés par Eric-PCR ; autre approche d'identification des sources de contamination fécale retenue dans ce projet) dans des microcosmes d'eaux de mer et d'eaux douces. Les microcosmes concernaient individuellement les marqueurs humains (apport d'eau de station d'épuration), bovins (apport de bouses de vaches), ou les marqueurs Volaille (apport de fientes de volaille). Une seconde expérimentation de l'ensemble des marqueurs (apport à la fois d'effluent de station d'épuration, de bouses de vaches et de fientes de volaille) a été réalisée. La comparaison des données acquises pour les différents marqueurs est actuellement en cours.

5.9. Projet MERLIN-MICROPLASTIQUES

En 2017, six protocoles d'extraction des acides nucléiques (AN) avaient été testés sur différents polymères (PP, PA et LDPE) préalablement immergés dans de l'eau de mer naturelle. Le kit Nuclisens et la méthode CTAB-PCI sont apparus les plus performants (qualité et quantité des AN extraits et plus faible inhibition de la PCR) et ont permis de montrer la colonisation de ces polymères par les micro-organismes marins, *Vibrio* spp., *V. alginolyticus*, *M. refringens* et par des dinoflagellés. Ces deux protocoles ont été retenus pour le suivi spatio-temporel (été 2017 à décembre 2018) mis en place sur trois sites géographiques contrastés (rade de Brest, Bassin de Marennes Oléron et lagunes corses).
L'analyse des communautés microbiennes (ARNr 16S et 18S) sur les différents polymères par des approches métabarcoding est en cours.

5.10 Projet Vivaldi

Le laboratoire intervient dans le cadre du WP 1.3 qui porte sur le développement de biocapteurs pour un système d'alerte précoce pour l'herpès virus de l'huître, les norovirus et les Vibrio
Les résultats du premier suivi terrain de l'intérêt des capteurs passifs pour suivre la contamination virale et bactérienne, réalisé dans l'estuaire de la Seudre, montrent (i) une différence significative des niveaux de contamination au cours des saisons (NoV GII) et (ii) le caractère intégratif des capteurs passifs (AllBac ; marqueur General *Bacteroidales* ; indicateur bactérien de contamination fécale) (Fig 1). L'analyse des performances des membranes montre que le nylon est significativement plus performant pour détecter *Vibrio spp* et le marqueur AllBac ; en revanche pour NoV, les performances des membranes sont équivalentes même si on note une fréquence de détection plus élevée avec la membrane zetapor.
Le protocole d'extraction des acides nucléiques à partir de différents types de membranes (LDPE, nylon et zetapor) immergées en milieu marin a été optimisé afin de limiter les effets des inhibiteurs de la (RT-)PCR. Le protocole retenu a été appliqué pour l'analyse des échantillons du deuxième monitoring (octobre 2017- octobre 2018).

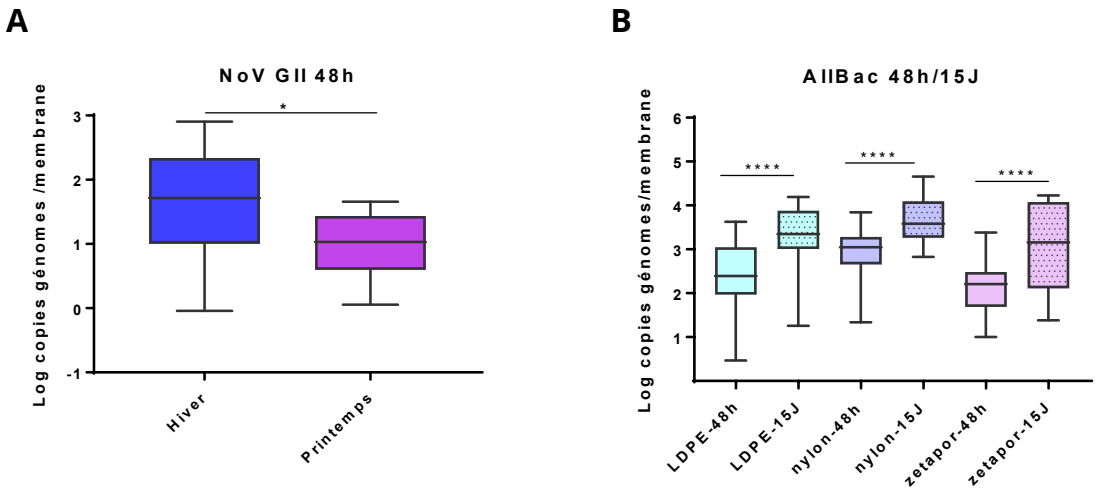

Figure 15 : Quantités de NoV GII (A) et de marqueur Bacteroidales General (AllBac) (B) sur les membranes immergées en milieu marin
*P<0.5 ; **** P<0.0001

5.11 IGA – Vibrions halophiles

Depuis plusieurs décennies, un suivi de l'évolution du compartiment bactérien a été mis en oeuvre au droit des rejets des Centres Nucléaires de Production d'Electricité (CNPE) de bord de mer. Il repose sur le dénombrement des germes totaux, des germes aérobies revivifiables et sur l'identification et le dénombrement des vibrions halophiles. Dans ce cadre et en tant que référent *Vibrio* sur le projet IGA, notre rôle est de veiller à la bonne application de la procédure technique pour l'analyse des échantillons d'eaux marines et estuariennes, à la validation des résultats, à la relecture des rapports provisoire des cinq CNPE (Le Blayais, Paluel, Penly, Flamanville et Gravelines) et de réaliser la confirmation moléculaire de l'identification biochimique de souches présomptives *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* et *V. vulnificus*. En 2018, nous avons reçu 118 souches au LSEM Brest et réalisé les analyses moléculaires comprenant la remise en culture de ces isolats sur milieux sélectifs (TCBS et CA *Vibrio*), la vérification de la pureté des isolats, la mise en culture dans milieu liquide HI 2% NaCl, l'extraction des acides nucléiques et les PCR en temps réel ciblées.

5.12 ENdYMIC : Fluctuations environnementales en milieu littoral : quel impact sur la diversité et la dynamique des communautés microbiennes et des populations de Vibrio spp.?

Dans le cadre du projet ENDYMIC, nous avons proposé 1) d'étudier la diversité des communautés bactériennes et des principaux groupes de *Vibrio* spp. d'intérêt dans les eaux littorales par des approches métabarcoding et/ou ciblées (PCR) et 2) d'évaluer la dynamique de ces communautés. L'objectif principal était d'évaluer la dynamique de ces communautés en relation avec les paramètres environnementaux et, sur la période étudiée, de déterminer les effets de changements environnementaux sur la dynamique de ces communautés. Le site atelier sélectionné pour cette étude est la station de Sainte Anne du Porzic (station du Service d'Observation en Milieu LITtoral, SOMLIT).

Dans le cadre du suivi environnemental (07/2014 – 01/2017), les plus fortes abondances de *Vibrio* spp. (vibrions totaux) déterminées par PCR en temps réel dans les échantillons d'eau de mer filtrés à 0.22 µm (bactéries libres ; filtration séquentielle à 10 µm, 3 µm et 0.22µm) ont été mises en évidence lorsque la température de l'eau était supérieure à 13°C. La figure ci-dessous confirme les variations saisonnières et inter-annuelles de la distribution de *Vibrio* spp. à la station SOMLIT de Ste Anne du Porzic.

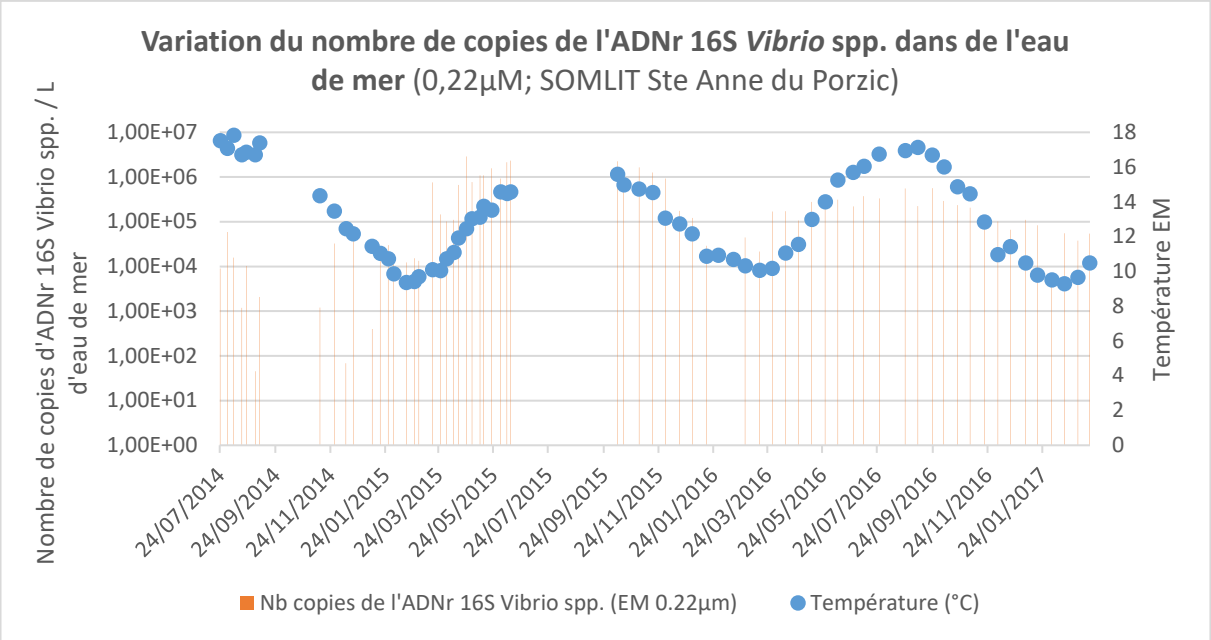

Figure 16 : Abondance des *Vibrio* spp. totaux (nb de copies d'ADNr 16S *Vibrio* spp./L-1) en fonction de la température de l'eau de mer.

Aucune des espèces de *Vibrio* d'intérêt ciblées pour cette étude (*V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* et *V. tapetis*) n'a été mise en évidence dans les échantillons de mer prélevés entre juillet 2014 et janvier 2017.

Le traitement des données, l'analyse des séquences (NGS ARNr 16S et ftsZ) et l'étude de la relation entre la composition des communautés bactériennes et des groupes majeurs de Vibrio spp. et les facteurs environnementaux sont en cours.

5.13 GLYNOVENT Glycannes liant norovirus et enterobacter : quel impact pour la sécurité sanitaire des eaux littorales ?

Les stations d'épuration rejettent en milieu côtier littoral divers micro-organismes d'origine humaine dont les norovirus (NoV). De plus ces virus sont rarement excrétés en particules isolées mais sont le plus souvent sous forme d'agglomérat de particules virales ou adsorbés à d'autres particules inertes ou éventuellement des bactéries entériques. Ces agglomérats outre leur rôle protecteur probable lors des traitements épuratoires, contribuent à leur dissémination. On sait depuis quelques années que les huîtres expriment des glycannes similaires aux antigènes de groupe sanguin tissulaires (HBGA), les ligands des NoVs chez l'Homme. Certaines souches d'entérobactéries exprimant des ligands de nature similaire sont capables de capter des NoVs par l'intermédiaire de ces ligands et en particulier une souche d'Enterobacter SENG6 a été caractérisée. En utilisant des pseudo-particules virales (VLPs) nous avons réalisé des essais de reconnaissance bactérie-virus en utilisant la cytométrie en flux.

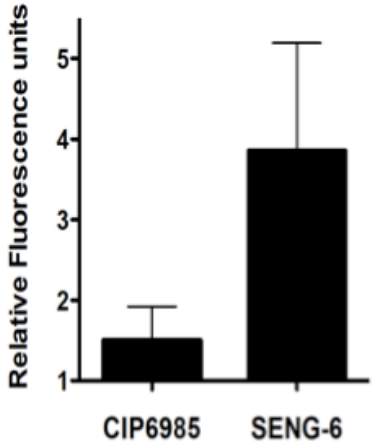

Figure 15 : Détection d'un motif glycannique proche d'un antigène de groupe sanguin (Fucα2Galβ4GlcNAc) sur la souche d' Enterobacter cloacae SENG-6 par spectrométrie en flux en utilisant une souche d'Enterobacter CIP6985 en contrôle. (les valeurs représentent la fluorescence relative par rapport au bruit de fond).

5.14 Projet ROME

Le projet ROME (Réseau d'Observatoires pour la recherche en Microbiologie Environnementale intégrée) est un projet multidisciplinaire à l'Ifremer. Ce projet repose sur l'application de sciences '-omiques' et l'utilisation de l'ADN (ou ARN) environnemental. Le but est d'observer les niveaux et variations des différents microorganismes présents dans des sites sélectionnés, sur une échelle de temps adéquate aux variations de communautés. Ces microorganismes sont les protistes, le phytoplancton et concernant le LSEM, bactéries et virus.
Les échantillons prélevés dans le cadre de cet observatoire sont :
- de l'eau de mer, représentant l'apport en microorganisme provenant du large
- de l'eau d'estuaire, représentant l'apport en microorganisme provenant du littoral et l'impact humain/animal
- des coquillages, représentatif de la production du lieu de prélèvement (huitres ou moules).

Pour les échantillons de coquillages, le protocole pour l'analyse métagénomique de la communauté virale est mise au point lors de la thèse de S.Strubbia.
L'analyse de la communauté virale dans de l'eau de mer ou saumâtre nécessite une mise au point. En effet le laboratoire a développé des méthodes pour l'eau issue de station d'épuration (eau douce, charge forte et MES élevés) mais pas pour des eaux salées et à faible charge virale. Des recherches bibliographiques ont permis de sélectionner différents protocoles qui devaient répondre à plusieurs critères :
- analyse d'un volume d'1L minimum
- eau de mer ou saumâtre
- le minimum d'étapes pour éviter une perte d'information.
Le choix s'est porté sur une méthode de filtre chargé négativement testé sur des virus ADN et ARN et une méthode de floculation des virus. Des tests ont été réalisées sur 1l d'eau de mer contaminé par une eau de station d'épuration (2ml)

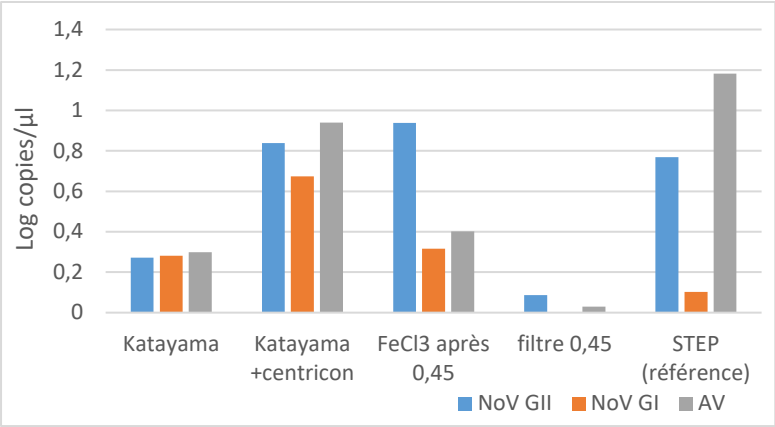

Figure 16 : Résultat par RT-PCR des différentes méthodes d'extractions

La méthode montrant les meilleurs résultats pour les virus entériques à ARN est une combinaison des 2 techniques de concentration, à savoir une filtration sur filtre à charge négative et une floculation du filtrat pour maximiser la récupération. Des tests doivent être menés pour la détection d'autres virus ainsi que sur des échantillons naturels.

6. Coordination REMI

l'Ifremer apporte un appui scientifique et technique à l'Etat pour la mise en œuvre du REMI (Réseau de surveillance microbiologique des zones de production de coquillages). Le rôle de l'Ifremer au sein du dispositif a évolué au 1er janvier 2018, avec désormais une mission d'assistance à maîtrise d'ouvrage (AMOA). Ce nouveau rôle inclut la rédaction des procédures nationales et locales de surveillance, la définition de la stratégie d'échantillonnage, un appui des opérateurs de la surveillance, ainsi que la bancarisation, la diffusion et la valorisation des données. L'appui fourni par Ifremer comprend notamment le suivi d'indicateurs (taux de réalisation, respect des délais et de la localisation des prélèvements) qui contribuent au bon déroulement des opérations à la fois à l'échelle nationale mais aussi pour chaque département.

En 2018, 409 lieux de prélèvement ont été prélevés régulièrement, représentant 4 607 résultats obtenus à la fois dans le cadre d'une surveillance programmée et d'une surveillance évènementielle en ces de risque de contamination ou de contamination avérée. Comparativement à 2017, le nombre de résultats obtenus est en hausse de 7.5%. 25 rapports ont permis de mettre à disposition des services de l'état les éléments nécessaires à la gestion du risque sanitaire microbiologique des zones de production de coquillages. Le traitement des données à l'échelle nationale indique une bonne qualité microbiologique (A) pour 26% des 367 zones de production surveillées, 66% sont de qualité moyenne (B), et 8 % sont de mauvaise ou très mauvaise qualité (C ou au-delà). L'analyse des tendances sur la période 2009-2018 (10 ans) indique une amélioration de la qualité bactériologique sur 53 lieux de prélèvement, une dégradation sur 18 lieux et l'absence de tendance significative sur les autres lieux.

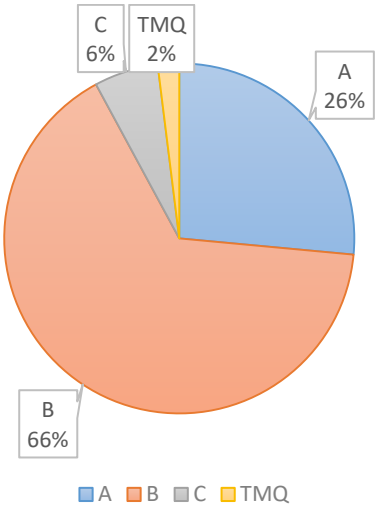

Figure 17 : Qualité microbiologique (A, B, C ou Très mauvaise qualité) des zones de production de coquillages suivies par le REMI, période 2016-2018

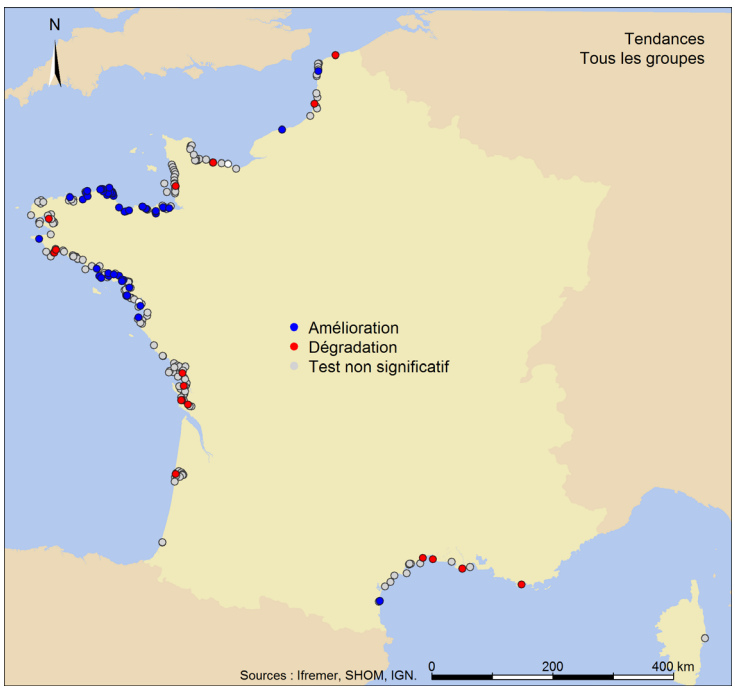

Figure 18: Tendances des niveaux de contamination sur les lieux REMI, période 2009-2018

Complémentairement au REMI, l'Ifremer réalise des études sanitaires pour caractériser l'origine des contaminations microbiologiques, et optimiser la stratégie d'échantillonnage du REMI. Le LSEM a coordonné 5 études qui ont été finalisées en 2018 : deux en Charente-Maritime (Bourgeois-Daire, Ors-la-Casse), une en Loire-Atlantique (Traict de Pen Bé), une dans le Pas-de-Calais (Audreselles-Ambleteuse) et une dans l'Hérault (lagune de Thau). Huit autres études ont été lancées et aboutiront en 2019 ou 2020 : deux en Ille-et-Vilaine (secteur de la Rance), trois dans les Côtes d'Armor (secteur de la baie de Paimpol), une dans le Pas-de-Calais (baie de Wissant), une en Vendée (les Sableaux) et une dans le Calvados (Cabourg).

7. Conclusion et perspectives 2019

L'année 2018 montre que notre laboratoire s'est une nouvelle fois pleinement investi dans ses missions, et nous a apporté une nouvelle évidence de l'importance de mener conjointement les actions de recherche, surveillance et référence. En effet, les évolutions ont été nombreuses en cette année 2018: passage en AMO pour le REMI, développement de la métagénomique et obtention des premiers résultats, mise en place des études de zones, et suppression du LRUE pour la Microbiologie des Coquillages. Conscient de ces évolutions il est important de conserver la dynamique de recherche. En 2018 trois projets fédérant plusieurs équipes de divers instituts ont été soumis et un projet Européen. Seul ce dernier a été accepté (projet EFSA sur l'application des nouvelles méthodes de métagénomique pour caractériser la diversité des norovirus dans les huîtres analysées lors de l'étude de prévalence.

Cette année écoulée nous a également permis d'accueillir des stagiaires, des visiteurs, ou personnes en CDD. Ces échanges, de durée variable, sont importants pour l'équipe nous permettant de partager notre compétence, de discuter de nos résultats et de transmettre l'intérêt que nous portons à la microbiologie sanitaire. En particulier en octobre nous avons eu l'honneur de la visite de Mary Estes (Baylor College of Medicine), inventeur de la méthode de culture des norovorius sur les entéroides. Grace à collaboration établie avec son équipe, notre laboratoire est l'un des rares laboratoires européen à développer cette technique.

ANNEXES

Production scientifique et technique

Revue à comité de lecture :

Bosch A., Gkogka E., Le Guyader S. F., Loisy-Hamon F., Lee A., Van Lieshout L., Marthi B., Myrmel M., Sansom A., Schultz A.-Ch., Winkler A., Zuber S., Phister T. (2018). **Foodborne viruses: Detection, risk assessment, and control options in food processing**. *International Journal of Food Microbiology*, 285, 110-128. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.001

Feurer C., Le Roux A., Rossel R., Barnaud E., Dumarest M., Garry Pascal, Pavio N. (2018). **High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses**. *International Journal of Food Microbiology*, 264, 25-30. Publisher's official version : https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.013 , Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00405/51647/

Jarde E., Jeanneau L., Harrault L., Quenot E., Solecki O., Petitjean P., Lozach S., Cheve J., Gourmelon M. (2018). **Application of a microbial source tracking based on bacterial and chemical markers in headwater and coastal catchments**. *Science of The Total Environment*, 610-611, 55-63. Publisher's official version : https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.235, Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00395/50597/

Miura T., Schaeffer J., Le Saux J.-C., Le Mehaute Ph., Le Guyader S. F. (2018). **Virus Type-Specific Removal in a Full-Scale Membrane Bioreactor Treatment Process**. *Food and Environmental Virology*, 10(2), 176-186. Publisher's official version : https://doi.org/10.1007/s12560-017-9330-4 , Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00414/52548/

Polo D., Schaeffer J., Teunis P. Buchet V., Le Guyader S. F. (2018). **Infectivity and RNA Persistence of a Norovirus Surrogate, the Tulane Virus, in Oysters**. *Frontiers In Microbiology*, 9(716), 8p.Publisher's official version : https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00716 , Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00436/54736/

Randazzo W., Khezri M., Ollivier J., Le Guyader S. F., Rodriguez-Diaz J., Aznar R., Sanchez G. (2018). **Optimization of PMAxx pretreatment to distinguish between human norovirus with intact and altered capsids in shellfish and sewage samples**. *International Journal of Food Microbiology*, 266, 1-7. Publisher's official version : https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.11.011 , Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00411/52208/

Rince A., Baliere Ch., Hervio-Heath D., Cozien J., Lozach S., Parnaudeau S., Le Guyader F. S., Le Hello S., Giard J.-Ch., Sauvageot N., Benachour A., Strubbia S., Gourmelon M. (2018). **Occurrence of Bacterial Pathogens and Human Noroviruses in Shellfish-Harvesting Areas and Their Catchments in France**. *Frontiers in Microbiology*, 9, 2443(17p.). Publisher's official version : https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02443 , Open Access version : https://archimer.ifremer.fr/doc/00461/57243/

Schaeffer J., Treguier C., Piquet J.-C., Gachelin S., Cochennec-Laureau N., Le Saux J.-Cl., Garry P., Le Guyader S. F. (2018). **Improving the efficacy of sewage treatment decreases norovirus contamination in oysters**. *International Journal of Food Microbiology*, 286, 1-5. https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.07.016

Note (de synthèses, de veille prospective ou technologique…) :

Gourmelon Michele, Le Traon Pierre-Yves, Andre Xavier, Farcy Patrick, Garziglia Sebastien, Leblond Emilie, Matabos Marjolaine, Maze Guillaume, Petit De La Villeon Loic, Petton Sebastien, Soudant Dominique, Trenkel Verena (2018). Ifremer (2018). **Quelle(s) observation(s) et modélisation(s) associée(s) pour demain ?** Rapport du groupe 3c - Réflexion stratégique 2017-2018. https://w3z.ifremer.fr/strategie/content/download/112174/1381293/file/3c-observation+et+modelisations+pour+demain.pdf?version=2

Rapports

Garry Pascal, Kaelin Gaelle, Kergaravat Cedric, Veron Antoine, Wacrenier Candice (2018). **Essai inter-laboratoires Coquillages Vivants. Essai du 10 avril 2018 : recherche des Salmonella Spp. dans les coquillages vivants**. Rapport définitif n° 18/01 Sa-Hu.

Garry Pascal, Kaelin Gaelle, Kergaravat Cedric, Veron Antoine, Wacrenier Candice (2018). **Essai inter-laboratoires Coquillages Vivants. Essai du 10 avril 2018 : dénombrement des Escherichia Coli dans les coquillages vivants**. Rapport définitif n° 18/01 Ec-Hu.

Ollivier Joanna, Garry Pascal, Wacrenier Candice, Le Guyader Soizick (2018). **Essai inter-laboratoires. Essai du 9 avril 2018 : recherche des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les coquillages**.

Crottier Anais, Abadie Eric, Brun Melanie, Piquet Jean-Come, Fiandrino Annie (2018). **Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole.Départements des Pyrénées orientales, de l'Aude, de l'Hérault et du Gard. Edition 2018**. ODE/UL/LER/LR/18.11. https://archimer.ifremer.fr/doc/00445/55635/

Marzin Anahita, Crottier Anais, Piquet Jean-Come, Abadie Eric, Roque D'Orbcastel Emmanuelle, Fiandrino Annie (2018). **Etude sanitaire de la zone n° 34.39 "Lotissements conchylicoles de la lagune de Thau" Groupe III. Département de l'Hérault**. ODE/UL/LER/LR/18.14. https://archimer.ifremer.fr/doc/00459/57056/

Piquet Jean-Come (2018). **Plan d'échantillonnage national du Réseau de Surveillance Microbiologique des Zones de Production de Coquillages (REMI). Prescriptions du réseau de controle officiel microbiologique des coquillages dans les zones de productions classées**. https://archimer.ifremer.fr/doc/00436/54754/

Piquet Jean-Come (2018). **Procédure nationale de la surveillance sanitaire microbiologique des zones de production de coquillages. Prescriptions du réseau de surveillance**

microbiologique des zones de production (REMI).https://archimer.ifremer.fr/doc/00461/57260/

Piquet Jean-Come, Gabellec Raoul, Manach Soazig, Retho Michael, Cochennec-Laureau Nathalie (2018). **Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département du Morbihan. Edition 2018**. RBE/SG2M/LSEM/18.01. https://archimer.ifremer.fr/doc/00450/56157/ **diversité des norovirus dans les huîtres**. 20èmes Journées Francophones de Virologie, 28-29 mars 2018, à Paris.

Rumebe Myriam, Auby Isabelle, Hervio Heath Dominique, Sottolichio Aldo, Sautour Benoit, Savoye Nicolas, Derriennic Herve, Blanchet Hugues, Leconte Michel, Gouilleux Benoit, Fouet Marie, Agion Tony (2018). **Surveillance Ecologique du site du "Blayais" - année 2017**. RST ODE/UL/LER/AR/18.004. https://archimer.ifremer.fr/doc/00477/58876/

Schmitt Anne, Cochennec-Laureau Nathalie, Piquet Jean-Come (2018). **Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département : Loire-Atlantique. Edition 2018**. RST/LER/MPL/18.05. https://archimer.ifremer.fr/doc/00440/55198/

Treguier Cathy, Schmitt Anne, Cochennec-Laureau Nathalie, Piquet Jean-Come (2018). **Etude sanitaire du traict de Pen Bé. Zone N° 44.03. Département de Loire-Atlantique**. RST/LER-MPL/18-03. https://archimer.ifremer.fr/doc/00425/53629/

Rapports d'activité

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2018). **Rapport d'activités 2017. Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie. Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages**. https://archimer.ifremer.fr/doc/00465/57686/

Lapegue Sylvie, Bechemin Christian, Le Guyader Soizick, Stavrakakis Christophe, Rivet Florence (2018). **Rapport d'activités 2017 de l'unité SG2M, Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques**. R.RBE/SG2M/2018-01.

Expertises / Avis

Expertise

Morin Dimitri, Piquet Jean-Come (2018). **Expertise pour la révision des points REMI des secteurs de La Seudre et de Marsilly**. DDTM 17 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer de Charente-Maritime, Service Activités Maritimes, Cultures Marines et Pêches, La Rochelle, Ref. SLR/BC/JT-18-2085 - Expertise 17-097, 18p.

Avis

Bizzozero Lucie, Piquet Jean-Come, Cochennec-Laureau Nathalie (2018). **Demande d'avis sur le dossier de déclaration pour la construction de la nouvelle station d'épuration sur la commune de Merlevenez**. DDTM 56 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer du Morbihan, Service Eau, Nature et Biodiversité, Vannes, Ref. LER/MPL18-06 - N° 56-2017-00335, 4p.

Bizzozero Lucie, Piquet Jean-Come, Souchu Philippe, Cochennec-Laureau Nathalie (2018). **Demande d'avis sur le dossier de déclaration pour la création d'une station d'épuration sur la commune de Locoal Mendon**. DDTM 56 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer du Morbihan, Service Eau, Nature et Biodiversité, Vannes, Ref. LER/MPL 16-69 - N° 56-2018-00349, 5p.

Fiandrino Annie, Piquet Jean-Come (2018). **Avis sur l'opportunité de procéder à un classement alternatif de la zone de l'étang du Prévost**. DDTM 34 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer de l'Hérault, DML - Unité : Cultures Marines et Littoral, Sète, Ref. ODE/UL/LER/LR 18/01 - Mail du 7 décembre 2017, 6p.

Piquet Jean-Come, Schmitt Anne, Cochennec-Laureau Nathalie (2018). **Demande de prolongation de l'arrêté d'exploitation du gisement naturel d'huîtres creuses au sein de la zone 44.09 Estuaire Loire**. DDTM 44 - Direction Départemental de la Mer et des Territoires de Loire-Atlantique, Saint-Nazaire, Ref. LER/MPL 18.23/Tm, 2p.

Piquet Jean-Come, Schmitt Anne, Cochennec-Laureau Nathalie (2018). **Demande de deuxième prolongation de l'ouverture du gisement naturel d'huîtres creuses à éclipse au sein de la zone 44.09 Estuaire Loire**. DDTM 44 - Direction Départemental de la Mer et des Territoires de Loire-Atlantique, Saint-Nazaire, Ref. LER/MPL/16.65/tm, 2p.

Posters

Desdouits Marion, Ollivier Joanna, Schaeffer Julien, Le Guyader Soizick (2018). **Etude par metabarcoding de la diversité des norovirus dans les huîtres**. 20èmes Journées Francophones de Virologie, 28-29 mars 2018, à Paris.

Garry Pascal, Piquet Jean-Come, Veron Antoine, Wacrenier Candice, Besnard Alban, Le Guyader Soizick (2018). **Impact de la conservation sur le dénombrement des E. coli dans les mollusques bivalves vivants**. 14ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie. 1er au 3 octobre 2018, Paris.

Gourmelon Michele, Serghine Joelle, Boukerb Amine, Cauvin E, Meunier M, Penny C, Walczak C, Denis M, Rince A (2018). **Prevalence of Campylobacter spp. in shellfish from shellfish-harvesting areas in France**. MedVetPATHOGENS 2018 - 5th Prato Conference on Animal Bacterial Pathogens. 8-11 october 2018, Italy.

Gourmelon Michele, Serghine Joelle, Boukerb Mohamed, Cauvin E, Meunier M, Penny C, Walczak C, Denis M, Rince A (2018). **Prévalence des Campylobacter spp. dans des coquillages issus de zones conchylicoles en France**. 14ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie. 1er au 3 octobre 2018, Paris.

Monnot Mathias, Pinchai Chamaiporn, Cordier Clemence, Lefevre Sebastien, Le Mennec Cecile, Le Guyader Soizick, Stavrakakis Christophe, Moulin Philippe (2018). **Concentration by membrane filtration before wet air oxidation for full intensified wastewater treatment**. Euromembranes 2018. 9th - 13th July 2018, Valencia.

Serghine Joelle, Gourmelon Michele, Boukerb Mohamed, Cauvin E, Meunier M, Penny C, Walczak C, Denis M, Cheve Julien (2018). **Prévalence des Campylobacter spp. dans les fientes d'oiseaux de bord de mer en Bretagne, France**. 14ème Congrès National de la Société Française de Microbiologie. 1er au 3 octobre 2018, Paris.

Communications sans actes

Denis Martine, Rose Valerie, Nagard Berangere, Cauvin Elodie, Esperet Delphine, Gourmelon Michele, Cozien Joelle, Boukerb Mohamed, Rince Alain, Rince Isabelle (2018). **CAMPYSHELL Campylobacter dans les coquillages : sources de contamination et risque pour l'homme**. 34ème Salon National de la conchyliculture et des cultures marines, 17-18 octobre 2018, Vannes.

Garry Pascal (2018). **Bilan des analyses officielles réalisées en 2017 par le LNR Microbiologie des coquillages**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2018). **Actualités en surveillance LNR microbiologie des coquillages**. COPIL DGAL - Direction Générale de l'ALimentation. 08 mars 2018.

Garry Pascal, Le Guyader Soizick (2018). **Analyses officielles. Bilan 2017**. COPIL DGAL - Direction Générale de l'ALimentation. 08 mars 2018.

Gourmelon Michele (2018). **Contamination microbienne des eaux littorales**. Rencontre avec des Parlementaires de l'Assemblée Nationale. le 5 mars 2018, Plouzané

Gourmelon Michèle, Denis Martine, (2018) Projet CampyShell : *Campylobacter* dans les coquillages, source de contamination et risque pour l'homme. Table ronde consacrée aux projets « Innovation en aquaculture soutenues par le FEAMP ». Salon de la conchyliculture et des cultures marines, 18 octobre, Vannes

Gourmelon M. (2018). **Le continuum Terre-Mer; des bactéries des bassins versants aux bivalves filtreurs**. Atelier Microbiologie, Nantes, 10 décembre 2018.

Hervio Heath *et al.* (2018). **Interactions/Plastiques/Biodiversité/Polluants.** Séminaire interne Microplastiques, Brest, 2 février 2018.

Hervio Heath Dominique (2018). **Structure et dynamique spatio-temporelles des communautés microbiennes dans les écosystèmes côtiers**. Atelier Microbiologie, Nantes, 10 décembre 2018.

Hubert Francoise, Morga Benjamin, Lozach Solen, Veron Antoine, Hervio Heath Dominique, Gourmelon Michele, Le Guyader Soizick (2018). **Développement de capteurs passifs pour détecter des virus et bactéries en milieu marin**. Réunion projet VIVALDI - Preventing and mitigating farled bivalve diseases. 29 novembre 2018 - Blainville-sur-Mer.

Hubert Francoise, Morga Benjamin, Lozach Solen, Veron Antoine, Hervio Heath Dominique, Gourmelon Michele, Le Guyader Soizick (2018). **Détection de virus et bactéries à l'aide de capteurs passifs en milieu marin côtier: étude comparative. WP1**. VIVALDI : Journées de restitution interne-Ifremer. 27 au 29 novembre 2018, Île de Tatihou, France.

Hubert Francoise, Morga Benjamin, Lozach Solen, Veron Antoine, Hervio Heath Dominique, Gourmelon Michele, Le Guyader Soizick (2018). **Détection des virus et bactéries en milieu marin cotier à l'aide de capteurs passifs: étude comparative**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Hubert Francoise, Morga Benjamin, Lozach Solen, Veron Antoine, Hervio Heath Dominique, Gourmelon Michele, Le Guyader Soizick (2018). **Détection de virus et bactéries à l'aide de capteurs passifs en milieu marin côtier: étude comparative. WP1**. VIVALDI : Journées de restitution interne-Ifremer. 27 au 29 novembre 2018, Île de Tatihou, France.

Lozach Solen, Quenot Emmanuelle, Veron Antoine, Vallade Emilie, Garry Pascal, Hervio Heath Dominique, Copin Stephanie, Revoux Nina (2018). **Vibrio spp. potentiellement entéropathogènes pour l'homme dans les produits de la mer: surveillance et réglementation**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Piquet Jean-Come (2018). **Bilan 2017 et perspectives 2018 du REMI**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Rocq Sophie (2018). **Etudes sanitaires**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Schaeffer Julien, Treguier Cathy, Le Guyader Soizick, Gachelin Sonia (2018). **Station d'épuration modernisée: qualité des coquillages améliorée**. Journée pour la santé, l'environnement et la microbiologie 2018. 18 octobre 2018, Nantes.

Participation à la formation

Participation à un jury de thèse ou HDR

Hervio Heath Dominique. Rapporteur de l'HDR de Marie-Agnès Travers. Regard à travers les *Vibrio* pour mieux comprendre les interactions hôtes-bactéries-environnement. Université de La Rochelle, 15 mai 2018.

Soizick Le Guyader :
- Laure Barbé, Ecole doctorale Biologie Santé, Nantes, membre du Jury
- Samuel Lebourgeois, Etude du cycle infectieux du virus de l'hépatite A (VHA) et développement d'un modèle in vitro pour mettre en évidence son infectiosité, Institut des sciences et industries du vivant et de l'environnement (AgroParisTech), École doctorale n°581 Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES) - Rapporteur

Participation à un comité de thèse

Michèle Gourmelon, Lorine Derongs, Irstea, Rennes, 20 juin 2018. Impact des paramètres majeurs de la méthanisation à la ferme sur le devenir des *C. perfringens* et les gènes de résistance aux antibiotiques : conséquences sur la dissémination des spores et de l'antibiorésistance.

Hervio-Heath Dominique. Participation au comité de thèse de Julia Mougin (1ère année). Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose de bar (*Dicentrarchus labrax*). Université Littoral Côte Opale, ULCO, Boulogne sur Mer, 23 novembre 2018.

Formation donnée

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
Joelle COZIEN-SERGHINE	UBO	Master I Ecologie microbienne en milieu marin	TP/TD Isolement et Identification de *Campylobacter* et *Vibrio* à partir d'eaux douce/de mer	15
Gourmelon Michèle	UBO	Master II Microbiologie Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée (MFA-UBO)	Contamination microbienne du littoral. Identification des sources de contamination fécale	1h30
Gourmelon Michèle	UBO	Master II "Sciences de la Mer et du Littoral", mention Biologie	Les bactéries d'origine fécale en zone côtière	3h

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
Gourmelon Michèle	UBO	Master I Microbiologie Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée (MFA-UBO)	La qualité microbienne des eaux. Aspects réglementaires.	1h30
Emmanuelle Quenot	UBO	Master I Microbiologie Parcours Microbiologie Fondamentale et Appliquée (MFA-UBO)	Gestion du risque microbiologique	2
Soizick Le Guyader	Université François Rabelais, Tours	Master 2 ICMVAT et IDOH conjoints	Viral contamination of the environment	2
	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
	Université de Nantes	Master 2, Science de l'Aliment	Les virus dans les produits de la mer : épidémiologie et techniques de détection,	2
	Institut Pasteur, Paris	Master 2 Virologie Fondamentale,	Calicivirus : épidemiologie et rôle de l'environnement	2
	Oniris, Nantes	Master 2 MAN-IMAL	Shellfish and human enteric viruses	2
	Brest, faculté de Médecine	Master 2 MFA Virologie	Virus entériques et environnement.	3
	Caen	Master 1 (	Les virus humains dans l'environnement littoral.	2
Sylvain Parnaudeau	Nantes	ONIRIS Ingénieur 3ème année	Virus dans les aliments	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

- Membre du comité scientifique des Editions Lavoisier Tec & Doc Sciences et Techniques Agro-alimentaires

Dominique Hervio-Heath :

- CEN/TC 275– food analysis, WG 6 – Microbial contamination TAG 15, *Vibrio*.
- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la microbiologie des Coquillages (*Vibrio*)
- Projet IGA (EDF/Ifremer) – Référente/experte *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'

Sigles / abréviations

ARS : Agence Régionale de Santé

CIRE : Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie

CLI : Chair et Liquide Intervalvaire

CRC : Comité Régional de la Conchyliculture

DDPP : Direction Départementale de la Protection des Populations

DDTM : Direction Départementale des Territoires et de la Mer

DGAl : Direction Générale de l'Alimentation

EIL : Essai Inter-Laboratoire

LNR : Laboratoire National de Référence

LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne

LSEM : Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie

NPP : Nombre le Plus Probable

PSPC : Plan de Surveillance Plan de Contrôle

RASFF : Rapid Alert System for Food and Feed

REMI : Réseau de contrôle Microbiologique des zones de production conchylicole

SPF : Santé Publique France

TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective