

Département Ressources Biologiques et Environnement
Unité Santé Génétique et Microbiologie des Mollusques
Auteurs : Garry Pascal et Le Guyader Soizick

Collaborateurs :

Desdouit Marion, Besnard Alban, Euller Gabriel, Gourmelon Michèle, Hervio-Heath Dominique, Hubert Françoise, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cédric, Le Mennec Cécile, Lozach Solen, Maillot Jessica, Ollivier Joanna, Parnaudeau Sylvain, Piquet Jean-Côme, Rocq Sophie, Schaeffer Julien, Serghine Joëlle, Sorée Marion, Vallade Emilie, Véron Antoine, Wacrenier Candice.

RAPPORT D'ACTIVITES 2020

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



Fiche documentaire

Titre du rapport : Rapport d'activités 2020 – Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie.	
Référence interne : RBE/SG2M/LSEM 21-03 Diffusion : <input checked="" type="checkbox"/> libre (internet) <input type="checkbox"/> restreinte (intranet) – date de levée d'embargo : AAA/MM/JJ <input type="checkbox"/> interdite (confidentielle) – date de levée de confidentialité : AAA/MM/JJ	Date de publication : 04/2021 Version : 1.0.0 Référence de l'illustration de couverture 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 2020. 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, SARS-CoV-2, coquillages. Activité de référence, REMI.	
Comment citer ce document : P Garry, S Le Guyader, (2021), rapport d'activités 2020, laboratoire santé, environnement et microbiologie, Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages.	

Commanditaire du rapport : Direction Générale de l'Alimentation	
Nom / référence du contrat : RBE/SGMM/LSEM 21-03 <input type="checkbox"/> Rapport intermédiaire (réf. bibliographique : XXX) <input checked="" type="checkbox"/> 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, pascal.garry@ifremer.fr	RBE/SG2M/LSEM
Le Guyader Soizick, soizick.le.guyader@ifremer.fr	RBE/SG2M/LSEM
Validé par : Soizick Le Guyader	

Table des matières

1. introduction	5
2. Rappel des objectifs	5
3. Moyens et effectifs	5
3.1 Personnels Ifremer :	6
3.2 Doctorants	6
3.3 Post-doctorants	6
3.4 Stagiaires	7
3.5 Apprentis en alternance	7
4. Actions liées aux missions de LNR	8
4.1 Démarche qualité	8
4.2 Coordination technique des laboratoires agréés	8
4.2.1 Organisation des essais d'aptitude pour les laboratoires agréés - Appui à la démarche d'accréditation des laboratoires.....	8
4.2.2 Expertises, avis, assistance technique	9
4.3 2 ^{ème} Workshop organisé par le LRUE virus	9
4.4 Assistance à l'administration.	11
4.5 Normalisation	11
4.6 Analyses officielles.....	11
4.7 Participation aux essais du LR-UE et PHE	12
4.8 Diffusion de l'information à l'administration et/ou aux laboratoires agréés.	13
4.9 Développement /validation de méthode	13
4.9.1 Culture cellulaire et infectiosité virale.....	13
4.9.2 Développement NGS	14
5. Actions liées aux Projets de Recherche	17
5.1 Goyave (ANR n°19-CE35-0014).....	17
5.2 Projet ROME (Projet institut).....	17
5.3 Projet Moonstone	18
5.4 Projet Phobie (Projet DS-PDG).....	19
5.5 Projet VEO (Projet H2020 n° 874735).....	20
5.6 Projet APINOV (projet Feamp n°509528)	21
5.7 Projet DISCO (Projet ANR RA-Covid, avec un complément par la région Pays de la Loire, et des contributions de la direction scientifique et de la direction générale d'Ifremer.....	21
6. Participation du LSEM à l'observatoire OBEPINE	23
7. Coordination REMI.....	23

8. Conclusion et perspectives 2021	24
Production scientifique et technique	25
Sigles / abréviations.....	30
Résolutions du LRUE virus.....	31

1. introduction

L'année 2020 aura été marquée par cette pandémie qui montre l'importance de la recherche dans le domaine de la microbiologie. Dès l'apparition de la crise sanitaire, le LSEM avec un appui fort de la direction générale, a mis en place un plan d'action pour alerter sur la présence possible de SARS-CoV-2 en milieu littoral. Ce plan d'action a permis de mettre en place un projet de recherche original mais également a mis en évidence la cohésion au sein de l'institut avec l'adhésion immédiate des collègues des LERs, le soutien de notre direction scientifique et du département.

Il n'en reste pas moins que cette année aura été compliquée pour réaliser les travaux prévus. Cependant, malgré les contraintes liées aux confinements, et aux manques de réactifs, nous avons réussi à avancer dans les divers projets et à maintenir l'accueil d'étudiants parfois en télétravail.

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 ainsi que 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 2020 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 DGAI (Sous-Direction de la Sécurité Sanitaire des Aliments), à la collecte et à la gestion des informations nationales et européennes liées à des alertes sanitaires,
- réaliser des analyses bactériologiques et virologiques sur des échantillons qui lui sont confiées directement par le ministère ou à sa demande dans des situations qui ont ou peuvent avoir des incidences sur la santé publique.

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'Île 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 (Nantes)

BREST		NANTES	
GOURMELON Michèle	C - 100%	DESDOUIT Marion	C – 100%
HERVIO HEATH Dominique*	C - 100%	GARRY Pascal	C - 100%
LOZACH Solen*	T - 80%	HUBERT Françoise	C - 80%
SERGHINE Joëlle**	T - 80%	KAELIN Gaëlle	C - 100%
		KERGARAVAT Cédric [#]	C - 100%
		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%

* : départ au 1^{er} avril 2020, **: départ au 1^{er} juin 2020, [#]: départ au 1^{er} novembre 2020. C: cadre, T : technicien

Personnels titulaires d'un contrat à durée déterminée

Nom – Prénom	Qualification	Date arrivée	Date départ	Type contrat	Site
Besnard Alban	Ingénieur	01/07/20	30/04/21	Projet Moonstone	Nantes
Jousse Sarah	Technicienne	01/09/20	31/08/21	Plan d'action SARS-CoV-2/DISCO	Nantes

3.2 Doctorants

Nom – Prénom	Début de thèse	Date de soutenance	Sujets	Ecoles Doctorales d'inscription	Encadrement scientifique
Sorée Marion	01/10/18		Mécanismes de virulence de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , bactérie potentiellement pathogène pour l'homme	ED Mer & Littoral, Université Bretagne Occidentale, Brest	D. Hervio Heath
Euller Gabriel	01/10/19		Rôle des glycanes dans la sélection et de la persistance des virus entériques humains dans les huîtres et le milieu littoral	ED Mer & Littoral, Université Nantes	S. Le Guyader, M. Desdouits

3.3 Post-doctorants

Nom – Prénom	Date début	Date fin	Sujet	Encadrement scientifique
Nabi Nesrine	11/06/19	11/12/20	Les Campylobacter en environnement littoral : identification des sources et caractérisation	M. Gourmelon

3.4 Stagiaires

Nom – Prénom	Début du stage	Fin du stage	Sujet	Catégorie	Ecole	Encadrement scientifique au LSEM
Billard Emma	17/02/20	21/02/20	Stage d'observation	1 ^{ère} année	ONIRIS, Nantes	S. Le Guyader
Bednarek Gaelle	14/09/20	12/05/21	Caractérisation de souches de <i>Vibrio</i> enteropathogène	Master	Université de Nantes	P. Garry
Commelein Emma	18/05/20	31/07/20	De la détection à la préparation des librairies pour l'identification des norovirus dans les huîtres par la métagénomique ciblée - importance des contrôles	DUT Génie Biologique	IUT Lyon 1	J. Ollivier
Terceve Olivia	18/11/19	30/06/20	Etude sur la stabilité du norovirus dans les échantillons d'huîtres	L3 BCPA/606N	Université de Nantes	S. Le Guyader J. Ollivier
Dusfour Castan Romane	23/03/20	07/08/20	Identification d'un potentiel bio-indicateur du milieu marin utilisable en criminalistique	Ingénieur/M2 Microbiologie	AgroSup Dijon/Univ Bourgogne Franche-Comté	D. Hervio Heath

3.5 Apprentis en alternance

Nom – Prénom	Date début	Date fin	Niveau d'étude	Sujet	Encadrement scientifique
Jousse Sarah	2/09/19	31/08/20	Licence Pro	Projet Rome, développement NGS	S. Parnaudeau
Gauffriau Mathias	19/09/20	31/10/21	Licence Pro	Projet Rome, analyse NGS	S. Parnaudeau

3.6 Accueil chercheurs étrangers

Début de l'accueil	Fin de l'accueil	Nom – Prénom	Nationalité	Organisme	Encadrement scientifique
12/02/20	15/10/20	Patrice Bonny	Cameroun	Institut de Recherche Médicinale et d'étude des plantes,	S. Le Guyader

3.7 Equipement

En 2020 le laboratoire s'est équipé de matériels classiques de laboratoire tels un thermocycleur temps réel et un congélateur. Il a également acquis un courantomètre qui permet de mesurer et d'enregistrer les débits de cours d'eau ou de canalisations de rejet. L'utilisation de ce matériel apporte des informations complémentaires aux prélèvements d'eau, coquillages ou capteurs passifs et permet devrait permettre d'approcher de façon semi-quantitative les apports de contamination.

4. Actions liées aux missions de LNR

4.1 Démarche qualité

Le LSEM a passé avec succès son évaluation de surveillance en décembre 2020, maintenant ainsi son accréditation par le Cofrac (Comité Français d'Accréditation) pour la réalisation d'essais sur les paramètres *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., norovirus et virus de l'hépatite A dans les mollusques bivalves (portée disponible sur www.cofrac.fr, n° accréditation 1-5451). Cette évaluation aura été l'occasion de valider :

- le rattachement du système qualité du LSEM à celui mis en place dans les sept laboratoires accrédités à l'Ifremer selon la norme NF EN ISO/CEI 17025. Un manuel qualité et des documents communs ont été ainsi mis en application de manière à harmoniser et simplifier les procédures qualité ;
- l'analyse des risques réalisée à la demande du Cofrac pour évaluer les conséquences de la crise sanitaire Covid-19. Cette analyse des risques, revue périodiquement, a démontré que le LSEM a pu maintenir sa capacité analytique intacte tout au long de l'année 2020.

Par ailleurs, un important travail a été mené sur la documentation qualité en lien avec l'organisation des comparaisons inter-laboratoires. Ainsi, plusieurs outils en ligne ont été développés à destination des laboratoires agréés, de manière à faciliter les échanges avec le LSEM (inscription, retour des résultats, enquête satisfaction).

Concernant les activités de recherche à Nantes, 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. coli* et *Salmonella*, norovirus et du virus de l'hépatite A (VHA) le 28 septembre 2020 (La campagne initialement prévue le 30 mars a été annulée en raison de la situation sanitaire).

L'essai d'aptitude portant sur les deux paramètres réglementaires (*E. coli* et *Salmonella*) a été réalisée sur la matrice huître. L'envoi aux participants comportait cinq échantillons pour l'essai *E. coli* (contaminés à environ 1600 *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*

<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
31 laboratoires (37 couples laboratoire/méthode)	26 laboratoires (36 couples laboratoire/méthode)

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

<i>Escherichia coli</i>			<i>Salmonella</i>	
Satisfaisant	Discutable	Insatisfaisant	Satisfaisant	Insatisfaisant
84 % (31 couples)	5 % (2 couples)	11 % (4 couples)	95 % (34 couples)	5% (2 couples)

Un laboratoire (non agréé) n'a pas rendu de résultats, il a été jugé non satisfaisant.

Des résultats non satisfaisants ou discutables pour le dénombrement des *E. coli* ont été obtenus avec la méthode NF EN ISO 16649-3 (5 couples) et NF V08-106 (1 couple) et sont dus à des problèmes de fidélité.

Le système d'évaluation des laboratoires pour *E. coli* a évolué, les participants sont évalués uniquement sur la justesse et la fidélité de leurs résultats. Cependant les erreurs et incohérences sont notées sur le rapport, même si celles-ci n'ont pas d'impact sur l'évaluation du laboratoire.

En ce qui concerne les deux laboratoires ayant été non satisfaisant pour *Salmonella* seul l'un d'entre eux est agréé par le ministère de l'agriculture. Après analyse des causes par les laboratoires, il s'agit d'une inversion des échantillons au moment de l'enregistrement des échantillons.

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 VHA dans les coquillages, les 10 laboratoires (5 laboratoires agréés) participant ont reçu trois échantillons d'huîtres creuses. Les résultats attendus sont présentés dans le Tableau 3.

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

Echantillon	Matrice	NoV GI	NoV GII	VHA
1	Huitres creuses	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Non détecté dans 2g de tissus digestifs
2	Huitres creuses	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Non détecté dans 2g de tissus digestifs
3	Huitres creuses	Génome viral Non détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Non détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs

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

Neuf laboratoires ont présenté une performance satisfaisante pour cet essai d'aptitude et un laboratoire (non agréé) n'a pas rendu de résultats et a par conséquent obtenu une performance non satisfaisante.

4.2.2 Expertises, avis, assistance technique

Comme les années précédentes, 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 du Nombre le Plus Probable (NPP) et NF V08-106 - Technique par impédancemétrie).

Le laboratoire a également apporté son assistance aux laboratoires dans l'application de la norme ISO 15216-2 pour la détection des norovirus et notamment sur des problèmes de rendement d'extraction.

Plus particulièrement le LNR a apporté son soutien à un laboratoire mettant en place la méthode VF V08-106 pour le dénombrement des *E. coli*. Ce laboratoire a obtenu son accréditation par le Cofrac.

4.3 2^{ème} Workshop organisé par le LRUE virus

La 3^{ème} réunion des LNR virus dans les aliments s'est déroulée en visioconférence du 1^{er} au 2 septembre.

En amont de la réunion nous avons participé à un groupe de travail créé au sein de tous les LRUEs sur la métagénomique (environ 30 personnes connectées).

V. Michelacci (LRUE/*E. coli*) a présenté ce groupe de travail européen, accompagné par l'EFSA et le ECDC, qui comprend les LRUE *E. coli* (coordinateur), *Listeria*, *Salmonella*, *Campylobacter*, parasites et virus. Le but est de créer des guides pour établir

des stratégies communes pour la mise en place d'EILs, de procédure de WGS, les outils de bioinformatiques, pour l'analyse des variants par NGS, mais également des sessions de formation sur NGS.

Ce groupe travaille sur une méthode ISO (ISO/TC34/SC9/WG25) qui pourra être révisable après 3 ans. Il a été acté que les données (de séquençage) issues des LNRs/LRUE ne devaient pas nécessairement être rendues publiques. Un questionnaire complété par tous les LNRs européens a montré que la métagénomique était utilisée surtout en recherche et qu'il y avait un intérêt pour des essais inter-laboratoires et des formations. Des outils de bio-info ressortent au niveau des utilisations Fast QC, SPADes... ce qui montre que le départ pourrait venir de l'approche bio-info. A cette occasion le LSEM a présenté quelques résultats du projet en cours sur le séquençage des norovirus dans les huîtres prélevées lors de l'étude européenne.

Les deux jours suivants ont concerné la réunion organisée pour les LNRs virus suivie par environ 45 participants, incluant sept nouveaux laboratoires (Autriche, Chypre, Luxembourg, Slovaquie, Pologne [deux laboratoires] et Hongrie). Seules la Croatie et l'Estonie n'ont pas encore désigné leur LNR, et le Cefas y participe en tant que centre FAO.

Le programme de travail du LRUE a été présenté : essais inter-laboratoires quantitatifs et qualitatifs pour VHA et NoV dans coquillages (inoculation de TD) et végétaux, développement de méthode pour production d'échantillons contaminés de façon homogène : réalisé pour les fruits rouges et les coquillages. Ils ont mis à disposition des protocoles d'analyse pour coquillages, et autres matrices, et travaillent sur l'implémentation et le développement de méthode de typage pour norovirus (long fragment PCR couvrant la polymérase et la capsid) et approche par NGS (cf réunion de la veille). La proposition de travail sur la détection du VHE dans des produits d'origine animale n'est toujours pas retenue par la commission. La DG Santé, l'EFSA et l'ECDC sont invités chaque année mais seul l'EFSA a participé, la DG Santé n'a pas répondu. La rédaction d'un guide à destination des LNRs pour la validation et l'accréditation de la méthode ISO 15216 a été reportée à cause de la COVID (la personne en charge a dû travailler sur le SARS-CoV2). Le LRUE travaille sur un protocole pour validation de méthode alternative pour les micro-organismes non cultivables, sur une méthode pour la détection du SARS-CoV2 dans les aliments, la production de standard DNA, control RNA et virus contrôle ainsi que la collecte de matériel de référence (fèces) ou virus cultivés (repoussé en raison de la COVID 19). Un guide pour aider à l'accréditation est également en cours de rédaction.

Ensuite diverses présentations ont été faites sur 'Risque potentiel du SARS-CoV-2 comme virus à transmission par les aliments' (A. Bosch, Université de Barcelone), la détection des norovirus dans 10% des lots de fruits rouges importés en Hongrie (Z. Lancz, National Food Chain Safety Office, Hongrie), le travail réalisé sur la contamination du fromage par Tick-borne encephalitis viruses (C. Hennechart, ANSES), la prévalence des norovirus dans les huîtres en Irlande (étude EFSA) (Sinead Keaveney, Marine Institute), l'Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters (José Cortinas, EFSA), et le risque de pathologie en lien avec la concentration en norovirus dans les huîtres (James Lowther, FAO Reference center).

La discussion sur les EILs a porté à la fois sur le déroulement des essais (deux essais par an), l'intérêt de quantifier par PCR digitale, les matrices à incorporer. La fréquence des EILs sur les coquillages est maintenue à une fois par an.

L'intégration de l'analyse d'eau dans les travaux du groupe a été soulevée : les LNR questionnés ont répondu que l'eau suit une réglementation et normalisation séparée. L'eau n'entre pas dans la catégorie des aliments. Cette thématique ne fera donc pas l'objet d'intérêt du groupe.

Les propositions de la DG Santé (V. Larsson) lors de la réunion de février sur les norovirus et mollusques sont d'inclure le risque norovirus dans les protocoles HACCP des professionnels, avec une recommandation d'analyse de 10% des lots de coquillages en novembre et avril, et un seuil acceptable à 500gc/g (en utilisant la méthode ISO15216-1).

En réponse, les états membres ont signalé les points suivants :

- l'impossibilité de prédire le nombre de lots et donc l'incapacité de calculer à l'avance le nombre d'échantillons à analyser pour atteindre les 10%,
- Coût d'analyse important surtout pour les petites structures,
- Pourquoi 500 gc/g ?
- Pourquoi la période de novembre à avril ?
- Considérer d'autres facteurs pour la définition du plan d'échantillonnage comme : région/tourisme/climat... et penser aux autres mesures

A l'issue de ces deux jours des résolutions ont été rédigées (Page 31).

4.4 Assistance à l'administration

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

- le 10 mars, copil de la surveillance dans les locaux de la DGAI,
- le 2 octobre, coordination des EILA, visio conférence organisée par l'Anses,
- le 27 novembre, séminaire de la référence, visio conférence organisée par le Ministère de l'agriculture

Le LSEM a également participé à la rédaction de la note d'appui scientifique et technique de l'ANSES relative à l'état des connaissances disponibles sur la présence, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans le milieu aquatique.

4.5 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 parahaemolyticus* 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 21872-2 Recherche des *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio vulnificus* dans les aliments partie quantitative ;
- CEN/TC 275 WG 6 TAG4 "Les virus dans les aliments".

4.6 Analyses officielles

Toxi-infections alimentaires collectives

De nombreuses TIAC à norovirus liées à la consommation de coquillages ont été rapportées pour l'hiver 2019-2020. Le réseau de laboratoires agréés pour la détection de norovirus a été sollicité. Ils ont reçu 98 échantillons d'huîtres et pour 44 d'entre eux norovirus a été détecté.

Le LNR a été destinataire de 39 échantillons d'huîtres, majoritairement prélevés dans les zones de production. Pour les restes de repas, trois échantillons étaient positifs en norovirus GI et GII et deux échantillons positifs en GII uniquement. Les prélèvements effectués sur zone de production (points REMI) étaient tous positifs en norovirus GI et GII. La quantification a été réalisée sur les échantillons réceptionnés au LSEM et sont présentés sur les figures 2 et 3.

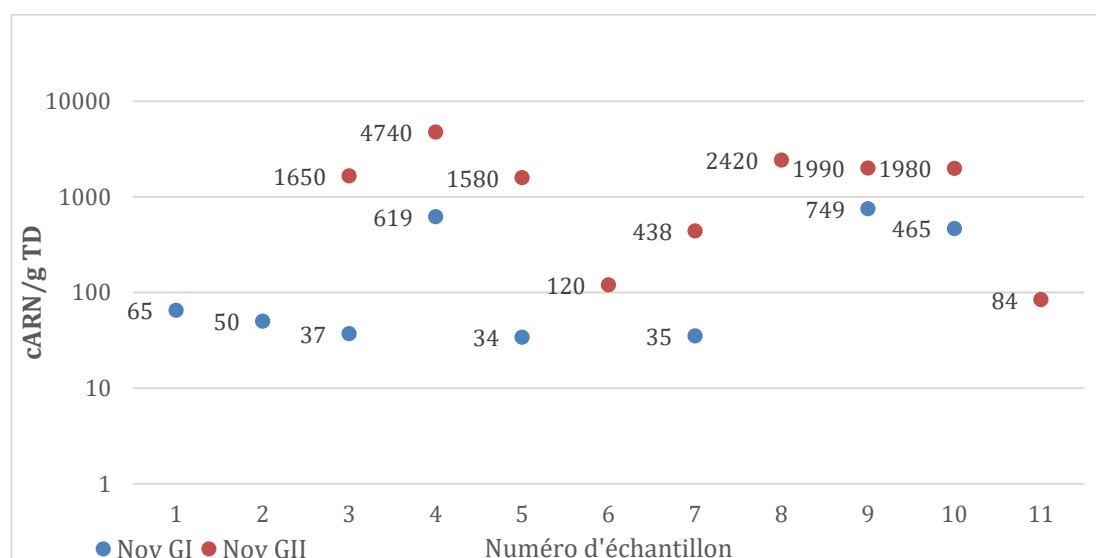


Figure 1 : Quantification des norovirus dans des coquillages impliqués dans des TIACs.

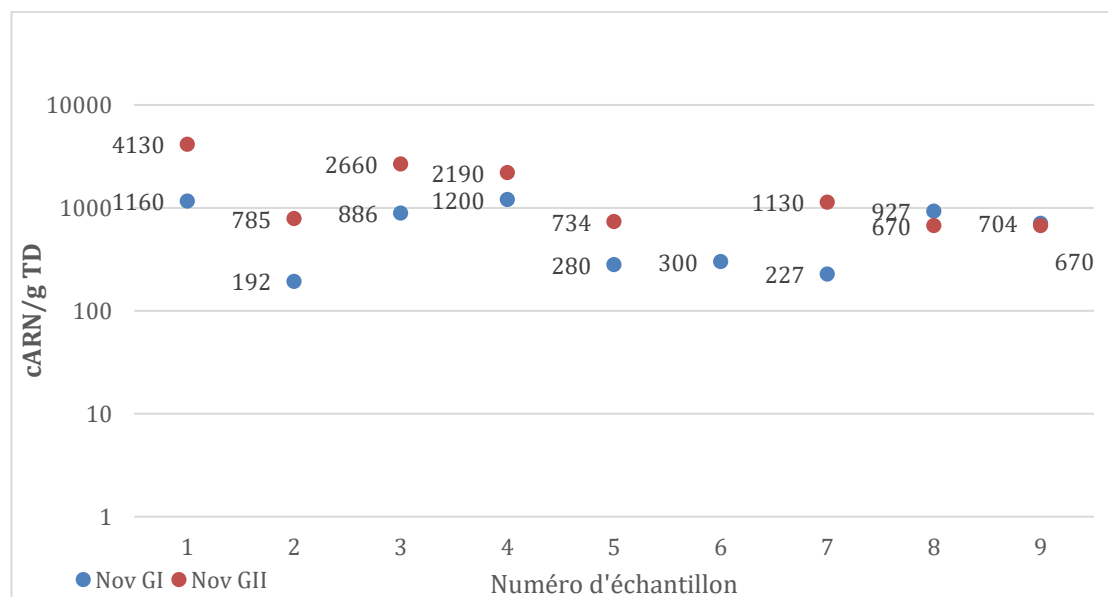


Figure 2 : Quantification des norovirus dans les échantillons prélevés dans les zones de production

Notifications RASFF

Aucune notification RASFF n'a conduit à des analyses.

Alerte sur les dysfonctionnements des structures d'assainissement d'eaux usées en période d'épidémie hivernale gastro-entérite aigüe

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

4.7 Participation aux essais du LR-UE et PHE

Le LSEM a participé à différents essais inter-laboratoires européens au cours de l'année 2020. Ces essais sont organisés par le PHE (Public Health England), le LRUE *Salmonella* (RIVM) ou encore par le LRUE virus (Uppsala, Suède).

E. coli et *Salmonella* :

Pour le dénombrement des *E. coli* et la recherche des *Salmonella*, le laboratoire a participé à un essai pour *E. coli* et *Salmonella* sur lenticules organisé par le PHE et à un essai sur coquillages entiers organisé par le LRUE *Salmonella*. 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	Performance
Dénombrement <i>E. coli</i>	ISO 116649-3	Satisfaisante
Recherche <i>Salmonella</i> spp.	NF EN 6579	Satisfaisante

Tableau 5 : Résultats obtenus par le LSEM aux EILs organisés par le LRUE *Salmonella*, sur coquillages

	Méthode d'analyses	Performance
Recherche <i>Salmonella</i> spp.	NF EN 6579	Satisfaisante

Norovirus et VHA

Au cours de l'année 2020, le LSEM a participé à un essai inter-laboratoires pour la recherche des norovirus et du virus de l'hépatite A (analyse qualitative), organisé par le LRUE (Uppsala, Suède) sur trois échantillons de broyat de tissus digestifs.

Tableau 6 : Résultats obtenus à l'EIL organisé par le CEFAS/PHE

Echantillon	Virus cible	Performance du laboratoire
Broyat de tissus digestif	NoV GI	Satisfaisante
	NoV GII	
	VHA	
Broyat de tissus digestif	NoV GI	
	NoV GII	
	VHA	
Broyat de tissus digestif	NoV GI	
	NoV GII	
	VHA	

Concernant les EILA *Vibrio* spp. organisés par le PHE, le laboratoire a participé à un essai comportant deux échantillons (lenticules).

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

Germe cible	Performance	
	Echantillon 1	Echantillon 2
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Satisfaisante	Satisfaisante
<i>Vibrio cholerae</i>	Satisfaisante	Satisfaisante
<i>Vibrio vulnificus</i>	Satisfaisante	Satisfaisante

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

Liste des documents diffusés :

- Rapport d'activités LNR 2019 et relevé des dépenses (Convention LNR – DGAI 2019)
- Rapports des essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella* sur des échantillons d'huîtres
- Rapport de l'essai d'aptitude norovirus sur des huîtres
- Compte rendu et résolutions du 3^{ème} workshop des LNR virus
- Bilan du plan exploratoire sur la contamination des *Vibrios* entéropathogènes dans les mollusques bivalves
- Revue bibliographique : risques de contamination des coquillages par les contaminations d'origine aviaire

4.9 Développement /validation de méthode

4.9.1 Culture cellulaire et infectiosité virale

Le modèle de cellules souches intestinales humaines (entéroïdes) (M.K. Estes, Baylor College of Medicine, Houston, Texas), permettant de mettre en évidence la réplication de norovirus humains, est utilisé pour évaluer la persistance des norovirus GII.4 et GII.3 infectieux, dans l'eau de mer à 12°C. Une lignée déficiente pour le gène STAT1 a montré une sensibilité plus grande pour la détection de norovirus GII.3 infectieux et sera donc utilisée pour évaluer la stabilité de ce virus.

Afin d'élargir le panel de virus pouvant être étudié, des expérimentations visant à étudier la réplication des sapovirus humains dans ce modèle ont été réalisées. Les sapovirus appartiennent à la même famille que les norovirus (*Caliciviridae*), provoquent des pathologies identiques, et sont très fréquents dans la population et dans l'environnement contaminé par des rejets humains. Plusieurs souches de sapovirus se sont répliquées de façon répétée dans les cellules différenciées issues

des entéroïdes intestinaux humains, en présence d'acides biliaires. Ce modèle permettra donc d'étudier la stabilité des sapovirus dans l'environnement littoral et leur pouvoir infectieux suite à la contamination de coquillages.

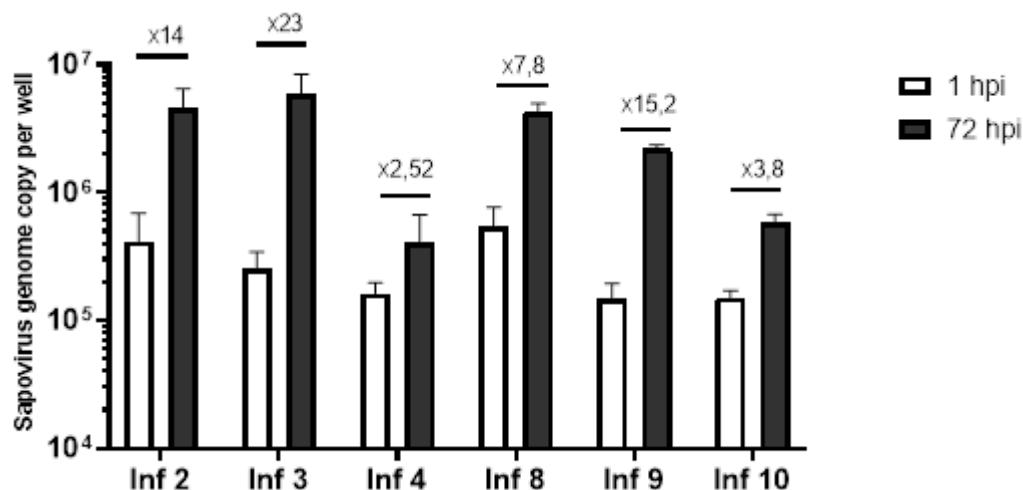


Figure 3 : Réplication d'une souche de sapovirus humain dans des cellules intestinales humaines issue du jejunum, lors de 6 expériences. La quantité de génome de sapovirus est mesurée 1h puis 72h post-infection (pi), la moyenne (histogrammes) et l'écart-type (barres d'erreur) calculés sur 3 réplicats techniques, et le ratio de réplication indiqué au-dessus (xN).

4.9.2 Développement NGS

Les nouvelles techniques de séquençage haut débit (NGS ou HTC) sont intégrées à la plupart des projets portés par le LSEM. Que ce soit pour des approches de séquençage de produit de PCR avec le métabarcoding ou l'étude du virome. Avec la métagénomique ces techniques nécessitent, d'une part des protocoles optimisés pour les matrices et les microorganismes étudiés et d'autre part des pipelines bioinformatiques pour le traitement des données.

Le métabarcoding pour identifier les norovirus (projet Moonstone) a nécessité l'optimisation de l'étape de reverse transcription pour obtenir des produits de PCR à partir d'échantillons faiblement contaminés. En métagénomique le challenge est la faible quantité de virus dans des matrices complexes. L'optimisation se concentre sur la sélectivité de l'extraction vis à vis des virus et l'augmentation de la prise d'essais pour augmenter les quantités d'ARN pour la préparation des bibliothèques.

Le traitement des données issues de l'étude de la diversité virales dans des palourdes Camerounaises prélevées dans la rivière Sanaga (Thèse Patrice Bonny) a permis l'optimisation d'un pipeline bioinformatique permettant l'analyse du virome. L'automatisation du pipeline initialement construit durant la thèse de Sofia Strubbia, a permis une analyse plus robuste et reproductible grâce à l'utilisation de Nextflow. Le traitement initial de données (déduplication en particulier) et l'optimisation des paramètres d'assemblage permet de produire des contigs (assemblage de séquences) plus longs, de façon plus rapide et moins consommatrice des ressources du cluster. L'assignation taxonomique, basée sur le blast nucléotidique et protéique, permet l'extraction des séquences d'un même niveau taxonomique pour en étudier plus facilement la diversité.

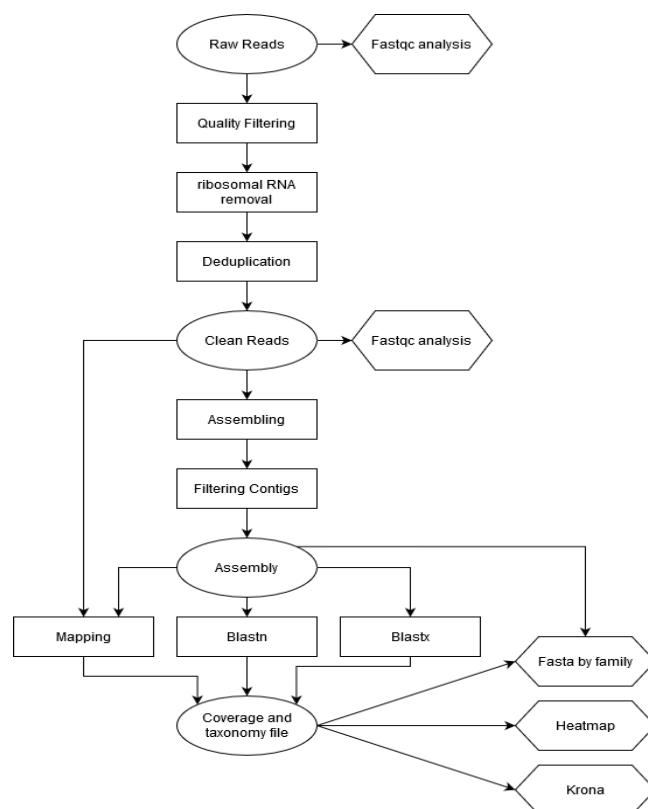


Figure 4: Pipeline utilisé pour traiter les données RNA-seq des palourdes.

Cela permet par exemple d'obtenir des sorties de type Heatmap représentant le jeu de données.

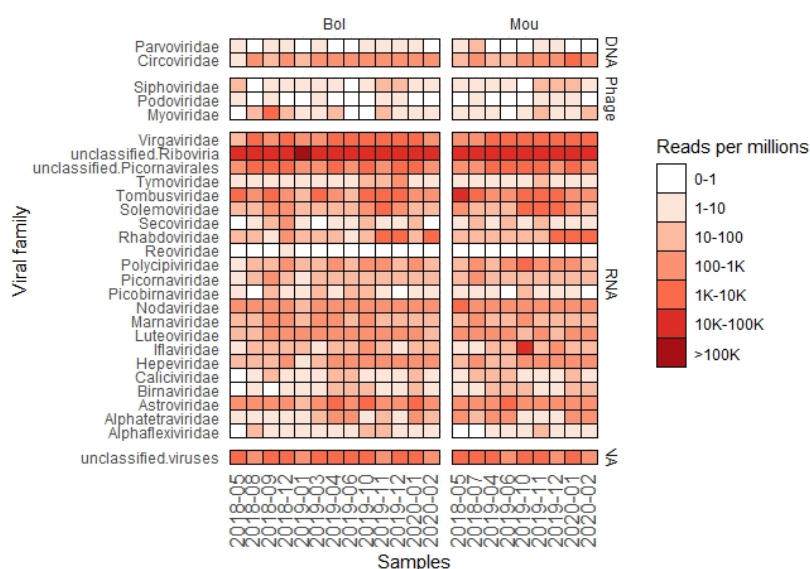


Figure 5 : Importance de chaque famille virale dans nos échantillons.

Le graphique interactif (krona) disponible pour parcourir les données, permet la visualisation de l'ensemble des séquences nucléotidiques pour une famille ou une espèce donnée (Astroviridae / norovirus) avec le meilleur match dans la base de données NCBI.

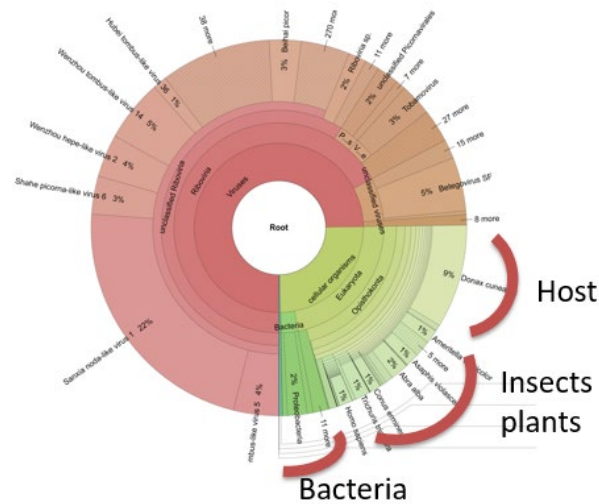


Figure 6 : exemple de krona pour représenter nos données.

Lors de ce projet, nous avons été confrontés à un problème bioinformatique dû à la présence de souches très proches rendant parfois l'assemblage de longues séquences impossibles. En effet, la base flottante (3^{ème} base ARN pour chaque codon) est souvent mutée car elle ne change pas la séquence protéique, les séquences appartiennent à des souches proches mais différentes. On obtient alors un ensemble de petits contigs de 300 à 1000 paires de base.

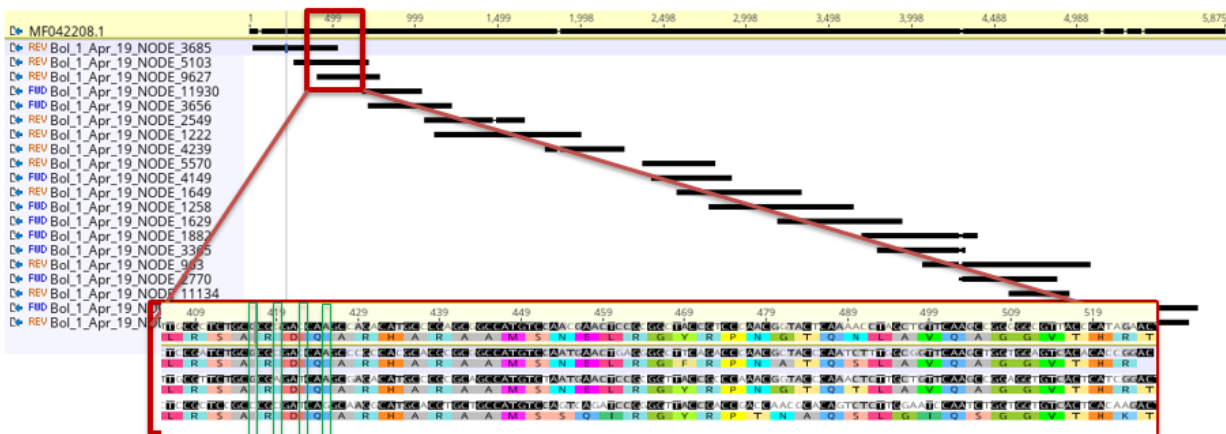


Figure 7: alignement des séquences obtenues après assemblage sur un génome de référence Bastrovirus. La référence est bien couverte par des contigs, mais des variations nucléotidiques sur la troisième base du codon empêchent l'assemblage.

Une autre approche basée sur le séquençage direct de longs fragments est utilisée dans la technologie Oxford Nanopore (ONT). L'application de cette technologie à une sélection de souches de *Vibrio* issues du plan de surveillance (DGAL, 2019) combinée à un run Illumina ont permis de d'obtenir de longues portions des deux chromosomes qui constituent le génome de ces bactéries. La bioinformatique pour l'analyse de séquences issues de la technologie ONT mais aussi pour caractériser les gènes d'antibio résistance est en cours d'élaboration.

5. Actions liées aux Projets de Recherche

5.1 Goyave (ANR n°19-CE35-0014)

Le projet GOyAVE (Glycans and Oysters Attachment to enteric viruses in the coastal Environment, financé par l'ANR) a débuté le 1^{er} janvier 2020. Son objectif est de caractériser les glycanes présents dans l'environnement (huîtres, bactéries) et leur impact sur les norovirus et les rotavirus. Les travaux visant à identifier les différents glycanes exprimés par les tissus des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) ont été poursuivis. L'utilisation de la cytométrie en flux et d'un panel de différents anticorps dirigés contre les antigènes de groupe sanguin permet d'identifier la présence de cellules digestives d'huîtres exprimant une molécule similaire à celle déterminant le groupe sanguin A chez l'Homme, responsable de la liaison des norovirus humains dans les tissus digestifs de l'huître.

Une cohorte d'animaux élevés dans des conditions contrôlées à la plate-forme mollusques marins de Bouin (PMMB) est également suivie de manière mensuelle par cytométrie et par la réalisation de coupes histologiques pour évaluer les variations saisonnières de l'expression de ces molécules. Les coupes seront analysées par immunohistochimie afin de localiser plus précisément les cellules exprimant ces ligands.

Ces recherches se déroulent en collaboration avec les équipes de Yann Guérardel (CNRS, Villeneuve d'Asq) et Jacques le Pendu (INSERM, Nantes), qui ont réalisé des outils moléculaires nécessaires à la poursuite des expérimentations, ainsi que la caractérisation physico-chimique des différents glycanes de *C. gigas*.

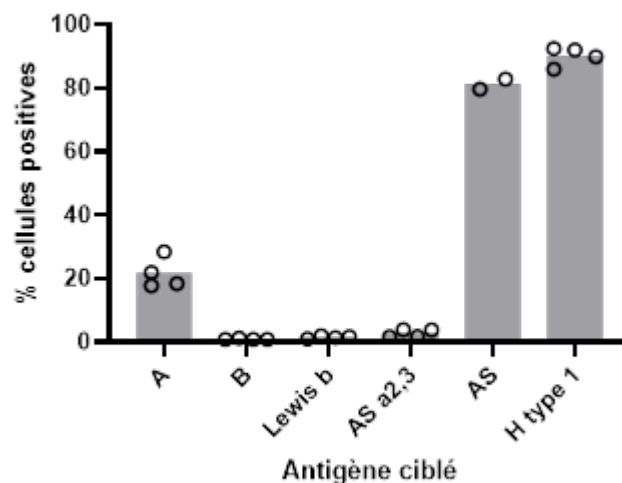


Figure 8 : Expression de différents antigènes glycaniques par les cellules de tissu digestif d'huître en janvier et février 2020 (n=4 expériences, 2 par mois, chacune avec 3 individus). AS : acide sialique.

5.2 Projet ROME (Projet institut)

Le projet ROME (Réseau d'Observatoires pour la recherche en Microbiologie Environnementale intégrée) a pour objectif de développer une observation intégrée et pluridisciplinaire du milieu marin avec notamment l'application de sciences « -omiques » et l'utilisation de l'ADN environnemental comme nouvelle variable biologique d'analyse.

Pour initier cet observatoire, quatre points ont été sélectionnés : Marennes Oléron (17), l'étang de Thau (34) la Baie des Veys (50) et la rade de Brest (29). Sur chacun de ces sites, trois prélèvements sont réalisés : eau large (eau de mer) (EL), eaux apports anthropique (EAA) et des coquillages, proche du point EAA.



Figure 9 : Exemple de point prélèvement (site Marennes Oléron)

Le LSEM s'implique dans le pilotage du projet et dans les aspects opérationnels (analyses). Le laboratoire assure l'extraction des échantillons d'eau large et apport anthropiques pour chacun des quatre sites pour les analyses virologiques. Le protocole, mis au point en 2019, est basé sur la compilation de deux méthodes sur le même échantillon : une dédiée aux virus associés aux matériel particulaire (comme souvent observé pour les virus entériques humains) et une méthode utilisée lors du projet TARA, pour l'étude du virome présent dans la masse d'eau. Le LSEM intervient pour la préparation des tissus de coquillage par broyage à l'azote liquide et ensuite pour l'extraction des acides nucléiques en utilisant un kit Qiagen pour l'étude des bactéries et parasites. Pour l'analyse des virus à ARN, le protocole utilisé est celui mis au point lors du projet COMPARE pour l'analyse du virome. L'intégralité des librairies pour l'analyse du virome seront réalisées au laboratoire. En raison de la crise sanitaire, le projet a démarré en septembre 2020, avec une campagne d'échantillonnage par mois. Les premiers résultats sont attendus pour juin 2021.

5.3 Projet Moonstone

Le projet européen Moonstone, réalisé en collaboration avec l'Erasmus Medical Center (Rotterdam, Pays-Bas), le Cefas (Weymouth, Royaume-Uni) et DTU (Copenhague, Danemark) a pour objectif d'étudier la diversité des norovirus dans les huîtres prélevées lors de l'étude européenne en utilisant l'approche NGS.

La première étape de l'étude était l'optimisation des protocoles d'analyse par métabarcoding. La comparaison d'amplicons ciblant chacune des régions RdRp et VP1 de façon séparée et l'amplification d'une séquence plus longue comprenant les deux régions RdRp et VP1 a été réalisée (Fig. 10).

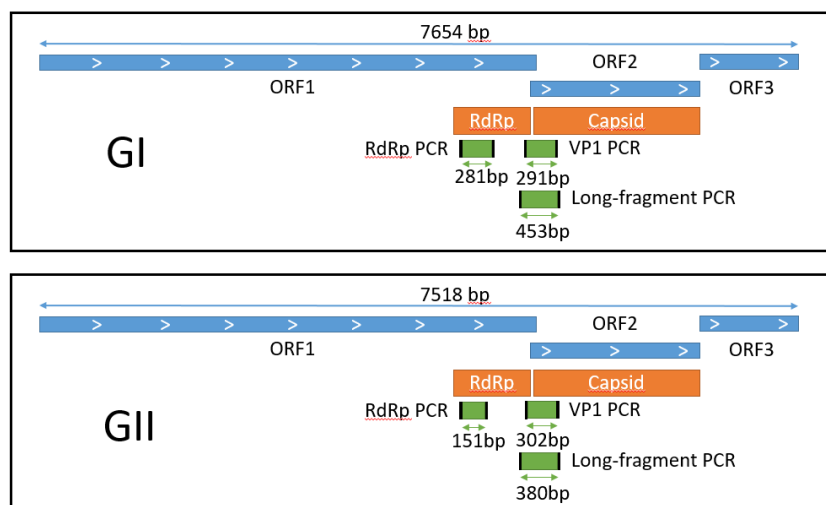


Figure 10 : Stratégie d'amplification des norovirus de génogroupe I et II pour l'approche métabarcoding.

Les approches testées permettent de détecter l'ensemble de la diversité présente dans les échantillons analysés. Cependant le métabarcoding sur les fragments longs présente encore des problèmes importants comme la formation de chimères non différenciables des vraies souches et un manque de sensibilité. Cette approche doit donc être optimisée. De plus, il n'est pas possible d'utiliser les résultats du métabarcoding pour approcher la diversité des souches de façon quantitative.

5.4 Projet Phobie (Projet DS-PDG)

Les principaux objectifs sont de caractériser les communautés bactériennes et virales des fèces de phoques de Saint-Pierre et Miquelon (SPM). En 2020, nous avons pu compléter la collection de fèces de phoques de Saint-Pierre et Miquelon (28 échantillons supplémentaires) et également obtenir des fèces d'autres sites : Parc Marin d'Iroise et baie de Somme. Concernant l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli*, des concentrations de $2,49 \cdot 10^6 \pm 4,90 \cdot 10^6$ UFC par g de fèces ont été obtenues sur les échantillons de SPM de 2020.

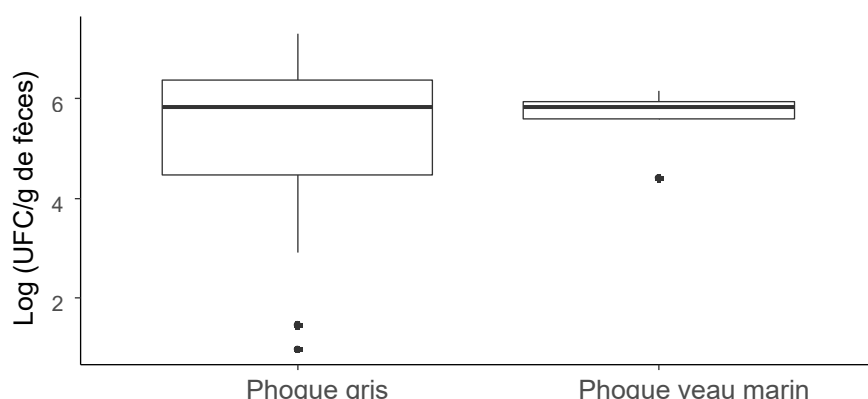


Figure 11 : Variation des concentrations en *Escherichia coli* des fèces de phoques (n=28) prélevées en 2020 à Saint-Pierre et Miquelon

La recherche des *Campylobacter* dans les fèces de SPM n'a pas permis d'en isoler. Toutefois, dans les fèces du Parc Marin d'Iroise, deux souches de *Campylobacter spp.* ont été isolées et leur génome a été séquencé, permettant d'identifier l'espèce : *Campylobacter insulanigrae*. Une analyse plus approfondie de ces données de séquençage sont en cours. Pour l'analyse du virome, après optimisation du protocole d'extraction des ARNs des fèces en raison de la présence de nombreux inhibiteurs, 20 fèces de phoques provenant de l'île de Molène ont été sélectionnés. Les bibliothèques ont été

préparées pour un séquençage Illumina, en utilisant des triplicats de librairie, approche intéressante pour analyser les échantillons très faiblement contaminés. Les résultats sont actuellement en cours d'exploitation et seront complétés par l'analyses d'autres prélèvements.

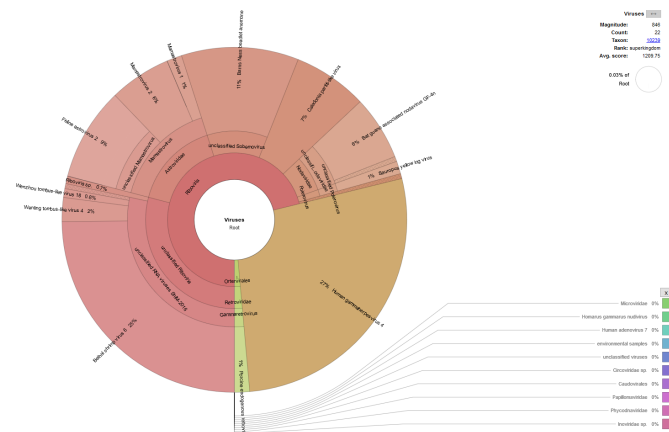
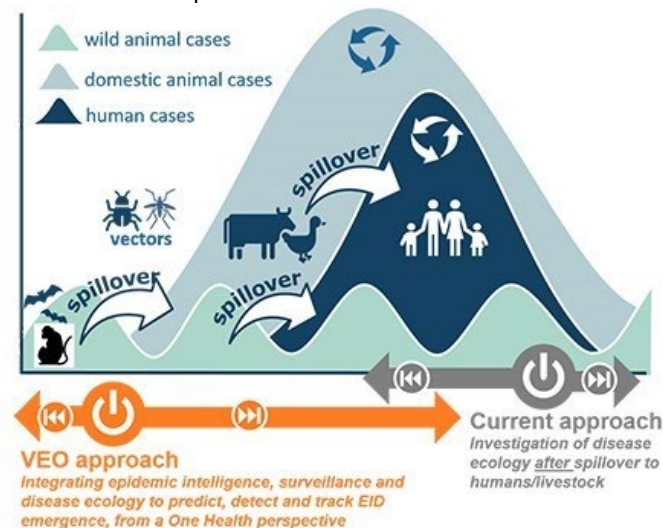


Figure 12 : Exemple de Krona obtenu lors de l'analyse du virome de fécès de phoques

5.5 Projet VEO (Projet H2020 n° 874735)

Le projet VEO (Versatile Emerging infectious disease Observatory), coordonné par M. Koopmans (Erasmus Medical Center, Pays Bas) et F. Aarestrup (Danish Technical University, Danemark), a commencé le 1^{er} janvier 2020 pour 5 ans. L'objectif du projet est d'anticiper et suivre en temps réel l'émergence d'agents pathogènes, en construisant une plate-forme permettant de générer et partager l'information sur les signes précurseurs, l'évaluation des risques et la surveillance des maladies infectieuses émergentes, notamment les virus et la résistance aux antibiotiques. Cet observatoire virtuel croisera différents types de données (réseaux sociaux, données publiques socio-économiques ou épidémiologiques, banques de séquences...) grâce à des échanges entre les différents spécialistes impliqués (informaticiens, data analystes, scientifiques). Le LSEM est particulièrement impliqué dans les work-packages (WP) ayant pour objectifs de tester l'utilisation de VEO sur des scénarii spécifiques, le WP7 (changement climatique), le WP8 (utilisation des eaux usées pour identifier un pathogène silencieux) et le WP9 (disease X, ou l'émergence d'un pathogène inconnu). La pandémie de SARS-CoV-2 a fortement impacté le lancement de VEO, avec le démarrage anticipé de plusieurs WP (dont WP8 et 9), et des efforts importants de nombreuses équipes impliquées dans le projet pour répondre aux questions posées par cette émergence virale. Un symposium de démarrage a eu lieu les 4 et 5 juin par visioconférence, des réunions bihebdomadaires sont organisées, et plusieurs réunions spécifiques aux WP7, 8 et 9 ont déjà eu lieu en visio avec participation de notre équipe. Le LSEM a notamment:

- préparé des protocoles pour l'analyse d'eau de mer et de fonte des glaciers qui seront prélevés au Groenland (WP7),
- a prélevé des eaux usées à Nantes et optimisé la détection du SARS-CoV-2 dans ces échantillons (WP8).



5.6 Projet APINOV (projet Feamp n°509528)

Le projet APINOV (APplications Innovantes pour prévenir la contamination des huîtres par les Norovirus) a pour objectif d'expérimenter en conditions réelles des développements récents pour répondre à un enjeu majeur pour la conchyliculture : les norovirus. Ces applications devraient permettre :

- 1/ de développer des méthodologies de diagnostic de l'origine des contaminations pour appuyer les actions les politiques de reconquête de la qualité des eaux, grâce à l'utilisation de capteurs passifs.
- 2/ d'optimiser les solutions de purifications des coquillages contaminés par les norovirus et le fonctionnement en circuit fermé des établissements à terre, grâce à l'utilisation de l'ultrafiltration.

Les expérimentations sont réalisées sur le site atelier de la rivière de Crac'h dans le Morbihan, réalisé en collaboration avec le CRC Bretagne Sud et l'université d'Aix Marseille.

Malgré un retard au lancement du projet lié aux conditions sanitaires, les premières actions ont respecté le calendrier initial comme par exemple le lancement entre partenaires et de suivi du projet avec les acteurs locaux. Ces discussions nous ont permis de valider la stratégie d'échantillonnage qui a débuté en octobre 2020. L'originalité de cette approche réside dans l'utilisation de capteurs passifs positionnés pendant 48 h sur 12 points de la rivière de Crac'h. Des échantillons de coquillage sont également collectés.



Photos 1 : Pose de capteurs passifs sur le site pilote de la rivière de Crac'h

5.7 Projet DISCO (Projet ANR RA-Covid, avec un complément par la région Pays de la Loire, et des contributions de la direction scientifique et de la direction générale d'Ifremer

Le projet DISCO (Dissémination et Stabilité du SARS-COV-2 dans l'environnement littoral), coordonné par le LSEM et réalisé en partenariat avec l'équipe Génomique virale et biosécurité de l'ANSES Ploufragan, a été initié par l'Ifremer en réponse aux craintes concernant la contamination du littoral par le SARS-CoV-2 (plan d'action Covid lancé en avril 2020), avec l'appui des LERs. Le projet ANR proprement dit, d'une durée de 1 an à compter du 15/09/2020, vise à mettre au point les techniques permettant de détecter ce virus dans l'environnement côtier (eau de mer et coquillages), à surveiller sa présence dans des échantillons collectés régulièrement sur les côtes françaises, et à estimer sa persistance sous forme infectieuse dans l'eau de mer.

Une réunion de démarrage, en visioconférence, a eu lieu le 23 septembre avec les partenaires de l'ANSES, puis une réunion scientifique le 4 novembre. Un coronavirus porcine, le PEDV, étudié par l'équipe ANSES, a été choisi comme substitut au SARS-CoV-2 pour les études de stabilité qu'ils conduiront. Différents protocoles ont été comparés pour la détection des coronavirus dans les huîtres et l'eau de mer à l'aide de la souche de PEDV. Du SARS-CoV-2 inactivé (fourni par le CHU de Nantes) a pu être bioaccumulé par des huîtres en conditions de laboratoire. Le suivi régulier de coquillages et d'eau de mer prélevés sur 21 puis 12 sites littoraux français a montré la détection ponctuelle de norovirus, signalant une contamination fécale humaine, mais pas de SARS-CoV-2. Un premier article a été écrit pour présenter ces résultats et est en révision auprès de Science of the Total Environment. La suite du projet comprend notamment les expériences de persistance du virus

infectieux qui ont débuté à l'ANSES, et la continuation du suivi environnemental, avec l'inclusion de capteurs passifs. Des essais en condition contrôlée montrent que les membranes adsorbent le SARS-CoV-2 et le PEDV et détectent le virus présent dans les eaux de station d'épuration. Des protocoles pour la détection et le séquençage du SARS-CoV-2 par séquençage haut débit dans le littoral seront aussi mis au point.

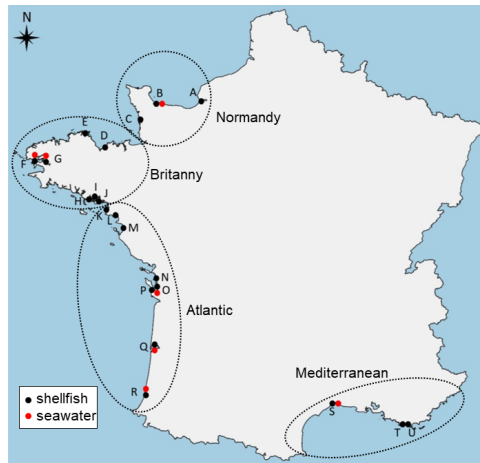


Figure 13 : Localisation des points de prélèvements de coquillages (noir) et eau de mer (rouge).

5.8 Projet IGA Vibrions halophiles

Depuis plusieurs décennies, un suivi de l'évolution du compartiment bactérien a été mis en œuvre 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, le rôle de l'Ifremer 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 et final 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 2020, Le LSEM a reçu près de 500 souches présomptives *Vibrio* isolées par les laboratoires sous-traitants, réalisé les analyses moléculaires (remise en culture de ces isolats sur milieux sélectifs, vérification de la pureté des isolats, mise en culture en milieu liquide, extraction des acides nucléiques et PCR en temps réel ciblées) et validé les résultats obtenus par les cinq CNPE. La relecture des rapports provisoires est en cours.

5.9 Projet MOLDIV

EDF réalise une surveillance hydroécologique aux abords des CNPE (Centre Nucléaire de Production d'Electricité), afin de suivre l'influence éventuelle du fonctionnement des CNPE sur l'environnement. Les CNPE de bord de mer doivent notamment réaliser des mesures de vibrions, l'exigence réglementaire étant un dénombrement de ces bactéries couplé à une identification biochimique. Un travail commun (EDF Chatou/Villeurbanne – LSEM ; 2015-2017) d'évaluation des méthodes de dénombrement et d'identification moléculaire des vibrions a abouti à une proposition d'évolution de surveillance de ces bactéries pour les eaux marines et estuariennes.

L'objectif du projet MOLDIV est de comparer les méthodes biochimique et moléculaire et de sélectionner celle qui sera la plus adaptée à l'enjeu de la surveillance hydroécologique (vibrions halophiles) des cinq CNPE de bord de mer. Les analyses de vibrions sur le site des CNPE de bord de mer seront réalisées sur une année entière (juillet 2020 – juin 2021 ; 141 échantillons) par les trois laboratoires sous-traitants en charge des analyses réglementaires. Pour l'un des CNPE (Gravelines, 59), les souches isolées par le laboratoire sous-traitant (n=1248) seront transmises à l'Ifremer pour identification par PCR. Entre février et juillet 2020, la formation des laboratoires en charge des analyses avec les deux procédures a été réalisée et validé lors d'un essai interlaboratoire (identification moléculaire de *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* et *V. cholerae*). En 2020, un total de 96 échantillons a été prélevé et analysé. La capitalisation de l'ensemble des données brutes obtenues en 2020 et l'analyse des résultats sont en cours.

5.10 Mécanismes de virulence de *Vibrio parahaemolyticus*, bactérie potentiellement pathogène pour l'homme (Thèse Marion Sorée)

L'année 2020 a permis de terminer des développements méthodologiques commencés en 2019 et de réaliser des expérimentations *in vivo* chez l'huître. L'objectif de ces expérimentations était de déterminer si l'ajout de bactéries lactiques (LAB) dans un bassin contenant des huîtres préalablement contaminées par *V. parahaemolyticus* (Vp) pouvait induire une diminution de la concentration de Vp chez l'huître.

Les dernières souches de *V. parahaemolyticus* GFP+ ont été obtenues par électroporation et la stabilité du plasmide chez chacune des 4 souches testées dans l'eau de mer a été vérifiée (96% après 48h). Ces résultats confirment que les souches *V. parahaemolyticus* GFP+ peuvent être utilisées en conditions expérimentales (essais sur huîtres, *C. gigas*). La cytométrie de flux a été testée comme alternative potentielle au dénombrement de *V. parahaemolyticus* (GFP+) sur boîtes, plus contraignant (préparation des milieux, étalements des suspensions et délai de résultat de 24h). Cette comparaison, qui a été réalisée sur différents milieux et matrices (milieu LBS, eau de mer, broyat de tissus d'huîtres, hémolymph), a montré l'intérêt de la cytométrie en flux comme alternative au dénombrement de *V. parahaemolyticus* GFP+ sur boîtes. De plus, ces essais montrent que l'hémolymph semble plus pertinente que le broyat de tissus pour le dénombrement de *V. parahaemolyticus* GFP+. Les tissus possèdent en effet une auto-fluorescence basale qui fausse la quantification en cytométrie en flux.

Ces techniques mises au point, les expérimentations chez des huîtres *C. gigas* NSI (Naissain Standardisé Ifremer) ont pu être réalisées au sein de la Plateforme expérimentale de Bouin. Pour cela, nous avons infecté des huîtres NSI (avec quatre souches de *V. parahaemolyticus* individuellement (10^5 CFU/mL) pendant 16-17h puis exposé ces huîtres pendant 24h à trois LAB (10^6 CFU/mL) individuellement. L'hémolymph a ensuite été utilisée pour quantifier *V. parahaemolyticus* GFP+ dans chacune des conditions par cytométrie en flux. Les résultats montrent une diminution de 1 log (CFU/mL) de l'une des souches de *V. parahaemolyticus* GFP+ dans l'hémolymph des huîtres contaminées après exposition aux LAB. Ces essais seront réalisés sur des huîtres *C. gigas* sauvages et l'ensemble des méthodes testées et des résultats obtenus sur les deux groupes d'huîtres feront l'objet d'une publication courant 2021.

6. Participation du LSEM à l'observatoire OBEPINE

Le réseau OBEPINE (OBservatoire EPIdemiologique daNs les Eaux usées) a été créé au printemps 2020 avec le soutien du Comité d'Analyse, Recherche et Expertise (CARE) et des Académies des Sciences, des Technologies et de Médecine, pour évaluer l'intérêt de l'analyse des eaux usées dans le suivi de la pandémie due au SARS-CoV-2. Notre laboratoire a rapidement intégré ce réseau apportant notre compétence pour l'analyse des échantillons de l'environnement et les données acquises dans le cadre du plan d'action Ifremer SARS-CoV-2 mis en place sur les coquillages. Le réseau est constitué de cinq organismes : Sorbonne Université-Inserm-CNRS-EPHE ; Eau de Paris ; Université de Lorraine-CNRS ; Institut de recherche biomédicale des armées ; Ifremer. La création d'un GIS est en cours de finalisation pour pérenniser ce groupe.

Depuis sa création il y a eu différentes actions mises en place pour obtenir un suivi bi-hebdomadaire de 150 stations d'épuration (coordination avec les opérateurs, collecte et transfert des échantillons, sélection de protocole, interprétation des données, mise en place d'un portail de mise à disposition des données, de rapports). Cette mise en place a été réalisée en contact étroit avec le MESRI (financeur du projet à hauteur de 3 millions €), et d'autres ministères intéressés par cette approche. Ce suivi est opérationnel depuis le début de l'année 2021.

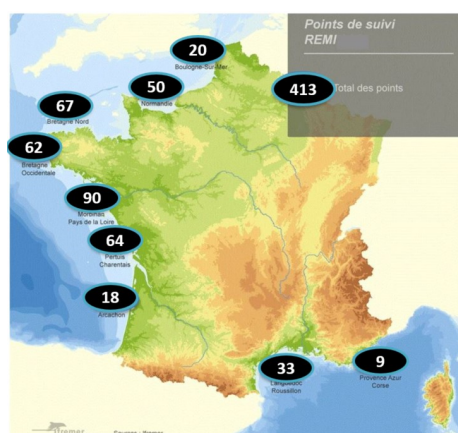
Le LSEM contribue au réseau à l'heure actuelle en :

- participant au développement de l'analyse par métagénomique de la diversité des souches de SARS-CoV-2 dans les eaux usées : discussion sur les protocoles, développement de pipeline (en lien avec le projet européen VEO) et la contribution du SEBIMER (Patrick Durand) qui va ouvrir la plateforme pour le partage des pipelines et stockage des données,
- développant l'approche des capteurs passifs : l'intérêt des membranes pour détecter le SARS-CoV-2 dans le réseau d'eau usée est en cours d'évaluation sur un site atelier (île d'Yeu) : Projet SPOCOV.

En 2021, le LSEM prendra en charge l'organisation des Essais Inter Laboratoire (EILs).

7. 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), à travers une mission d'assistance à maîtrise d'ouvrage (AMOA) (depuis 2018). L'appui fourni par l'Ifremer comprend notamment le suivi d'indicateurs (taux de réalisation, respect des délais et de la localisation des points de prélèvement) qui contribuent au bon déroulement des opérations à la fois à l'échelle nationale mais aussi pour chaque département.



Figures 14 : Répartition sur le littoral des points de suivi REMI

Au cours de l'année 2020, la surveillance régulière REMI s'est appuyée sur 413 points de prélèvement dont 12 suivis pour 2 taxons. La carte ci-dessus précise le nombre de points REMI dans l'aire de compétence de chaque Laboratoire Environnement Ressources (LER). Le suivi des indicateurs dans le cadre de la mission d'AMOA depuis maintenant 3 ans montre un taux de réalisation des prélèvements en surveillance régulière élevé et stable (environ 97% en moyenne). D'autres indicateurs ont montré une progression importante depuis le début (par exemple, le respect des lieux de prélèvement passé de 70% en moyenne en 2018 à environ 85% en 2020), même si une marge de progrès existe encore.

Contribuant à l'optimisation de la stratégie d'échantillonnage pour évaluer la contamination des zones littorales, le LSEM a réalisé sept études sanitaires qui ont été finalisées en 2020 : deux en Vendée (les Sableaux-groupes 2 et 3), une dans le Calvados (Cabourg-groupe 2), une en Loire-Atlantique (estuaire de la Loire-groupe 3), une en Seine-Maritime (entre Quiberville et Saint Aubin sur Mer-groupe 3) et deux dans la Manche (Utah-Beach-groupes 2 et 3). Une autre étude sanitaire, coordonnée par le LSEM et réalisée par le LER de Boulogne sur Mer, a été finalisée en 2020 : la baie de Wissant dans le Pas-de-Calais-groupe 3.

Dix-sept autres études sont en cours et aboutiront en 2021 : six dans le Finistère (rivière de la Laita- groupes 2 et 3, rivière du Belon intermédiaire-groupes 2 et 3 et rivière du Bélon aval-groupes 2 et 3), trois dans le Calvados (pointe du Siège-groupes 2 et 3, et secteur d'Auberville-Villers sur Mer-groupe 2), deux dans le Morbihan (zone du large-groupe 2, et zone de parcs à Houat-groupe 3), quatre dans la Manche (Gouville-Blainville-groupe 2, Gouville-groupe 3, Blainville-groupe 3, et baie du Mont Saint Michel-groupe 2) et deux en Charente-Maritime (Daire-groupe 2 et Château sud-groupe 2).

8. Conclusion et perspectives 2021

Ce bilan annuel montre la diversité de nos actions alliant comme les années précédentes, référence, expertise et recherche. Ce tryptique nous permet de constituer un groupe performant sur ces axes divers, comme l'a démontré notre capacité à réagir lors de la crise sanitaire.

Un certain retard a été pris sur des actions de recherche ou de référence en raison du confinement mais comme le montre ce rapport, des avancées ont été réalisées sur d'autres aspects. La transition de la microbiologie basée sur la culture ou sur l'identification de micro-organismes ciblés vers une évaluation plus globale de la diversité de la flore microbienne par l'approche de séquençage global progresse. Les études mises en place avec l'accueil de doctorant ou stagiaire vont nous permettre de poursuivre ces évolutions et d'acquérir de nouvelles données et compétences tout en transmettant notre savoir-faire.

Le LSEM connaît une mutation importante puisque ce rapport est le dernier associant l'équipe brestoise traditionnellement en charge des travaux de recherche sur la bactériologie sanitaire et les vibrions. La réorganisation souhaitée par la direction générale de regrouper sur un même site les laboratoires et unité entraîne en effet un changement important pour le LSEM car outre le nécessaire redéploiement d'une activité de recherche en bactériologie sur le site de Nantes nous allons également participer à la création d'une nouvelle unité, MASAE (Microbiologie Aliment Santé et Environnement). Ces évolutions déjà bien structurées vont se poursuivre au cours de 2021, pour une création officielle en 2022. Cette organisation a été discutée lors de la construction de notre dossier d'évaluation HCERES au cours de l'année 2021.

ANNEXES

Production scientifique et technique

Articles:

- Bonny Patrice, Desdouts Marion, Schaeffer Julien, Garry Pascal, Essia Ngang Jean Justin, Le Guyader Soizick** (2020). Contamination of clams with Human norovirus and a novel Hepatitis A virus in Cameroon. *Food and Environmental Virology*, 12(3), 274-277. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1007/s12560-020-09432-2> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00635/74745/>
- Boukerb Amine Mohamed, Schaeffer Julien, Serghine Joelle, Carrier Gregory, Le Guyader Soizick, Gourmelon Michele** (2020). Complete genome sequence of *Campylobacter armoricus* CA639, which carries two plasmids, compiled using Oxford Nanopore and Illumina sequencing technologies. *Microbiology Resource Announcements*, 9(1), e01309-19. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1128/MRA.01309-19> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00600/71164/>
- Desdouts Marion, Wacrenier Candice, Ollivier Joanna, Schaeffer Julien, Le Guyader Soizick** (2020). A targeted metagenomics approach to study the diversity of norovirus GII in shellfish implicated in outbreaks. *Viruses*, 12(9), 978. Publisher's official version : <https://doi.org/10.3390/v12090978> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00646/75831/>
- Desdouts Marion, De Graaf Miranda, Strubbia Sofia, Oude Munnink Bas B., Kroneman Annelies, Le Guyader Soizick, Koopmans Marion P. G.** (2020). Novel opportunities for NGS-based one health surveillance of foodborne viruses. *One Health Outlook*, 2(1), 14. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1186/s42522-020-00015-6> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00641/75330/>
- FAO and WHO (2020). Risk assessment tools for *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* associated with seafood. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Microbiological risk assessment series n°20 . <https://archimer.ifremer.fr/doc/00609/72092/>
- Guillier Laurent, **Gourmelon Michele, Lozach Solen**, Cadel-Six Sabrina, Vignaud Marie-Léone, Munck Nanna, Hald Tine, Palma Federica (2020). AB_SA: Accessory genes-based source Attribution – tracing the source of *Salmonella enterica* typhimurium environmental strains. *Microbial Genomics*, 6(7). Publisher's official version : <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000366> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00624/73632/>
- Munck Nanna, Leekitcharoenphon Pimlapas, Litrup Eva, Kaas Rolf, Meinen Anika, Guillier Laurent, Tang Yue, Malorny Burkhard, Palma Federica, Borowiak Maria, **Gourmelon Michele**, Simon Sandra, Banerji Sangeeta, Petrovska Liljana, Dallman Timothy J., Hald Tine (2020). Four European *Salmonella Typhimurium* datasets collected to develop WGS-based source attribution methods. *Scientific Data*, 7(1), 75. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0417-7> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00612/72437/>
- Sala Claudia, Mordhorst Hanne, Grützke Joesphine, Brinkmann Annika, Petersen Thomas N, Poulsen Casper, Cotter Paul D, Crispie Fiona, Ellis Richard J, Castellani Gastone, Amid Clara, Hakhverdyan Mikhayil, **Le Guyader Soizick**, Manfreda Gerardo, Mossong Joël, Nitsche Andreas, Ragimbeau Catherine, **Schaeffer Julien**, Schlundt Joergen, Tay Moon Y. F., Aarestrup Frank M., Hendriksen Rene S., Pamp Sünje Johanna, De Cesare Alessandra (2020). Metagenomics-based proficiency test of smoked salmon spiked with a mock community. *Microorganisms*, 8(12), 1861. Publisher's official version : <https://doi.org/10.3390/microorganisms8121861> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00664/77615/>
- Strubbia Sofia, Schaeffer Julien, Besnard Alban, Wacrenier Candice, Le Mennec Cecile, Garry Pascal, Desdouts Marion, Le Guyader Soizick** (2020). Metagenomic to evaluate norovirus genomic diversity in oysters: Impact on hexamer selection and targeted capture-based enrichment. *International Journal of Food Microbiology*, 323, 108588. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108588> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00614/72575/>
- Teunis Peter, **Le Guyader Soizick**, Liu Pengbo, **Ollivier Joanna**, Moe Christine L (2020). Noroviruses are highly infectious but there is strong variation in host susceptibility and virus pathogenicity. *Epidemics*, 32, 100401. Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.epidem.2020.100401> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00641/75265/>

Rapports (17)

- Boukerb Mohamed**, Charrier Amélie, Garabetian Frédéric, **Gourmelon Michele**, Jouanillou Adeline, Lesne Mélanie, Moussard Hélène, **Quenot Emmanuelle**, Vitte Isabelle (2020). BACTéries fécales, TRACeurs de contamination dans les eaux. Projet BATRAC 2. Rapport final. juin 2016 – mars 2020. 100 pages
- Brun Melanie, **Piquet Jean-Come**, **Rocq Sophie** (2020). Développement d'un outil statistique d'aide à la définition de seuils d'alerte pluviométrique dans le cadre du réseau REMI. ODE/VIGIES/20-01. 69 pages
- Delbarre Ladrat Christine, **Hervio Heath Dominique**, Kolypczuk Laetitia, Passerini Delphine, Verrez-Bagnis Veronique (2020). Projet Vi-LAB. AAP Intercentres 2018-2020. Etude de l'inhibition de la croissance et de l'atténuation de la virulence de vibrions pathogènes humains par des bactéries lactiques. Rapport final. 11 pages
- Denis Martine, Souchaud Florent, Rose Valérie, Nagard Bérengère, **Gourmelon Michele**, **Serghine Joelle**, Cauvin Elodie, Benoît Fabienne, Meunier Meagan, Rince Alain, Rince Isabelle (2020). Projet CAMPYSHELL. *Campylobacter spp.* dans les coquillages : sources de contamination et risque pour l'homme. Rapport final. 77 pages
- Garry Pascal**, **Kaelin Gaele** (2020). Rapport d'essai d'aptitude. Recherche des Salmonella spp. dans les coquillages vivants. Essai du 28 septembre 2020. Rapport définitif n° 20/01 Sa-Hu. 6 pages
- Garry Pascal**, **Ollivier Joanna** (2020). Rapport d'essai d'aptitude. Recherche de norovirus et du virus de l'hépatite A dans les coquillages. Essai du 28 septembre 2020. 20/01_Norovirus/VHA. 6 pages
- Garry Pascal**, **Veron Antoine**, **Wacrenier Candice**, **Hervio Heath Dominique** (2020). Plan exploratoire sur la contamination des Vibrios entéropathogènes dans les mollusques bivalves. Instruction technique DGAL/SDSSA/2018-957du 27/12/2018 - RBE/SG2M/LSEM 2020-01. 19 pages
- Garry Pascal**, **Le Guyader Soizick** (2020). Rapport d'activités 2019. Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie, Laboratoire National de Référence de Microbiologie des coquillages. RBE/SG2M/LSEM. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00615/72671/>
- Gervais Hugo, Gautier Emeric, Grizon James, Morin Dimitri, Soletchnik Patrick, **Piquet Jean-Come**, Bruneau Audrey (2020). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département de la Charente-Maritime (17). Edition 2020. RST.ODE/UL/LER/PC 20.001. 82 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00631/74329/>
- Gervais Hugo, Gautier Emeric, Grizon James, Morin Dimitri, Soletchnik Patrick, **Piquet Jean-Come**, Bruneau Audrey (2020). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département de la Vendée (85). Edition 2020. RST.ODE/UL/LER/PC 20.003. 59 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00632/74397/>
- Neaud-Masson Nadine, **Piquet Jean-Come**, Lemoine Maud (2020). Procédure de prélèvement pour la surveillance sanitaire des zones de production de coquillages. Prescriptions des réseaux de surveillance microbiologique (REMI) et phycotoxique (REPHYTOX). ODE/VIGIES/20-08 - RBE/SGMM/LSEM/20-04. 9 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00640/75229/>
- Perriere-Rumebe Myriam, Sottolichio Aldo, Blanchet Hugues, Gouriou Laure, **Hervio Heath Dominique**, Sautour Benoît, Savoye Nicolas (2020). Surveillance écologique du Centre Nucléaire de Production d'Electricité du Blayais. Année 2019. RST/ODE/LITTORAL/LERAR/20.005. 236 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00662/77423/>
- Piquet Jean-Come**, **Kaelin Gaele**, **Rocq Sophie** (2020). Rapport sur le suivi des opérateurs de prélèvements et d'analyses du REMI. 4^{ème} trimestre et année 2019. 45 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00624/72631/>
- Rocq Sophie**, Gabellec Raoul, **Piquet Jean-Come**, Cochennec-Laureau Nathalie (2020). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département du Morbihan. Edition 2020. RBE/SGMM/LSEM 020-02. 93 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00624/73580/>
- Rocq Sophie** (2020). Etude sanitaire de la zone 50.04 « Utah Beach – Quinéville » - groupes 2 et 3 (coquillages bivalves fousseurs et non fousseurs). RBE/SGMM/LSEM 20-06. 559 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00664/77651/>
- Rocq Sophie** (2020). Etude sanitaire de la zone expérimentale entre Saint-Aubin-sur-Mer et Quiberville (Seine-Maritime) - groupe 3 (coquillages bivalves non fousseurs). RBE/SGMM/LSEM 20-05. 46 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00656/76778/>
- Rocq Sophie** (2020). Etude sanitaire de la partie nord-ouest de la zone 44.09 « Estuaire de la Loire » - groupe 3 (bivalves non fousseurs). RBE/SGMM/LSEM 20-04. 54 pages <https://doi.org/http://doi.org/10.17882/47157>
- Rocq Sophie** (2020). Etude sanitaire de la zone des Sableaux (85) – groupes 2 et 3. Convention études sanitaires DGAL/Ifremer 2018-2019. Etude sanitaire en vue du classement d'une zone de production de coquillages. RBE/SGMM/LSEM 20-01. 53 Pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00618/73023/>
- Rocq Sophie** (2020). Etude sanitaire de la zone 14.031 « De l'estuaire de la Dives à Merville-Franceville » - groupe 2 (coquillages fousseurs). RBE/SGMM/LSEM 20-03. 48 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00629/74114/>
- Serais Ophélie, Gianaroli Camille, Cimiterra Nicolas, Munaron Dominique, Fiandrino Annie, **Piquet Jean-Come**, **Rocq Sophie**,

Grouhel-Pellouin Anne (2020). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Région Occitanie. Edition 2020. ODE/UL/LER/LR/20.04. 103 pages <https://archimer.ifremer.fr/doc/00631/74282/>

Schmitt Anne, **Piquet Jean-Come**, Cochenne-Laureau Nathalie (2020). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département de Loire-Atlantique. Edition 2020. 64 pages RST/LER/MPL/20.06. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00624/73621/>

Expertises / Avis (24)

Avis (4)

Bizzozero Lucie, **Piquet Jean-Come**, Cochenne-Laureau Nathalie (2020). Avis concernant l'autorisation de rejet STEP de Kerran à Saint-Philibert. DDTM 56 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer du Morbihan, Service DDTM 56/SENB/MARE, Vannes, Ref. LER/MPL/20.01/Lo et Ref Avis : 20-01 - mail du 09/12/2019, 6p., <https://archimer.ifremer.fr/doc/00603/71519/>

Bizzozero Lucie, Souchu Philippe, **Piquet Jean-Come**, Cochenne-Laureau Nathalie (2020). Avis concernant le renouvellement de l'autorisation de la STEP de Plouhinec. DDTM 56 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer du Morbihan, Service DDTM 56/SENB/MARE, Vannes, Ref. LER/MPL/20.02LO et Ref Avis : 20-004 - votre courrier du 5/12/2019, 4p., <https://archimer.ifremer.fr/doc/00603/71520/>

Bizzozero Lucie, Souchu Philippe, **Piquet Jean-Come**, Gabellec Raoul, Retho Michael, Cochenne-Laureau Nathalie (2020). Avis concernant le renouvellement de l'autorisation de rejet de la station d'épuration de Damgan. DDTM 56 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer du Morbihan, Service DDTM 56/SENB/MARE, Vannes, Ref. LER/MPL/20.26 et Ref Avis : 20-025 - courrier du 10/02/2020, 5p., <https://archimer.ifremer.fr/doc/00619/73061/>

Gourmelon Michele, Serghine Joelle, Boukerb Mohamed, Garry Pascal (2020). **Revue bibliographique : risques de contamination des coquillages par les contaminations d'origine aviaire**. MAAF, Direction Générale de l'Alimentation, Bureau des Produits de la Mer et d'Eau Douce, Paris, Ref. mail du 6 mars de la DGAL, 5p.

Compte rendu d'analyse (20)

Suite à la possible contamination de coquillage par les norovirus, le laboratoire a analysé des échantillons et a communiqué ses résultats sous forme de 6 rapports d'analyse et 16 rapports d'essai (Parnaudeau Sylvain, Garry pascal, Le Guyader Soizick et Ollivier Joanna).

Communications dans des groupes de travail (7)

Brun Melanie, **Piquet Jean-Come, Rocq Sophie** (2020). Développement d'un outil statistique d'aide à la définition de seuils d'alerte pluviométrique dans le cadre du REMI. COPIL Surveillance Sanitaire des Zones de production de coquillages. 10 mars 2020, DGAL - Direction Générale de l'Alimentation, Paris.

Cochenne-Laureau Nathalie, **Garry Pascal, Piquet Jean-Come, Rocq Sophie, Le Guyader Soizick** (2020). Les norovirus, source majoritaire de contamination du littoral. Journée régionale " Enjeux bactériologiques et Profils de vulnérabilité conchylicole". 10 septembre 2020 à Pontivy.

Garry Pascal (2020). Bilan des analyses officielles. COPIL Surveillance Sanitaire des Zones de production de coquillages. 10 mars 2020, DGAL - Direction Générale de l'Alimentation, Paris.

Garry Pascal (2020). Plan exploratoire sur la prévalence des vibrios entéropathogènes. COPIL Surveillance Sanitaire des Zones de production de coquillages. 10 mars 2020, DGAL - Direction Générale de l'Alimentation, Paris.

Garry Pascal (2020). Actualités LNR microbiologie des coquillages. COPIL Surveillance Sanitaire des Zones de production des coquillages. 10 mars 2020, DGAL - Direction Générale de l'Alimentation, Paris.

Piquet Jean-Come, Rocq Sophie (2020). Bilan REMI 2019 et perspectives 2020. COPIL Surveillance Sanitaire des Zones de production de coquillages. 10 mars 2020, DGAL - Direction Générale de l'Alimentation, Paris.

Serais Ophelie, Gianaroli Camille, Cimiterra Nicolas, Fiandrino Annie, Munaron Dominique, Grouhel-Pellouin Anne, **Piquet Jean-Come, Rocq Sophie** (2020). Restitution des évaluations 2020 de la qualité des zones de production conchylicole de l'Occitanie. Réunion de restitution des évaluations 2020 de la qualité des zones de production de l'Occitanie. 02/09/2020, Sète.

Présentation dans des instances professionnelles

Garry Pascal, Piquet Jean-Come, Le Guyader Soizick (2020). Présentation du projet FEAMP APINOV. 36ème Salon National de la Conchyliculture et des Cultures Marines. 23/24 septembre 2020, Vannes.

Communications orales (webinar)

Le Guyader Soizick, L'Homme et son impact sur l'environnement marin. Science Po, Café des Sciences Politique de la Terre, 27 mai.

Le Guyader Soizick, Human viruses are everywhere: what about coastal environment, First webinar on food microbiology, Belgian society for Food Microbiology, 1-2 octobre.

Posters (3)

Desdouts Marion, Piquet Jean-Come, Rocq Sophie, Euller Gabriel, Le Guyader Soizick, Garry Pascal (2020). De la terre à la mer, les microbes sous surveillance. Fête de la science 2020. 09 au 11 octobre 2020, Muséum d'Histoire Naturel, Nantes. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00675/78756/>

Euller Gabriel, Desdouts Marion, Pilven Sophie, Le Guyader Soizick, Garry Pascal (2020). De la terre à la mer. "Usual suspects" de la contamination microbiologique des coquillages. Fête de la science 2020. 09 au 11 octobre 2020, Muséum d'Histoire Naturel, Nantes. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00675/78754/>

Euller Gabriel, Desdouts Marion, Pilven Sophie, Preux Guillemette, Le Guyader Soizick, Garry Pascal (2020). VirOdysée, la course du norovirus de la terre à la mer. Fête de la science 2020. 09 au 11 octobre 2020, Muséum d'Histoire Naturel, Nantes. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00675/78757/>

Participation à la formation

Participation à un jury de thèse ou HDR

Garry Pascal, Thèse de Doctorat Antoine Culot, « Développement d'une solution de bacteriophages spécifiques de bactéries pathogènes rencontrées en aquaculture », AgroCampusOuest, Rennes, 9 décembre 2020, Examineur.

Gourmelon Michèle, Thèse de Mahbubul Hasan Siddiquee, « Microbial Hazards from Faecal Pollution in Urban Estuaries A Case Study of the Lower Yarra River ». Université de Monash, Australie, 7 avril 2020, Rapporteur.

Hervio Heath Dominique. Thèse de Julia Mougin, "Approches microbiologiques et moléculaires pour lutter contre la vibriose de bar (*Dicentrarchus labrax*)" Université du Littoral Côte d'Opale, 11 décembre 2020. Examineur.

Le Guyader Soizick, Thèse de doctorat de l'Université de Rennes 1, ED Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation. Clément Drouillard, Origine de la pathogénécité des lagovirus: avancées sur la diversité génétique virale et le développement d'un système de génétique inverse, 8 septembre 2020, Rapporteur.

Le Guyader Soizick, HDR Université Paris Est, ED581 ABIES. SandraMartin-Latil, Virus transmis par voie alimentaire: du fondamental à l'appliqué, 16 septembre 2020, Rapporteur.

Le Guyader Soizick, Thèse de Diplôme d'état de Docteur en Pharmacie, Université de Rennes 1, thibaud Goupil, FHL1, une protéine essentielle à la réplication du virus Chikungunya dans l'infection du muscle, 9 octobre 2020.

Participation à un comité de thèse

Garry Pascal, 3^{ème} année de thèse de Antoine Culot, « Développement d'une solution de bacteriophages spécifiques de bactéries pathogènes rencontrées en aquaculture », AgroCampusOuest, Rennes.

Formation donnée

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée (en h.)
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
	Institut Pasteur, Paris	Master 2 Virologie Fondamentale,	Calicivirus : épidémiologie et rôle de l'environnement	2
	Université de Nantes	Master 2 Sciebce de l'Aliment	Les virus dans les produits de la mer : épidémiologie et techniques de détection	2
	Brest, faculté de Médecine	Master 2 MFA Virologie	Virus entériques et environnement.	3
Gourmelon Michèle	UBO, Brest	M2 MFA - UE Diversité des Écosystèmes Bactériens (DEB)	Contamination microbienne du littoral Identification des sources de contamination fécale	2

Expertise

Pascal Garry :

- Commission AFNOR V08B - Microbiologie des aliments
- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages
- ANSES

Soizick Le Guyader:

- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages (depuis 2002)

Michèle Gourmelon

- Conseil Scientifique du Parc National du Morbihan, Reunion groupe de travail (distanciel) 1^{er} Octobre 2020
- Conseil scientifique du projet MEDISA, METHodologie de Dimensionnement des Systèmes d'Assainissement, porté par l'Eau du Ponant, Brest. Copil, 5 février 2020

Dominique Hervio-Heath:

- CEN/TC 275– food analysis, WG 6 – Microbial contamination TAG 15, Vibrio.
- Projet IGA (EDF/Ifremer) – Référente/experte *Vibrio*

Françoise Vincent-Hubert

- Comité de pilotage projet CENOPAC « Innovation Suivi contamination Microbiologique » - Caen 13 octobre 2020

Sigles / abréviations

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
CEN : Comité Européen de Normalisation
CLI : Chair et Liquide Intervalvaire
COFRAC : Comité Français d'Accréditation
CRC : Comité Régional de la Conchyliculture
DDTM : Direction Départementale des Territoires et de la Mer
DGAI : Direction Générale de l'Alimentation
EFSA : European Food Safety Authority
EIL : Essai Inter-Laboratoire
EILA : Essai Inter-Laboratoire d'Aptitude
FAO : Food and Agriculture Organisation
LNR : Laboratoire National de Référence
LRUE : Laboratoire de Référence de l'Union Européenne
LSEM : Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie
NGS : Next-Generation Sequencing
NPP : Nombre le Plus Probable
OMS : Organisation Mondiale de la santé
PSPC : Plan de Surveillance Plan de Contrôle
RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed
REMI : Réseau de contrôle Microbiologique des zones de production conchyicole
SPF : Santé Publique France
TIAC : Toxi-Infection Alimentaire Collective