

Collaborateurs :

Desdouits Marion, Euller-Nicolas Gabriel, Vincent-Hubert Françoise, Kaelin Gaëlle, Kergaravat Cédric, Le Menec Cécile, Maillot Jessica, Ollivier Joanna, Parnaudeau Sylvain, Reynaud Yann, Rocq Sophie, Schaeffer Julien, Sorée Marion, Vallade Emilie, Véron Antoine, Wacrenier Candice.

RAPPORT D'ACTIVITES 2022

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

Fiche documentaire

Titre du rapport : Rapport d'activités 2022 – Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie.	
Référence interne : RBE/MASAE/LSEM	Date de publication : 03/2023
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	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(LSEM) pendant l'année 2022. Les actions du Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages, les activités de la coordination du réseau REMI sont présentées, et s'accompagnent de résumés des projets de recherche et des derniers développements de méthode.	
Mots-clés/ Key words : Microbiologie sanitaire, bactéries entériques, vibrions, virus entériques humains, norovirus, coquillages. Activité de référence, REMI.	
Comment citer ce document : P. Garry, F. S. Le Guyader, (2023), rapport d'activités 2022, 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/MASAE/LSEM 23-01
<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/MASAE/LSEM
Le Guyader Soizick, soizick.le.guyader@ifremer.fr	RBE/MASAE/LSEM
Validé par : Soizick Le Guyader	

Table des matières

1. introduction.....	5
2. Rappel des objectifs.....	5
3. Moyens et effectifs	6
3.1 Personnels Ifremer :	6
3.2 Personnel titulaire d'un contrat à durée déterminée.....	6
3.3 Doctorants	6
3.4 Post-doctorants	7
3.5 Stagiaires.....	7
3.6 Equipement.....	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 5ème Workshop organisé par le LRUE virus	9
4.4 27ème EURL-Salmonella workshop les 23 et 24 mai 2022	10
4.5 Assistance à l'administration	10
4.6 Normalisation	10
4.7 Analyses officielles	11
4.8 Participation aux essais des LRUE, Cefas et PHE.....	11
4.9 Diffusion de l'information à l'administration et/ou aux laboratoires agréés	12
4.10 Développement /validation de méthode.....	12
4.10.1 Culture cellulaire et infectiosité virale	12
4.10.2 Développement de la métagénomique.....	13
4.10.3 Estimation de la limite de détection et de quantification de méthode de quantification des norovirus	14
4.10.4 Réfrigération glutamate.....	15
4.10.5. Dénombrement Vibrio enteropathogène.....	15
4.11. Etude exploratoire pour la prise en compte des apports en norovirus sur les zones de production	15
5. Coordination REMI et études sanitaires.....	16
6. Actions liées aux projets de recherche	17
6.1 Goyave (Projet ANR n°19-CE35-0014)	18
6.2 ROME (Projet institut).....	18

6.3 Analyse de la diversité virale dans des palourdes (Projet avec le Cameroun).....	19
6.4 Phobi (Projet DS-PDG).....	20
6.5 VEO (Projet H2020 n° 874735).....	21
6.6 APINOV (Projet Feamp n°509528).....	21
6.7. OBEPINE (Projet MESRI).....	23
6.8 Emeraude (Projet ANR-MIE).....	25
Production scientifique et technique	28

1. introduction

Ce rapport présente nos différentes actions et résultats dans le cadre de notre mission de laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages, ainsi qu'un résumé de nos projets de recherche. Nos actions de LNR sont diverses entre les échanges avec les laboratoires agréés, l'organisation de la journée pour la Microbiologie et l'Environnement ou les interactions avec les différents LRUEs en charge des microorganismes d'intérêt pour notre thématique. Un évènement particulier cette année a été l'organisation d'un atelier sur l'utilisation de la métagénomique pour décrire la diversité des norovirus dans les huîtres. Cet évènement, co-organisé avec le LRUE-virus in food, montre le rôle important joué par notre équipe qui associe recherche et référence. Ces développements méthodologiques et les autres actions de recherche permettent à l'équipe de contribuer à une meilleure compréhension des mécanismes de contamination de l'environnement littoral.

2. Rappel des objectifs

Au titre de Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des coquillages, les missions et objectifs en 2022 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, notamment par l'organisation d'essais inter-laboratoires d'aptitude
- 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.

Ces activités de référence s'appuient sur des projets de recherche permettant de :

- développer des techniques de détection des 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 sont évaluées;
- 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 en développant des outils pour une surveillance de l'émergence (veille bibliographique et épidémiologique).

3. Moyens et effectifs

Nom	Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie (LSEM)- LNR Ifremer
Adresses	Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311 Nantes Cedex 03
Téléphone	(33) 2 40 37 40 52
Mail	Soizick.Le.Guyader@ifremer.fr
Site internet	https://lsem.ifremer.fr/

3.1 Personnels Ifremer :

Personnel permanent (pendant la période)

Responsable du laboratoire : LE GUYADER Soizick

DESDOITS Marion	C - 100%
GARRY Pascal	C - 100%
VINCENT-HUBERT Françoise	C - 91%
KAELIN Gaëlle	C - 100%
LE MENNEC Cécile	T - 100%
MAILLOT Jessica	T - 80%
OLLIVIER Joanna	C - 100%
PARNAUDEAU Sylvain	T - 100%
REYNAUD Yann	C - 100%
ROCQ Sophie	C - 100%
SCHAEFFER Julien	C - 100%
VALLADE Emilie	T - 80%
VERON Antoine	T - 100%
WACRENIER Candice	T - 100%

C: cadre, T : technicien

3.2 Personnel titulaire d'un contrat à durée déterminée

Nom - Prénom	Qualification	Date arrivée	Date départ	Projet
Gauffriau Mathias	Technicien	01/12/21	31/12/22	Projet APINOV
Jazat Jennifer	Ingénieur	01/12/221	01/12/22	Projet Goyave

3.3 Doctorants

Nom - Prénom	Début de thèse	Date de soutenance	Sujets	Ecoles Doctorales d'inscription	Encadrement scientifique
Sorée Marion	01/10/18	28/10/2022	Mécanismes de virulence de <i>Vibrio parahaemolyticus</i> , bactérie	Université Bretagne Occidentale, Brest	D. Hervio Heath

			potentiellement pathogène pour l'homme		
Bonny Patrice	01/10/18	10/01/2023	Qualité microbiologique des palourdes de la rivière Sanaga	Université de Yaoundé	J-J. Essia Ngang F.S. Le Guyader
Euller Gabriel	01/10/19	17/05/2023	Norovirus, sapovirus et les huîtres : apport du modèle entéroïde intestinal et interactions avec les glycanes.	Université de Nantes	F.S. Le Guyader, M. Desdouits

3.4 Post-doctorants

Nom - Prénom	Date début	Date fin	Sujet	Encadrement scientifique
Laure Barbé	11/01/2021	10/02/2022	Projet Disco	S. Le Guyader, M. Desdouits

3.5 Stagiaires

Nom - Prénom	Début du stage	Fin du stage	Sujet	Niveau d'étude	Ecole	Encadrement scientifique au LSEM
Kilian Denis	09/05/22	17/07/22	Utilisation de capteurs passifs pour l'analyse de la diversité des norovirus en milieu marin	DUT	IUT de Brest	Vincent-Vincent-Hubert Françoise
Marine Cau	06/01/22	30/06/22	Study of the infectivity of norovirus in oysters using the human enteroid model.	Master 2	Université de la Rochelle	Marion Desdouits
Romane Bidois	04/04/22	10/06/22	Développement du dénombrement des Vibrio enteropathogènes par PCR en microplaques	DUT	IUT St Nazaire	Pascal Garry

3.6 Equipement

En 2022 le laboratoire s'est équipé d'un appareil biomark de la société Fluidigm. Cet équipement combine les technologies de la PCR haute performance, haut débit et de la nanofluidique. Il permet différentes applications telles que :

- Détection génomique et screening de souches de micro-organismes (bactériens et viraux),
- Criblage de d'agents pathogènes pour l'Homme, identification de gène de virulence,
- Confirmation spécifique de l'expression de gènes cibles identifiés par séquençage NGS (RNAseq)
- Approche quantitative par PCR microfluidique
- Préparation de bibliothèques pour l'approche en métagénomique ciblée (type métabarcoding) ou métagénomique.

Par ailleurs le laboratoire a fait l'acquisition d'un appareil pour mesurer la taille et la charge de nanoparticules (cofinancement dans le cadre la convention DGAI-Ifremer pour le LNR microbiologie des coquillages), cette acquisition permettra entre autres de caractériser les particules virales.

4. Actions liées aux missions de LNR

4.1 Démarche qualité

En décembre 2022 le LSEM a passé avec succès son évaluation de surveillance, 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 coquillages (portée disponible sur www.cofrac.fr, n° accréditation 1-5451).

Concernant les activités dans le cadre des missions LNR, l'année 2022 est marquée par l'achèvement de l'intégration à la démarche qualité des activités pour l'organisation des comparaisons inter-laboratoires au LSEM. De plus, un effort important logistique et documentaire a été effectué afin de proposer aux laboratoires une comparaison inter-laboratoire pour la quantification des norovirus dans les coquillages vivants lors de la campagne 2023.

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*, *Salmonella* et norovirus le 28 mars 2022.

L'essai d'aptitude portant sur les deux paramètres réglementaires (*E. coli* et *Salmonella*) a été réalisé sur la matrice huître. Chacun des laboratoires peut utiliser une ou plusieurs méthodes pour chacune des bactéries cibles. L'envoi aux participants comportait cinq échantillons pour l'essai *E. coli* (contaminés à environ 2 100 *E. coli*/100g de CLI) et un échantillon positif pour l'essai *Salmonella*, le deuxième échantillon était naturellement contaminé par *Salmonella* et de façon hétérogène. Les résultats obtenus par les laboratoires sur cet échantillon n'ont pas été pris en compte pour leur évaluation. Le nombre de participants est donné dans le Tableau 1 et les résultats obtenus par les laboratoires sont reportés dans le Tableau 2.

Tableau 1 : Bilan des participations aux essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella*

<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>
31 laboratoires (41 couples laboratoire/méthode)	26 laboratoires (37 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	Non satisfaisant	Satisfaisant	Non satisfaisant
35 couples	5 couples	1 couple	37 couples	0 couple

Des résultats discutables pour le dénombrement des *E. coli* ont été obtenus avec la méthode NF EN ISO 16649-3 pour 3 laboratoires et sont dus à des problèmes de fidélité. 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.

L'ensemble des laboratoires a été satisfaisant pour *Salmonella*.

Concernant l'essai inter-laboratoire pour la recherche des norovirus dans les coquillages, les 9 laboratoires (5 laboratoires agréés) ont reçu trois échantillons d'huîtres creuses congelés. 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 Détecté dans 2g de TD
2	Huitres creuses	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de TD
3	Huitres creuses	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de tissus digestifs	Génome viral Détecté dans 2g de TD

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

Les 9 laboratoires ont présenté une performance satisfaisante pour cet essai d'aptitude, un laboratoire n'a pas recherché VHA (cible non concernée par l'agrément).

4.2.2 Expertises, avis, assistance technique

Comme les années précédentes, l'assistance technique a concerné essentiellement le suivi de la performance des laboratoires participants 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 LNR a porté assistance aux laboratoires dans l'application de la norme ISO 15216-2 pour la détection des norovirus plus particulièrement dans le cadre de l'accréditation de ces laboratoires.

Le laboratoire a reçu du 3/10/2022 au 6/10/2022 deux personnes de l'Institut Pasteur Guyane afin de les former à différentes techniques analytiques (dénombrement *E. coli*, recherche *Salmonella* spp, recherche des *Vibrio* enteropathogènes et dectection qualitative et quantitative des norovirus).

La formation a également portée sur l'analyse des eaux usées et la métagenomique.

4.3 5ème Workshop organisé par le LRUE virus

Le 31 mai, le LRUE a organisé une journée sur la détection des virus dans les aliments par les approches de métagenomiques. Ce groupe de discussion est composé de 15 personnes, appartenant à quelques LNRs. Les présentations ont porté sur les outils de bio-informatiques, bases de données en ligne spécifiques pour les norovirus (M. de Graaf, EMC, Pays-Bas), l'approche métagenomique ciblée long fragment (R. Ericksson, LRUE), résultats obtenus lors du projet Moonstone (projet EFSA piloté par le LSEM).

Le workshop réunissant les différents LNR a commencé le 1er juin par la présentation de P. Hunter (UK) sur l'analyse de risque des norovirus dans les aliments et en particulier dans les huîtres. Sa conclusion a été que la transmission des norovirus par les aliments peut être estimée à 22,3 cas par rapport à 59 infections /1000 personnes soit 38% (ou 1/3 de cas..). Les huîtres restent l'aliment le plus à risque, mais si on arrête de consommer des huitres cela ne changera pas l'épidémiologie du virus. P. Caricato (DG Santé) a ensuite rappelé le besoin de faire évoluer la réglementation et la difficulté de trouver un consensus entre les états membres. Ensuite différents points liés au fonctionnement du LRUE et du réseau des LNRs ont été abordés : essais inter-laboratoires, rédaction de guide, la détection de virus de l'hépatite E, les changements

de réactifs par les fournisseurs... Ce réseau en s'intéressant à un large panel d'aliment soulève des questions complémentaires à celles liées aux coquillages.

4.4 27ème EURL-Salmonella workshop les 23 et 24 mai 2022

Ce workshop a été organisé en visio-conférence, par le RIVM (Pays-Bas) qui est LRUE *Salmonella*. Très peu de sujets concernaient les coquillages. Le Norwegian Institute of Marine Research recherche *Salmonella* sur une centaine d'échantillons de moules et d'oursins chaque année.

Différents points ont été abordés :

En 2020, la France a notifié 138 foyers de Salmonellose et arrive en 3^{ème} position des pays européens derrière la Slovaquie (216) et la Pologne (211). En Europe il y a eu 694 foyers, 3686 malades et 7 morts. Le premier vecteur de *Salmonella* reste les œufs et produits à base d'œufs.

De plus en plus de LNR utilisent en routine le NGS : notamment pour la détection de gènes de résistance et la comparaison des souches. Une base de données européenne de profils génomiques des bactéries impliquées dans des TIAC est en cours de construction.

Le LRUE n'organisera pas d'essai inter laboratoires sur les coquillages en 2022 ni 2023 mais probablement en 2024.

4.5 Assistance à l'administration

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

- Le 25 mars, réunion pour la programmation des PSPC 2023 organisée par la DGAL en visio-conférence
- Le 10 mai, réunion d'appui à l'administration pour la constitution de dossier pour l'export de mollusques bivalves vers les USA
- Le 29 juin, copil de la surveillance organisée par la DGAL,
- le 25 novembre, coordination des EILA, organisée par l'Anses, en visio-conférence.

Le 25 janvier, nous avons réalisé une présentation des activités de LNR et des méthodes d'analyse dans le cadre de la Mission d'audit du système de surveillance des mollusques bivalves par les autorités turques.

Par ailleurs deux avis ont été émis :

- sur le document visant à identifier des pistes pour la possible révision des directives sur l'application des principes généraux d'hygiène alimentaire à la maîtrise des virus dans les aliments (CAC/GL 79-2012),
- sur le projet de révision des Directives du Codex sur l'application des principes généraux en matière d'hygiène sur la maîtrise de *Vibrio* spp. dans les fruits de mer (CXG 73-2010).

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

4.7 Analyses officielles

Toxi-infections alimentaires collectives

Peu de TIAC liées à la consommation de coquillages ont été rapportées en 2022. Le LNR a été destinataire de huit échantillons d'huîtres, deux échantillons de moules et un échantillon de palourdes. Parmi ces échantillons six étaient des restes de repas. Les norovirus ont été recherchés sur dix des échantillons, Sept échantillons dont cinq restes de repas étaient positifs. Une demande de recherche de VHA sur un échantillon de moules a conduit à une absence de détection.

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.

4.8 Participation aux essais des LRUE, Cefas et PHE

Le LSEM a participé à différents essais inter-laboratoires européens au cours de l'année 2021. Ces essais sont organisés par le Cefas, PHE (Public Health England), le LRUE *Salmonella* (RIVM) ou encore par le LRUE virus (Uppsala, Suède).

Le nombre d'essais et de comparaisons inter-laboratoires auxquels a participé le laboratoire reste similaires aux années précédentes. Les résultats des participations à ces comparaisons inter-laboratoires sont satisfaisants (Tableau 4).

Tableau 4 : Participation du LSEM aux différents essais interlaboratoires

Caractéristique ou grandeur	Matrice	Date	Organisateur de la CIL	Résultat	Commentaires
Recherche du génome du virus de l'hépatite A	Broyat de tissus digestifs	14/11/22	EURL Sweden	Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
	Coquillages entiers	28/03/22	Ifremer	Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
Recherche du génome des norovirus, génogroupes I et II	Broyat de tissus digestifs	14/11/22	EURL Sweden	Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
	Coquillages entiers	28/03/22	Ifremer	Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
Quantification du génome des norovirus, génogroupes I et II	Broyat de tissus digestifs	26/04/21	EURL Sweden	Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
		14/11/22		Satisfaisant	Analyse de 3 échantillons.
Nombre d' <i>Escherichia coli</i> β -glucuronidase positive	Coquillages vivants	28/03/22	Ifremer	Satisfaisant	Analyse de 5 échantillons
	Coquillages vivants	23/11/22	Cefas	En attente du rapport	Analyse de 2 échantillons.
	Lenticules	22/11/21	PHE	Satisfaisant	Analyse de 2 échantillons,
		28/11/22		En attente du rapport	Analyse de 2 échantillons.

Caractéristique ou grandeur	Matrice	Date	Organisateur de la CIL	Résultat	Commentaires
Nombre d' <i>Escherichia coli</i>	Coquillages vivants	28/03/22	Ifremer	Satisfaisant	Analyse de 5 échantillons,
		23/11/22	Cefas	En attente du rapport	Analyse de 2 échantillons.
Recherche de <i>Salmonella</i> spp.	Coquillages vivants	28/03/22	Ifremer	Satisfaisant	Analyse de 2 échantillons.
	Coquillages vivants	23/11/22	Cefas	En attente du rapport	Analyse de 2 échantillons.
	Lenticules	22/11/21	PHE	Satisfaisant	Analyse de 2 échantillons,
		28/11/22		En attente du rapport	Analyse de 2 échantillons.

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

Liste des documents diffusés :

- Rapport d'activités LNR 2021 et relevé des dépenses (Convention LNR – DGAI 2021)
- Rapports des essais d'aptitude *E. coli* et *Salmonella* sur des échantillons d'huîtres
- Rapport de l'essai d'aptitude norovirus et VHA sur des huîtres
- Compte rendu et résolutions du 5^{ème} workshop des LNR virus
- Organisation journée SEM le 18 octobre
- Rencontre du LNR *Vibrio* de l'ANSES Boulogne, le 14 juin : échange sur les travaux menés par les deux équipes et sur les méthodes

4.10 Développement /validation de méthode

4.10.1 Culture cellulaire et infectiosité virale

Un protocole pour l'isolement de virus infectieux depuis les tissus de coquillages contaminés a été mis au point au laboratoire mais il utilise un réactif non commercial dont la composition est mal connue (CatFloc). Nous avons testé différentes alternatives commerciales de composition chimique connue et validé l'utilisation de l'un deux, le polyDDAC, qui permet d'obtenir un rendement équivalent voire supérieur, pour norovirus au niveau génomique (Figure 1). Ce produit permet d'isoler du virus Tulane, un virus de substitution proche du norovirus, et de cultiver celui-ci sur des cellules in vitro. En revanche, si le protocole permet bien d'isoler des souches de norovirus GII, leur réplique sur cellules souches intestinales humaines (entéroïdes) est inhibée par un composé co-isolé depuis les tissus d'huître. L'optimisation du protocole est en cours pour surmonter cet écueil. Par ailleurs, nous avons conduit une étude montrant que les entéroïdes peuvent également permettre la réplique des sapovirus (Figure 2), un autre genre viral responsable de gastroentérites chez l'Homme qui a déjà été observé dans les coquillages et associé à des infections alimentaires. Ceci permettra d'étudier la persistance et le pouvoir infectieux des sapovirus dans le milieu littoral en comparaison avec les norovirus.

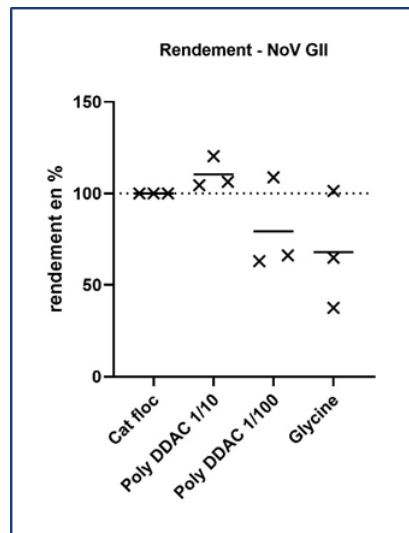


Figure 1. Rendement en norovirus GII mesuré par qRT-PCR, après application du protocole d'isolement viral avec une étape de flocculation utilisant le CatFloc, le poly-DDAC dilué au 1/10 ou au 1/100 dans un tampon glycine, ou le tampon glycine seul. L'expérience a été réalisée trois fois et montre que le poly-DDAC 1/10 peut remplacer le CatFloc. Des résultats similaires ont été obtenus avec norovirus GI.

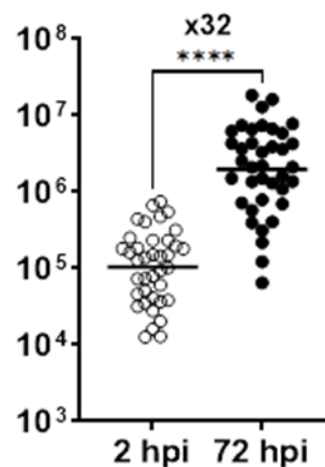


Figure 2. Réplication d'une souche de sapovirus GI dans les cellules souches intestinales humaines (enteroïdes) J2. La quantité de sapovirus dans les cultures a été mesurée par PCR quantitative 2h et 72h après l'inoculation (hpi). En moyenne sur 38 expériences, le génome viral s'est multiplié d'un facteur 32, ce qui signe une réplication virale modérée mais répétable, avec une très forte significativité statistique ($p < 0.0001$).

4.10.2 Développement de la métagénomique

Le laboratoire poursuit son travail d'optimisation et de développement sur les méthodes NGS, notamment au travers de l'approche métagénomique. Une étude sur la diversité virale dans des prélèvements d'eaux usées archivées depuis 2006 a permis de démontrer l'intérêt de réplicats biologiques au cours du protocole d'analyse. Ainsi 12 échantillons ont été analysés sous forme de quatre réplicats biologiques, soit un total de 48 bibliothèques séquencées. Les données ont été traitées individuellement et pour un même échantillon en additionnant les données des 4 réplicats. Sur la figure 3 sont présentés les contigs obtenues pour les bibliothèques séparées (points bleus) et pour les bibliothèques groupées (points oranges) pour les 12 échantillons pour les mamastrovirus (A), enterovirus (B) et norovirus (C). Globalement les contigs sont plus longs lorsqu'on analyse les données en groupant les données des réplicats des bibliothèques. De plus, la taille du point

représente la couverture, exprimée comme un ratio entre la couverture du contig considéré divisé par la couverture la plus grande obtenue pour le genre viral. La couverture renseigne sur la confiance dans la séquence du contig et comme pour la longueur, l'analyse groupée des données procure majoritairement les meilleurs résultats.

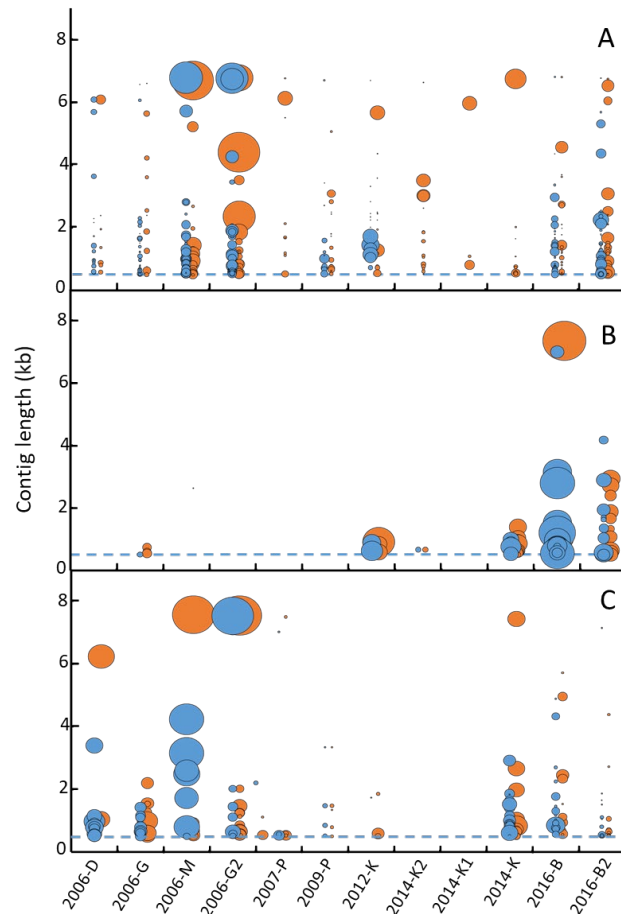


Figure 3: Comparaison de la taille des contigs obtenus à partir de l'analyse individuelle ou groupée des bibliothèques pour trois genres viraux.

Ces données ont été produites en utilisant une étape de capture (VirCapSeq-Vert) pour enrichir en séquences virales, or ce panel de capture proposé par Roche n'est plus disponible. Cette étape de capture est indispensable pour appliquer la métagénomique aux échantillons de l'environnement (Strubbia at al 2019 et 2020) et une comparaison de deux alternatives proposées par Illumina et Twist Biosciences sera prochainement conduite.

4.10.3 Estimation de la limite de détection et de quantification de méthode de quantification des norovirus

Le LNR est toujours dans l'attente de la publication du guide du LRUE pour l'estimation des limites de détection et de quantification des méthodes de recherche des norovirus et VHA.

4.10.4 Réfrigération glutamate

La méthode NF EN ISO 16649-3 pour le dénombrement des dénombrements des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive (méthode NPP), prévoit le repiquage des tubes de glutamate sur milieu TBX après 24h00 d'incubation, sans dérogation possible. Dans certains cas pour les prélèvements dont l'analyse débute le vendredi (notamment lors de prélèvement en alerte dans le cadre des alertes REMI), il n'est pas toujours possible de réaliser le repiquage des tubes de glutamate sur milieu TBX après les 24h00 d'incubation tel qu'exigé par la norme NF EN ISO 16649-3. La réfrigération des tubes de glutamate après 24h00 d'incubation et leur stockage pendant 48h00 à 4°C permettrait ainsi de décaler le repiquage sur milieu TBX, sous réserve que la conservation à 4°C, ne modifie pas le résultat de dénombrement.

Pour vérifier ce point, une étude spécifique a été conduite en utilisant des huîtres contaminées à des concentrations comprises entre 10^2 et 105 E. coli pour 100 g de chair et liquide intervallaire. Après prélèvement, les échantillons ont été mis en analyse en respectant la norme NF EN ISO 6887-3 pour la préparation de la suspension mère et la norme 16649-3 pour le dénombrement des E. coli. Les tubes de glutamate ont été repiqués sur milieu TBX après 24h00 d'incubation conformément à la norme NF EN ISO 16140-3. Ces mêmes tubes ont ensuite été conservés à $4^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$ pendant 48h00 puis repiqués sur milieu TBX. L'étude a été menée sur 36 replicats.

Il n'a pas été observé de différences entre les codes NPP obtenus selon les deux conditions de repiquage. Cette expertise pourra également être complétée par des résultats obtenus par les laboratoires agréés.

4.10.5. Dénombrement *Vibrio* enteropathogène

Le LNR a poursuivi les travaux de caractérisation de la méthode développée au laboratoire pour quantification des *Vibrio* potentiellement pathogènes pour l'homme (*Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 et *Vibrio vulnificus*) dans les coquillages. Cette méthode d'analyse est une méthode NPP-PCR en temps réel sur plaques de 96 puits pour la quantification de *V. parahaemolyticus* totaux et entéropathogènes et est également appliquée à la quantification de *V. cholerae* non-O1/non-O139 et *Vibrio vulnificus* dans les coquillages. Les principaux travaux initiés en 2022 vont se poursuivre en 2023, et portent sur la vérification de la linéarité et la définition des limites de quantification.

4.11. Etude exploratoire pour la prise en compte des apports en norovirus sur les zones de production

L'une des conclusions du groupe d'experts EFSA lors de l'analyse des résultats obtenus lors de l'étude européenne sur la prévalence des norovirus dans les huîtres (EFSA 2019) indique que le « risque de contamination par les norovirus devrait être pris en compte dans les études sanitaires et les programmes de surveillance continue ».

Cette étude pilote a pour objectif de regarder la faisabilité et l'intérêt de la prise en compte de cette recommandation de l'EFSA. Il s'agit de réaliser pendant un an des prélèvements réguliers de coquillages à différents points de la zone suivie en vue de la recherche des norovirus et du dénombrement des *E. coli* et de recenser les apports potentiels de contamination. Sur la zone sélectionnée pour cette étude cinq points de prélèvements ont été définis dans le cadre de l'étude sanitaire associée.

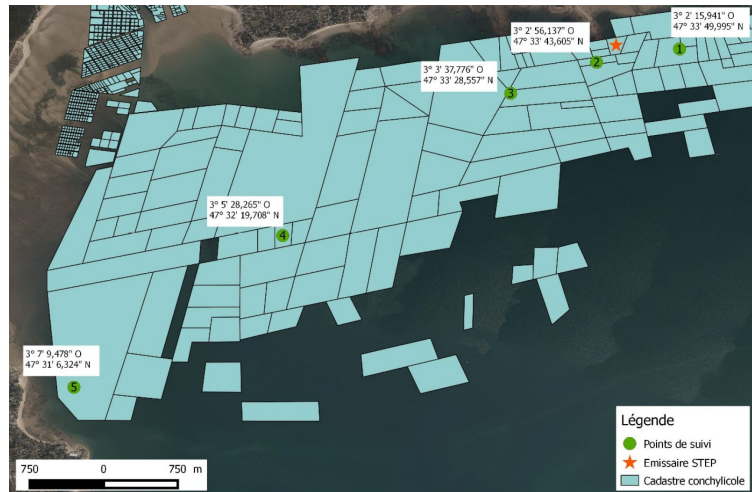


Figure 4 : Point de suivis pour le suivi norovirus et E. coli.

L'étude a démarré en avril 2022 et se terminera en mars 2023 les prélèvements sont réalisés deux fois par mois en avril 2022 et de novembre 2022 à mars 2023 et une fois par mois de mai à octobre 2022.

4.12. Formation des LNR « Approche NGS pour étudier la diversité des norovirus dans les mollusques bivalves ».

En novembre 2022 le LSEM, en partenariat avec LRUE virus dans les aliments, a organisé un cours destiné aux LNR européens sur les techniques NGS pour étudier la diversité génétique des norovirus dans les mollusques bivalves. L'objectif du cours était de présenter les avancées en approche métagénomique et fournir aux LNRs un protocole de métagénomique ciblée basée sur le séquençage des amplicons, ainsi que le pipeline bioinformatique pour l'analyse des données NGS. Les méthodes transmises sont les techniques développées dans le cadre de projet Moonstone financé par EFSA (OC/EFSA/BIOCONTAM/2018/01).

5. Coordination REMI et études sanitaires

L'IFREMER apporte un appui scientifique et technique à la Direction Générale de l'Alimentation (DGAL) et aux Directions Départementales Interministérielles (DDi) pour la mise en œuvre du dispositif de surveillance REMI (depuis 2018). L'appui fourni par l'Ifremer comprend notamment le suivi d'indicateurs (taux de réalisation, respect des délais de prélèvement et de la localisation des points à échantillonner) qui contribuent au bon déroulement des opérations à la fois à l'échelle nationale mais aussi pour chaque département.

Au cours de l'année 2022, la surveillance régulière REMI s'est appuyée sur 407 lieux de suivi prélevés régulièrement (hors zones à exploitation occasionnelle), représentant environ 4 600 résultats obtenus à la fois dans le cadre d'une surveillance programmée et d'une surveillance événementielle en cas de risque de contamination ou de contamination avérée. Le traitement des données à l'échelle nationale indique une bonne qualité microbiologique (A) pour 26% des 322 zones de production pour lesquelles la qualité peut être estimée sur la période 2020 à 2022, 67% sont de qualité moyenne (B), et 7 % sont de mauvaise ou très mauvaise qualité (C ou au-delà).

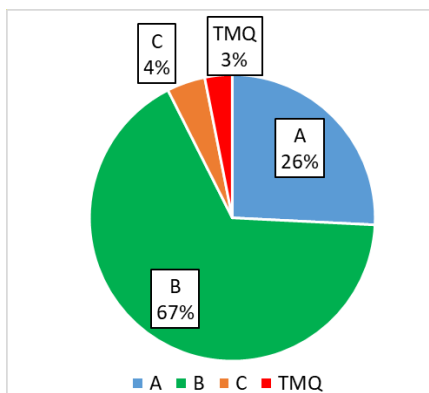


Figure 5 : Qualité microbiologique (A, B, C ou Très mauvaise qualité) des zones de production de coquillages suivies par le REMI, dont la qualité peut être estimée sur la période 2020-2022.

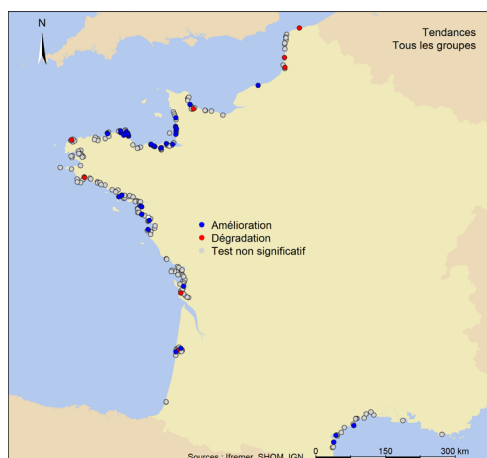


Figure 6 : Tendances d'évolution des niveaux de contamination sur les lieux REMI, période 2013-2022.

L'analyse des tendances sur la période 2013-2022 (10 ans) indique une amélioration de la qualité bactériologique sur 52 lieux de prélèvement, une dégradation sur 10 lieux et l'absence de tendance significative ou un historique inférieur à 10 années sur les autres lieux.

Contribuant à l'optimisation de la stratégie d'échantillonnage pour évaluer la contamination des zones littorales, le LSEM a réalisé une étude sanitaire pour deux zones de production dans le Finistère, qui a été finalisée en 2022 : rivière du Bélon intermédiaire (groupes 2 et 3) et rivière du Bélon aval (groupes 2 et 3). Deux autres zones en Charente-Maritime ont bénéficié d'études sanitaires, réalisées par le LER Pertuis Charentais et coordonnées par le LSEM : dans le secteur de Daire et dans le secteur de « Château sud », pour le groupe 2. A noter qu'un rapport intermédiaire a été produit par le LER d'Arcachon, avec l'appui du LSEM, pour l'ensemble des zones du Bassin d'Arcachon en Gironde (groupes 2 et 3).

Plusieurs autres études sanitaires sont en cours et devraient aboutir en 2023 : deux zones dans le Morbihan (baie de Plouharnel-groupes 2 et 3, baie de Quiberon-groupes 2 et 3), trois zones en Vendée (nord-ouest du Gois-groupes 2 et 3, nord-est du Gois-groupes 2 et 3, les chenaux du Payré-groupe 3), les zones du bassin d'Arcachon en Gironde, pour les groupes 2 et 3, une zone en Charente-Maritime (La Moulinatte, groupe 3), trois zones en baie du Mont-Saint-Michel (Baie du Mont Saint-Michel rivage, Zone conchylicole Hirel, Zone conchylicole Cherrueix, groupes 2 et 3) et une zone dans le Finistère (Eaux profondes Guilvinec-Bénodet, groupe 3).

6. Actions liées aux projets de recherche

6.1 Goyave (Projet 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 virus entériques. La caractérisation des glycanes de la famille HBGA portés par les huîtres s'est poursuivie par des approches de cytométrie en flux, de biochimie et d'histologie, qui montrent des résultats complémentaires. Ces glycanes sont bien présents à la fois à la surface des cellules d'huîtres et dans les tissus digestifs, les branchies et le manteau, mais avec des distributions variables. Un résultat important du projet est que les norovirus se lient principalement avec des molécules de haut poids moléculaire qui sont présents dans le tissu digestif des huîtres, qui portent ces glycanes HBGA, et qui pourraient correspondre à des mucines. La caractérisation de ces molécules et de leur impact sur la persistance des norovirus se poursuivent.

6.2 ROME (Projet institut)

Le réseau ROME (Réseau d'Observatoires pour la recherche en Microbiologie Environnementale intégrée) est basé sur l'utilisation des méthodes de NGS sur l'ADN environnemental. Des échantillons d'eau et d'huîtres creuses sont prélevés mensuellement sur quatre sites sélectionnés et analysés pour la recherche de virus ARN et ADN, de bactéries, de protistes et de phytoplancton. Ces sites sont l'Étang de Thau, Marennes Oléron, la rade de Brest et la Baie des Veys. Dans ce réseau transversal de l'IFREMER, le LSEM est impliqué dans la recherche des virus à ARN, d'origine humaine principalement, sur les échantillons d'eau et de coquillages, mais également dans l'obtention des extraits d'ARN et d'ADN issus des huîtres creuses pour la recherche des autres microorganismes analysés dans ROME.

L'utilisation de la métagénomique, c'est-à-dire le séquençage haut débit sans amplification ciblée (comme le metabarcoding) doit permettre la détection de virus émergents. Pour cela, une extraction ciblant spécifiquement les virus à ARN est nécessaire pour se débarrasser des microorganismes les plus présents, tel que les bactéries, qui pourraient influencer sur le résultat de séquençage. Une étape d'enrichissement par capture des bibliothèques en séquence virale était prévue, mais l'arrêt de production par le fournisseur ne nous a pas permis d'effectuer cette étape.

Les résultats obtenus sur la première année du projet (sept 2020 – oct 2021) démontrent l'efficacité des méthodes utilisées pour la détection de virus à ARN (figure 7)

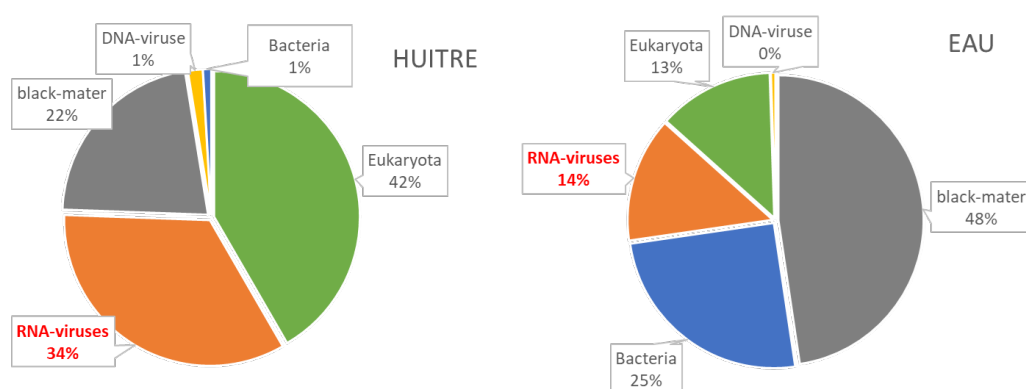


Figure 7 : répartition des séquences par type de microorganismes.

Une analyse plus spécifique des familles virales d'intérêt, par leur aspect sanitaire, ne montre aucune détection des genres les plus marquant d'une contamination humaine (fig. 8).

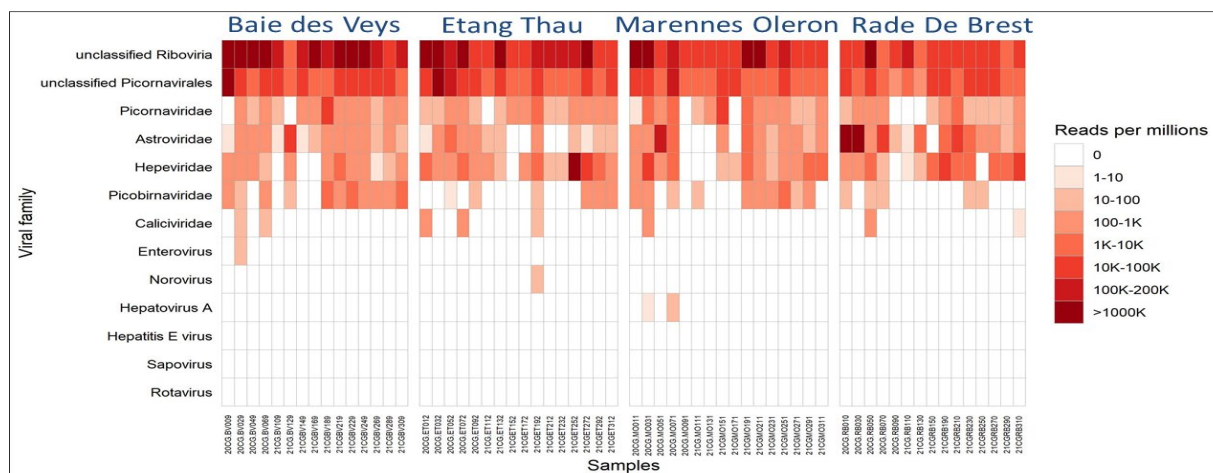


Figure 8 : heatmap des familles et genres d'intérêt.

Lors des journées ROME (14 octobre 2022, Nantes) la proposition de réaliser un screening des échantillons pour les principaux genres viraux d'intérêt par PCR haut débit, avec le BioMark, est accepté. Cela permet de détecter un panel important de virus cibles et d'éviter ainsi la réalisation de bibliothèques et de séquençage, étapes onéreuses, sur des échantillons peu contaminés par des rejets humains.

6.3 Analyse de la diversité virale dans des palourdes (Projet avec le Cameroun).

De nombreuses pandémies récentes ont été reconnues comme des maladies virales zoonotiques, bien que leurs origines restent souvent inconnues, la contamination environnementale peut jouer un rôle important dans leur émergence. Ainsi, être capable de décrire la diversité virale dans les échantillons environnementaux contribue à comprendre les problèmes clés de la transmission zoonotique. Ce travail décrit l'utilisation d'une approche métagénomique pour évaluer la diversité des virus à ARN eucaryotes dans les palourdes de la rivière Sanaga et identifier les séquences de virus humains ou présentant un potentiel risque zoonotiques. Des échantillons de palourdes collectés sur une période de deux ans ont, dans un premier temps, été analysés pour détecter la présence de norovirus afin de vérifier la contamination humaine. Les échantillons sélectionnés ont été ensuite analysés par métagénomique. La fraction virale représentait 0,8-15% des reads, la plupart des séquences (68-87%) restant inconnues. Pourtant, plusieurs virus à ARN de mammifères ont été identifiés. Par exemple des séquences appartenant à la famille des Astroviridae étaient les plus abondantes, avec quelques génomes presque complets de bastrovirus. Les séquences de la famille des Picobirnaviridae étaient liées à des souches infectant les chauves-souris, et quelques autres à des séquences détectées chez l'homme ou d'autres hôtes. Les séquences identifiées comme appartenant à la famille des Hepeviridae étaient principalement liées à des souches détectées dans des échantillons d'éponges, mais aussi à des souches provenant d'échantillons de porcs. Pour la famille des Caliciviridae et Picornaviridae, la plupart des séquences identifiées étaient liées aux souches infectant les chauves-souris, avec quelques séquences proches du norovirus humain, du picornavirus, et du virus de l'hépatite A du génogroupe V.

Malgré la nécessité d'améliorer la sensibilité de notre méthode, cette étude décrit une grande diversité de séquences de virus à ARN provenant d'échantillons de palourdes. Décrire tous les contaminants viraux dans ce type d'aliments, et être capable d'identifier l'hôte infecté par les séquences virales détectées, peut aider à

comprendre certains événements de transmission zoonotique et alerter les autorités sanitaires d'une éventuelle émergence.

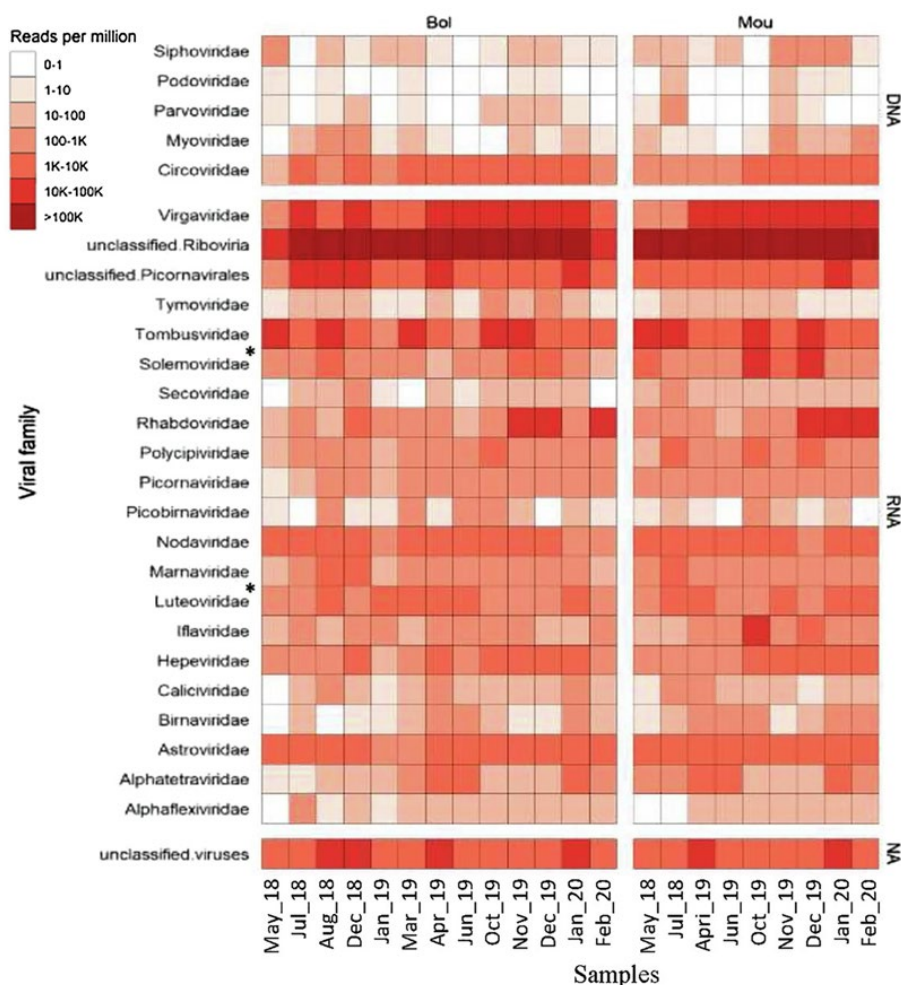


Figure 9 : Diversité virale observée dans les palourdes de la rivière Sanaga estimée par une approche métagénomique.

6.4 Phobi (Projet DS-PDG)

A Saint-Pierre et Miquelon, les interactions croissantes entre les phoques, animaux sauvages protégés dont la population augmente de façon importante et les activités humaines constituent un sujet d'importance. L'observation récurrente de contamination en *Escherichia coli*, bactérie indicatrice de contamination fécale, sur des sites colonisés par des phoques soulève des questions sanitaires, dans le contexte « One Health ». Ce projet présente une réelle opportunité pour la recherche de bactéries et virus dans les fèces de phoques, afin d'évaluer un impact éventuel sur les activités humaines (conchyliculture, baignade, pêche récréative). Par ailleurs mieux connaître les communautés microbiennes présentes dans ces fèces présente un intérêt considérant le peu de données disponibles.

Entre mai 2019 et mai 2020, 22 fèces de phoques ont été collectés à Saint Pierre et Miquelon. Ces échantillons ont été analysés selon les protocoles optimisés en fonction de la cible (bactérie ou virus). Pour la diversité bactérienne, l'approche métabarcoding a été appliquée après extraction des acides nucléiques

et amplification des ARN 16S. Pour les virus à ARN, après purification puis concentration, les acides nucléiques ont été extraits et des triplicats de bibliothèques ont été préparés pour chaque échantillon pour une analyse par métagénomique. Les séquences ont été analysées en utilisant les outils développés et validés au laboratoire.

Les communautés bactériennes se caractérisent par une abondance majoritaire des Firmicutes ainsi que des Bacteroidetes. Cette analyse a permis de décrire un marqueur bactérien associé à ces animaux, qui trouvera une application concrète sur différents sites marins pour évaluer l'impact de cette contamination par des fécès de phoques. L'analyse du virome a permis de caractériser de nouveaux génomes de virus proches de ceux détectés chez l'homme comme des virus de la famille des Caliciviridae ou Astroviridae, et pour lesquels un transfert zoonotique ne pourrait être exclu.

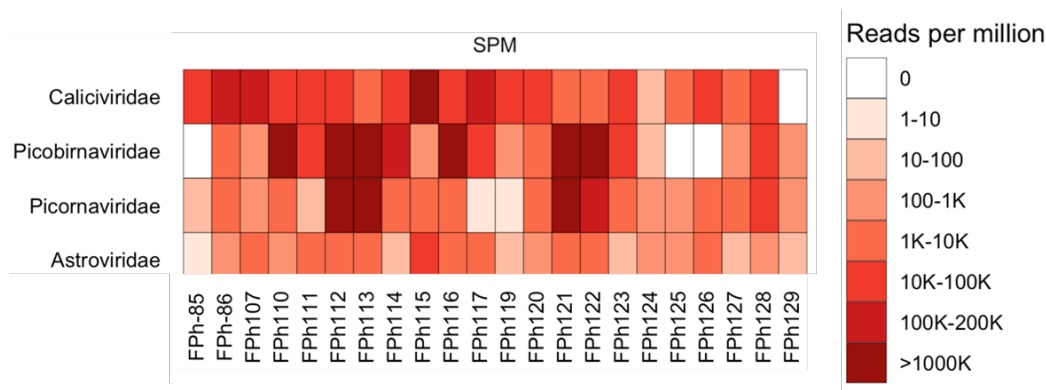


Figure 10 : Diversité de virus enteriques dans les différents échantillons de fécès de phoques.

Décrire la diversité microbienne d'échantillons prélevés dans des sites exposés à des contaminations d'origine animale et humaine constitue un challenge important à relever pour les années futures.

6.5 VEO (Projet H2020 n° 874735)

Le projet VEO (Versatile Emerging infectious disease Observatory), débuté en 2020 pour une durée de 5 ans est coordonné par M. Koopmans (EMC) et F. Aarestrup (DTU). La contribution du LSEM se concentre essentiellement sur le WP8, (Understanding Silent Epidemics Use Case Scenario) avec l'optimisation de méthodes pour évaluer la surveillance des agents pathogènes dans les eaux usées comme outil de prédiction ou de détection d'émergence. Le suivi du SARS-CoV-2 et norovirus dans les deux stations d'épuration de Nantes s'inscrit dans cet objectif. Dans le cadre de ce suivi la métagénomique est également utilisée pour décrire la diversité des micro-organismes pathogènes présents dans les eaux usées et par conséquent circulant au niveau de la population.

6.6 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 méthodologiques récents pour répondre à un enjeu majeur pour la conchyliculture : les norovirus.

Dans le cadre du WP1 du projet APINOV, les capteurs passifs sont utilisés afin d'identifier l'origine géographique de la contamination par les norovirus (NoV) à l'échelle d'un bassin versant en amont de sites ostréicoles. Le déploiement des capteurs, a débuté en novembre 2020 et s'est terminé en avril 2022 sur les 12 sites d'étude de la rivière de Crach, avec une fréquence bimensuelle d'octobre à avril et mensuelle de mai à septembre. Pour les 18 mois d'étude, ce qui représente plus de 330 échantillons, les norovirus GI et GII ont été détectés sur 11 sites sur 12. La fréquence de membranes positives est plus élevée sur les sites d'eau douce que sur les sites marins côtiers pour les 18 mois de monitoring (Tableau 5). La première période épidémique se caractérise par une fréquence élevée de membranes positives en NoV GI, alors que pour la deuxième période épidémique, la fréquence de membranes positives pour NoV GII est plus élevée.

Enfin, la fréquence de sites positifs en NoVs est plus importante pendant la période épidémique. Afin de déterminer la diversité des norovirus sur les sites contaminés, l'analyse par métagénomique ciblée a débuté en fin d'année après optimisation du protocole à partir de membranes de référence.

Tableau 5 : Fréquence de contamination des membranes/site (%)

Sites de prélèvement	Nov-20 -> avril-21	Mai -21 -> sept-21	Oct-21 -> avril-22
Rivières			
S1	33	*	0
S2	27	0	15
S3	55	0	15
S4	18	0	31
S5	18	0	23
S6	27	*	23
S7	9	0**	0
Sites marins			
S8	30	0	8
S9	36	20	23
S10	10	0	15
S11	0	20	0
S12	0	0	0

*pas d'échantillon (rivière à sec); **un seul prélèvement réalisé

Le WP2 « Optimiser la purification des huitres contaminées par les norovirus » a pour objectif de répondre à deux questions scientifiques :

1) quel est l'effet d'augmentation de l'activité physiologique sur l'élimination des virus ?

2) est-il plus facile d'éliminer une contamination récente ou une contamination répétée et plus ancienne ?

Afin de calculer la décroissance des génomes viraux, deux températures de l'eau des bassins de purification (8 et 18°C) ont été testées. La contamination des huîtres a été réalisée par baignade en eau de mer contaminée avec des eaux usées positives en norovirus pendant 24 heures afin d'imiter un apport ponctuel. Cet apport d'eau usée a été répété pendant 7 jours pour simuler une contamination récurrente de la zone de production.

Les huîtres ont été maintenues 28 jours en bassin en circuit fermé avec un flux d'eau traitée par les UV de 25-30 L/ heure, considérant un ratio d'un litre par huître. Les résultats sont en cours d'exploitation

Le WP3 a pour objectif d'évaluer l'ultrafiltration pour la décontamination virale de l'eau de mer et son fonctionnement en circuit fermé

L'efficacité de l'ultrafiltration pour éliminer les virus a été évaluée prenant en compte trois paramètres (i) le taux de rétention globale de la membrane, (ii) le taux de rétention moyen en considérant l'augmentation de la concentration du côté du rétentat, et (iii) le taux de rétention médian prenant en compte la variation de concentrations dans le perméat.

Les taux de rétention moyens observés pour le virus de Tulane, virus de substitution pour les norovirus, étaient compris entre 2 et 6 log. Ces taux de rétention étaient plus élevés pour (i) les concentrations initiales plus fortes (agglomération) et (ii) l'eau de mer par rapport à l'eau douce (colmatage plus élevé). L'efficacité de l'ultrafiltration a été confirmée sur l'eau de mer contaminée par des norovirus, avec un taux de rétention allant jusqu'au 3,5 log (Figure 11). En conclusion l'ultrafiltration, avec une rétention élevée des virus montre un intérêt pour améliorer la qualité de l'eau de mer en cas de contamination du littoral. Cette approche pourrait de fournir aux professionnels de la conchyliculture une eau de mer de bonne qualité sanitaire afin d'alimenter des bassins de dépuración ou des bassins maintenus en circuit fermé permettant ainsi de préserver des coquillages.

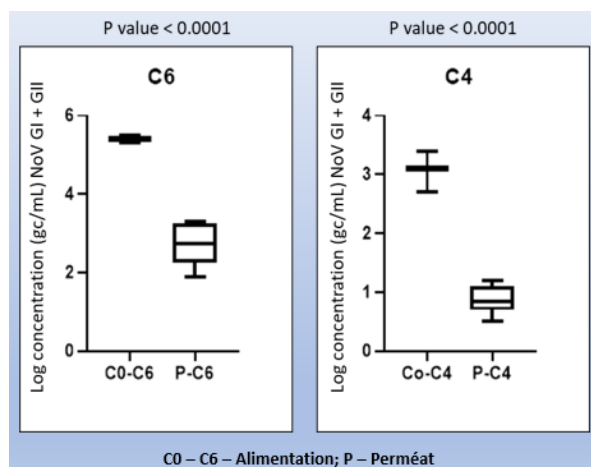


Figure 11 : Taux de réduction de la concentration virale dans l’eau de mer calculé pour les norovirus (génogroupes I + II).
C0 – C6 – alimentation ; P – perméat.

6.7. OBEPINE (Projet MESRI)

Afin de pouvoir effectuer des analyses en métagénomique ciblant à la fois des virus à ARN enveloppés et non enveloppés à partir d’échantillonneurs passifs, l’étape d’élution a été optimisée pour qu’elle soit compatible avec les étapes ultérieures de filtration et les traitements enzymatiques (traitement NGS). L’élution virale par le Tween 20 (dilué soit dans du PBS soit dans un tampon Tris HCl 0.01M) avec ou sans sonication a été testée sur des membranes préalablement contaminées expérimentalement par des eaux de station d’épuration pendant 24h.

Les premiers essais (essais A) ont montré que l’élution par le Tween 20 (dilué dans du tampon Tris) avec ou sans sonication permet de détecter les virus SARS-CoV-2 et NoV GII avec des valeurs de Ct comparables à celles obtenues par lyse directe. D’autres essais d’élution (essais B) ont montré que le traitement NGS permet d’améliorer la détection par rapport à la lyse directe.

Le rendement normalisé (élution Tween 20/lyse directe) calculé pour comparer les essais A et B entre eux montre que l’élution avec sonication permet d’améliorer la détection des deux virus par rapport à la lyse directe (100 %) (Figure 12); pour l’élution par le Tween 20, le rendement normalisé est supérieur uniquement pour NoV GII (153%), alors que pour SARS-CoV-2 le rendement normalisé est comparable à la lyse directe.

Cette méthode d’élution sera complétée par une analyse en métagénomique ciblée (SARS-CoV-2 et NoV) pour comparer la diversité virale pour chaque méthode de récupération des virus.

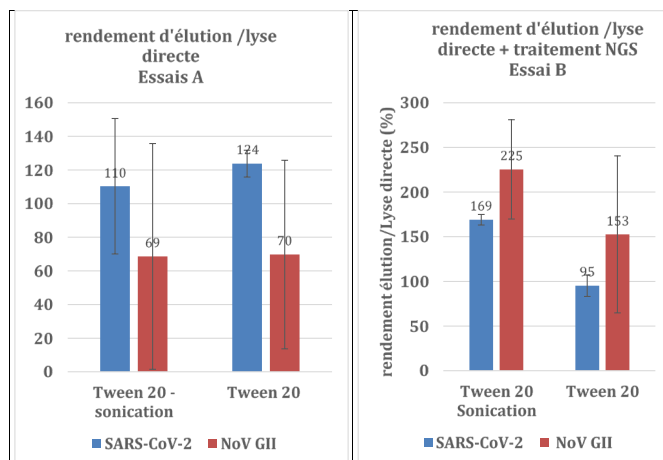


Figure 12 : Rendement de récupération virale par élution rapporté au rendement de récupération par lyse directe
Essais A : élution sans traitement NGS ; Essais B : élution avec traitement NGS.

Ces développements trouvent une application dans le projet RATVAR qui a pour objectif d'évaluer les souches de SARS-CoV-2 dans les égouts et les populations de rat.

Les échantillonneurs passifs présentent l'intérêt d'être faciles à mettre en œuvre sur des sites où les préleveurs automatiques ne peuvent pas être utilisés, favorisant ainsi les mesures sur le réseau des eaux usées des grandes villes pour suivre le génome du virus à l'échelle de quartiers ou de résidences. Nous testons actuellement les échantillonneurs passifs avec pour objectifs de détecter et de séquencer les variants du SARS-CoV-2 échantillonnés par échantillonnage passif, à l'échelle des quartiers des métropoles. Nos résultats montrent que la membrane nylon immergée 24h dans le réseau des eaux usées permet de détecter le virus à des concentrations supérieures à celles mesurées par échantillonnage ponctuel, ce qui montre le caractère intégratif des échantillonneurs passifs (Figure 13).

La deuxième phase de ce projet, qui vise à séquencer le génome dans son intégralité (séquençage à haut-débit, Mi-Seq) en utilisant le protocole du réseau ARTIC, a été réalisée et les analyses sont en cours.

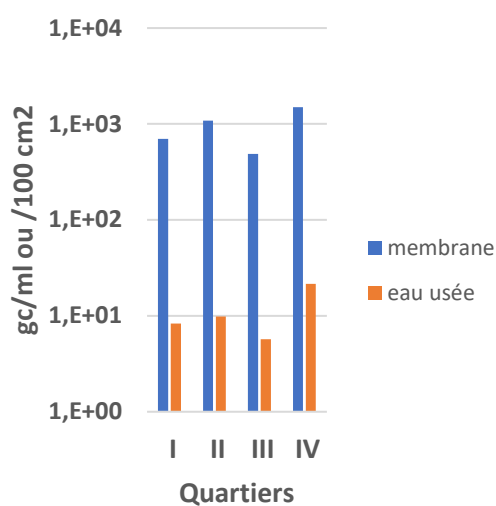


Figure 13 : Concentrations de SARS-CoV-2 sur les membranes.

Les membranes ont été immergées 24 h dans le réseau des eaux usées dans 4 quartiers d'une métropole française. gc pour copies de génome.

6.8 Emeraude (Projet ANR-MIE)

Le projet Emeraude, financé par l'ANR-MIE via le consortium Emergen, a débuté le 1^{er} janvier 2022 pour une durée d'un an. Il regroupe des équipes du Groupement d'Intérêt Scientifique Obépine (LSEM, LCPME de l'université de Nancy, Sorbonne Université, Eau de Paris) et de nouveaux partenaires (IUT de Strasbourg, CEA). Son objectif est de développer et valider des méthodes pour la détection et le séquençage des variants SARS-CoV-2 dans les eaux usées, pour des études prospectives et rétrospectives de l'émergence de ces variants. Le LSEM est particulièrement impliqué dans le work-package « Aquathèque », qui vise à tester l'impact des conditions de stockage des échantillons d'eaux usées sur les analyses en aval. Les résultats obtenus sur 1 an, impliquant 3 partenaires du projet, confirment que la conservation des eaux usées brutes est maximale à -80°C, mais acceptable à -20°C. Un séquençage du génome entier est prévu afin de confirmer ces résultats non pas seulement pour la détection des génomes mais pour l'obtention de séquences de qualité et l'identification des variants.

6.9 Vers une meilleure approche de la virulence et de la gestion du risque de *Vibrio parahaemolyticus*, bactérie marine potentiellement pathogène pour l'Homme (thèse Marion Sorée, soutenue le 28/10/2022)

Vibrio parahaemolyticus (Vp) est une bactérie marine considérée comme la principale cause bactérienne de gastroentérites liées à la consommation de produits de la mer crus ou insuffisamment cuits chez l'Homme dans le monde entier. L'absence de facteurs de virulence connus (TDH, TRH, système de sécrétion de type III (T3SS)) chez des souches Vp isolées de cas cliniques souligne la nécessité de mieux caractériser ces facteurs et leur expression dans des modèles *in vivo*. De plus, un réel manque existe concernant l'implication de facteurs biotiques associés à l'hôte, ici l'huître *Crassostrea gigas*, sur l'accumulation et la dépuration de Vp dans leurs tissus. Les objectifs de cette thèse sont de mieux caractériser le potentiel pathogène des souches environnementales de Vp et identifier les facteurs associés aux huîtres qui pourraient avoir un impact sur les niveaux de contamination de ces bactéries dans leurs tissus. Dans un premier temps, une analyse génomique a été combinée à une caractérisation phénotypique de la virulence grâce à deux modèles *in vivo* : le lapin et larves de *Galleria mellonella*. Les résultats ont montré que, d'une part, la TDH n'est pas un indicateur pertinent de la pathogénicité de Vp chez le modèle lapin, et d'autre part, que le T3SS-1 de Vp joue un rôle dans la mortalité des larves. Il s'agit de nouvelles observations très intéressantes qui devront être examinées davantage. Les expérimentations sur *C. gigas* ont montré que les huîtres cultivées dans des structures sécurisées accumulaient expérimentalement plus de Vp que les huîtres cultivées en milieu intertidal et que, le niveau de ploïdie des huîtres (diploïde vs triploïde) n'a pas eu d'impact sur la contamination naturelle, l'accumulation expérimentale et la dépuration de Vp. Enfin, l'utilisation de bactéries lactiques présentant des activités d'inhibition de la croissance de Vp *in vitro*, a permis d'obtenir des résultats prometteurs concernant l'élimination de Vp pendant la dépuration d'huîtres.

7. Conclusion et perspectives 2023

Ce rapport synthétique de nos diverses activités montre la diversité de nos actions et leur complémentarité entre référence, expertise et recherche. Par exemple le développement des outils omiques dans le cadre de projet de recherche nous a permis d'organiser un atelier pour nos collègues des LNRs européens intéressés par le typage de norovirus dans les coquillages. Le développement sur la mise en évidence des norovirus infectieux est également prometteur. L'année 2022 a été également importante pour le projet APINOV, et l'obtention de résultats concrets sur la gestion et la prévention de la contamination des huîtres par les norovirus.

Fort de ces résultats et de ces développements technologiques les objectifs pour les années à venir sont variés et renforcent notre conviction de poursuivre ce tryptique référence, expertise et recherche mais également 'surveillance' avec un axe important à développer sur la vigilance concernant les agents pathogènes émergents.

ANNEXES

Participation à la formation

Participation à un jury de thèse ou HDR

Soizick F. Le Guyader:

Thèse, F.H. Andrianjakarivony : Caractérisation du virome d'un écosystème tropical fortement anthropisé : la lagune Ebrié en Côte d'Ivoire, Université Aix-Marseille, 16 décembre, Direction de thèse : Christelle Desnue et Yvan Bettarel.

HDR, N. Boudaux : Caractérisation et maîtrise du danger à norovirus et virus de l'Hépatite A dans les aliments et leur environnement, Université de Caen, 04 mars

HDR, I. Vasilache Gouandjika : Infections virales chez les enfants de moins de 15 ans en République Centrafricaine, Université de Paris Cité, Institut Pasteur, 29 novembre

Yann Reynaud

Aurélié Mesnil, 11 octobre : Émergence, dynamique évolutive et écologie de lignées pathogènes de bivalves marins au sein de l'espèce bactérienne *Vibrio aesturianus*. Université de la Rochelle. Direction de thèse : Marie Agnès Travers et Delphine Destoumieux.

Participation à un comité de thèse

Françoise Vincent-Hubert

J. Do Nascimento, 22 septembre (2ème réunion du copil) : intérêt de l'utilisation de la dreissène pour l'évaluation de la contamination virale des masses d'eau. Université Reims Champagne-Ardenne.

Soizick F. Le Guyader

L. Percevault, : apport des organoïdes porcins dans l'étude des interactions moléculaire hôtes-pathogènes du virus de la gastrentérite transmissible. Université Bretagne-Loire, 06 juin.

Formation donnée

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée
Soizick F. Le Guyader	Université François Rabelais, Tours	Master 2 ICMVAT et IDOH conjoints (en anglais)	Viral contamination of the environment	2h
	Université Pierre et Marie Curie, Paris VI	Master 2 MAPES-QUESS, Composantes hygiéniques de la qualité, maîtrise des risques	Virus entériques humains et environnement	2h
	Institut Pasteur, Paris	Master 2 Virologie Fondamentale,	Calicivirus : épidémiologie et rôle de l'environnement	2h
	Université de Nantes et Rennes	Master 2 Science de l'Aliment (en visio)	Les virus dans les produits de la mer : épidémiologie et techniques de détection	2h

Nom de l'agent	Organisme	Niveau	Sujet	Durée
	Université de Nantes	Manimal (en anglais)	Viral contamination of the coastal environment	3h
	Brest, faculté de Médecine	Master 2 MFA Virologie	Virus entériques et environnement.	3h
Marion Desdouts	Université Pierre et Marie Curie - Museum d'Histoire Naturelle	M2 Aquamicro	Virus infectant l'Homme dans les milieux aquatiques	1,5h
	Université de Reims	M1 Risques et Environnement	Virus entériques dans l'environnement	2h
Joanna Ollivier, Marion Desdouts, Candice Wacrenier, Julien Schaeffer Soizick Le Guyader	Co-organisation avec le EURL Foodborne Viruses	LNR européens virus	Training CourseNGS to study the norovirus diversity in shellfish Nantes, 23-24 November 2022	2 jours

Expertise

Pascal Garry :

- Commission AFNOR V08B - Microbiologie des aliments
- Communauté Européenne, Laboratoire National de Référence pour la Microbiologie des Coquillages
- Comité scientifique et organisationnel 16^{ème} Congrès National de la Société Française de microbiologie

Soizick F. Le Guyader:

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

Françoise Vincent- Hubert

- Comité Scientifique et Technique du projet Innovation Suivi contamination Microbiologique (ISM) 1er septembre 2022, St-Lô.
- Comité de pilotage final du projet Innovation Suivi contamination Microbiologique (ISM) 21 novembre 2022, St-Lô.

Production scientifique et technique

Articles

Barbe L., Schaeffer J., Besnard A., Jousse S., Wurtzer S., Moulin L., Obepine Consortium, **Le Guyader S., Desdouts M.** (2022). SARS-CoV-2 Whole-Genome Sequencing Using Oxford Nanopore Technology for Variant Monitoring in Wastewaters. *Frontiers In Microbiology*, 13, 889811 (14p.). Publisher's official version : <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.889811> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00775/88715/>

Cluzel N., Courbariaux M., Wang S., Moulin L., Wurtzer S., Bertrand I., Laurent K., Monfort P., Gantzer C., **Le Guyader S.**, Boni M., Mouchel J.-M., Maréchal V., Nuel G., Maday Y., Obépine Consortium (2022). A nationwide indicator to smooth and normalize heterogeneous SARS-CoV2 RNA data in wastewater. *Environment International*, 158, 106998 (21p.). Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106998> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00736/84787/>

Desdouts M., Polo Montero D., **Le Mennec C., Strubbia S.**, Zeng Xi-L., Ettayebi K., Atmar Robert L., Estes M.K., **Le Guyader S.** (2022). Use of Human Intestinal Enteroids to Evaluate Persistence of Infectious Human Norovirus in Seawater. *Emerging Infectious Diseases*, 28(7), 1475-1479. Publisher's official version : <https://doi.org/10.3201/eid2807.220219> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00786/89824/>

Ollivier J., Lowther J., **Desdouts M., Schaeffer J., Wacrenier C.**, Oude Munnink Bas B., **Besnard A.** Mota Batista F., Stapleton T., Schultz A. C., Aarestrup F., Koopmans M., de Graaf M., **Le Guyader S.** (2022). Application of Next Generation Sequencing on Norovirus-contaminated oyster samples. *EFSA Supporting Publications*, 19(6), EN-7348E (144p.). Publisher's official version : <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2022.EN-7348> , Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00776/88826/>

Munk P., Brinch C., Møller F. D., Petersen T.N., Hendriksen R.S., Seyfarth A.M., Kjeldgaard J.S., Svendsen C. A., Van Bunnik B., Berglund F., Bego A., Power P., Rees C., Lambrinidis D., Neilson E. H. Jakobsen, Gibb K., Coventry K., Collignon P., Cassar S., Allerberger F., Begum A., Hossain Z. Z., Worrell C., Vandenberg O., Pieters I., Victorien Dougnon T., Gutierrez A. D. Salazar, Soria F., Grujić Vesna R., Mazalica N., Rahube T.O., Tagliati C. A., Rodrigues D., Oliveira G., de Souza L. C. Ribeiro, Ivanov I., Juste Bonkoungou I., Oumar T., Sopheak T., Vuthy Y. Ngandijo A. Nzouankeu A., Olivier Z. A. Abah J., Yost C. K., Kumar P., Brar Satinder K., Tabo Djim-A., Adell A. D., Paredes-O. E., Martinez M. C., Cuadros-Orellana S., Ke C., Zheng H., Baisheng L., Lau Lok T., Chung T., Jiao X., Yu Y., Jiayong Z., Morales J. F. Bernal, Valencia M. F., Donado-Godoy P., Coulibaly Kalpy J., Hrenovic J., Jergović M. Karpíšková R., Deogratias Zozo N., Elsborg B., Hansen L. Truelstrup, Jensen Pernille E., Abouelnaga M., Salem M.F., Koolmeister M., Legesse M., Eguale T., Heikinheimo A., **Le Guyader S., Schaeffer J.**, Villacis J. E., Sanneh B., Malania L., Nitsche A., Brinkmann A., Schubert S. Hesse S., Berendonk T. U., Saba Courage K. S., Mohammed J., Feglo P. K., Banu R. A., Kotzamanidis C., Lytras E., Lickes S. A., Kocsis B., Solymosi N., Thorsteinsdottir T. R., Hatha Abdulla M. Ballal M., Bangera S.R., Fani F., Alebouyeh M., Morris D., O'connor L., Cormican M., Moran-Gilad J., Battisti A., Diaconu E. L., Corno G., Di Cesare A., Alba P., Hisatsune J., Yu L., Kuroda M., Sugai M., Kayama S., Shakenova Z., Kiiyukia C., Ng'eno E., Raka L. Jamil K., Fakhraldeen S. A. Alaati T., Bērziņš A., Avsejenko J. Kokina K., Streikisa M., Bartkevics V., Matar G.M., Daoud Z., Pereckienė A., Butrimaite-Ambrozeviciene C. Penny C., Bastaraud A., Rasolofoarison T., Collard J.-M., Samison L.H., Andrianarivelo Mala R., Banda D. L., Amin Arshana, R. H., Parimannan S., Spiteri D., Haber M. V., Santchurn Sunita J., Vujacic A., Djurovic D., Bouchrif B., Karraouan B., Vubil Delfino C., Pal P. Schmitt H., Van Passel M., Jeunen G.-J., Gemmell N., Chambers S.T., Mendoza F.P., Huete-Perez J., Vilchez S., Ahmed Akeem O., Adisa I. R., Odetokun Ismail A., Fashae K., Sørgaard A.-M., Wester A.L., Ryrfors P., Holmstad R., Mohsin M., Hasan R., Shakoor S., Gustafson N. W., Schill C. H., Rojas M. L. Z., Velasquez J. E., Magtibay B. B., Catangcatang K., Sibulo R., Yauce F.C. Wasy D., Manaia C., Rocha Ja., Martins J., Álvaro P., Di Yoong Wen D., Shin H., Hur Hor-G. Yoon S., Bosevska G., Kochubovski M., Cojocararu R. Burduniuc O., Hong P.-Y., Perry M. R., Gassama A., Radosavljevic V. Tay Moon Y. F., Zuniga-Montanez R., Wuertz S., Gavačová D., Pastuchová K., Truska P., Trkov M., Keddy K., Esterhuyse K., Song Min J., Quintela-Baluja M., Lopez Mariano G., Cerdà-Cuéllar M., Perera R. R. D. P., Bandara N. K. B. K. R. G. W., Premasiri H. I., Pathirage S., Charlemagne K., Rutgersson C., Norrgren L., Örn S., Boss R., Van Der Heijden T., Hong Y.-P., Kumburu Happiness H., Mdegela Robinson H., Hounmanou Yaovi Mahuton G., Chonsin K. Suthienkul O., Thamlikitkul V., de Roda Husman A. M. Bidjada B., Njanpop-Lafourcade B.-Ma., Nikiema-Pessinaba Somtinda C., Levent B., Kurekci C., Ejobi F., Kalule John B., Thomsen

J., Obaidi O., Jassim Laila M., Moore A., Leonard A., Graham D.W., Bunce J. T., Zhang L., Gaze W. H., Lefor B., Capone D., Sozzi E., Brown J., Meschke J. S., Sobsey M. D., Davis M., Beck N. K., Sukapanpatharam P., Truong P., Lillenthal R., Kang S., Wittum T.E., Rigamonti N., Baklayan P., Van Chinh D., Tran Doan Minh N., Do Phuc N., Kwenda G., Larsson D. G. J., Koopmans M., Woolhouse M., Aarestrup F. M. (2022). Genomic analysis of sewage from 101 countries reveals global landscape of antimicrobial resistance. *Nature Communications*, 13(1), 7251 (16p.). Publisher's official version : <https://doi.org/10.1038/s41467-022-34312-7>, Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00808/91994/>

Taligrot H., Monnot M., **Ollivier Joanna**, Cordier C., Jacquet N., **Vallade E.**, **Garry P.**, Stavrakakis C., **Le Guyader S.**, Moulin P. (2022). Retention of the Tulane virus, a norovirus surrogate, by ultrafiltration in seawater and production systems. *Aquaculture*, 553, 738096 (9p.). <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2022.738096>

Vincent-Hubert F., **Wacrenier C.**, **Desdouits M.**, **Jousse S.**, **Schaeffer J.**, Le Mehaute Ph., Nakache-Danglot F., **Le Guyader S.**, Obepine Consortium (2022). Development of passive samplers for the detection of SARS-CoV-2 in sewage and seawater: Application for the monitoring of sewage. *Science Of The Total Environment*, 833, 155139 (8p.). Publisher's official version : <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.155139>, Open Access version : <https://archimer.ifremer.fr/doc/00765/87737/>

Ouvrages

Jacquet S., Beaudoux A-C., Desdevises Y., **Le Guyader S.**. Les virus marins, Edition Quae (111 pages).

Communications orales

Congrès internationaux:

Le Guyader S., **Strubbia S.**, **Schaeffer J.**, **Bonny P.**, **Desdouits M.**, Oude Munnink B., Essian Ngang J-J., de Graaf, M. Koopmans M. Metagenomic to describe human and animal enteric virus in environmental samples. 7th International symposium on food and environmental virology, Santiago de Compostela, 16-20 mai.

Le Guyader S.: Can we use metagenomic approaches to describe enteric virus diversity in food samples? IAFFP meeting, Pittsburg (USA), 31 juillet - 3 août, communication sur invitation.

Le Guyader S.: How new technologies can help to identify human enteric viruses on coastal-environment and shellfish. BfR-Symposium Lebensmittelassoziierte viren, Berlin (Allemagne) 8 novembre. Communication sur invitation.

Le Guyader S.. Shellfish and human viruses, MOOC Water-borne infectious diseases, Institut Pasteur, 2022.

Ollivier J. Ultrafiltration efficacy to eliminate the virus from seawater 7th International symposium on food and environmental virology, Santiago de Compostela, 16-20 mai.

Congrès nationaux:

Le Guyader S.: Les phoques: une source potentielle de contamination virale du littoral? Congrès des sciences aquatiques, Saint-Pierre et Miquelon, 23-27 septembre 2022.

Euller G. (2022). Réplication de sapovirus humain dans le modèle entéroïde intestinal. SFM 2022 - 17e congrès national de la SFM « La microbiologie dans tous ses états ». 3 au 5 octobre 2022, Montpellier.

Groupes de travail :

- Garry P.**(2022). Point sur les méthodes disponibles et en cours de développement. Réunion sur les *Vibrio* dans les denrées aquatiques, Direction Générale de l'Alimentation, visio du 10 novembre 2022.
- Garry P.**(2022). Bilan des activités. Laboratoire National de Référence microbiologie des coquillages. Journée Santé, Environnement et Microbiologie 2022. 18 octobre 2022, Nantes.
- Garry P., Le Guyader S., Parnaudeau S., Veron A., Rocq S., Ollivier J., Vincent-Hubert F., Stavrakakis C., Le Razavet V., Allenou J-P., Moulin P., Monnot M.** (2022). Présentation du projet FEAMP APINOV. CDSQEL - Réunion Qualité des eaux du littoral en Loire Atlantique. 10 mars 2022, Nantes.
- Garry P., Rocq S., Le Guyader S.** (2022). Etude norovirus Baie de Quiberon. Comité de suivi des études de zone Baie de Plouharnel - Baie de Quiberon. 25 avril 2022, Lorient.
- Garry P.** (2022). Actualités des laboratoires agréés LNR Microbiologie des coquillages. Comité de pilotage - Qualité sanitaire des coquillages vivants. Direction Générale de l'Alimentation, 29 juin 2022, Paris.
- Garry P.** (2022). L'animation d'un réseau de laboratoires agréés. Mission d'audit du système mollusque bivalves par les autorités turques, le 25 janvier 2022.
- Le Guyader S.:** Evaluation de la diversité des virus entériques humains: de la terre à la mer. Groupe de travail Mibiogate, Nantes, en ligne 3 février.
- Le Guyader S.** (2022). Describing norovirus diversity in European oyster using metagenomics. 1st meeting NGS Core working group of NRLs for Foodborne viruses. 10 mai, Uppsala (Suède)
- Le Guyader S. :** Use of metagenomic to describe human enteric virus contamination in oysters. EURL La Tremblade, en ligne, 29 mars.
- Le Guyader S., Garry P.** (2022). Les norovirus: un point d'actualité. CDSQEL - Réunion Qualité des eaux du littoral en Loire Atlantique. 10 mars 2022, Nantes.
- Ollivier J.** (2022). Ultrafiltration pour la décontamination virale de l'eau de mer: résultats du projet APINOV. Journée Santé, Environnement et Microbiologie 2022. 18 octobre 2022, Nantes.
- Reynaud Y., Lancelot T., Rocq S.** (2022). Journée REMI. Journée Réseau de contrôle Microbiologique 2022. 17 octobre 2022, Nantes.
- Reynaud Y., Rocq S.** (2022). Journée LSEM 2022. Bilan du REMI 2021. Journée Santé, Environnement et Microbiologie 2022. 18 octobre 2022, Nantes.
- Reynaud Y., Rocq S.** (2022). Echanges AELB / REMI. Réunion avec l'Agence de l'Eau Loire-Bretagne (AELB). 07 octobre 2022, Nantes.
- Reynaud Y., Rocq S.** (2022). Pluviométrie et alertes REMI: éléments d'aide à la décision. Comité de pilotage - Surveillance des coquillages. Direction Générale de l'Alimentation. 29 juin 2022, Paris.
- Reynaud Y., Rocq S.** (2022). REMI - études sanitaires : bilan 2021. Comité de pilotage - Surveillance des coquillages. Direction Générale de l'Alimentation, 29 juin 2022, Paris.
- Reynaud Y., Desdouits M., Parnaudeau S., Le Guyader S.** (2022). Perspectives autour de l'exploration de la diversité des microorganismes potentiellement pathogènes pour l'homme par des approches haut-débit. Journées ROME - Réseau d'Observatoires pour la recherche en Microbiologie Environnementale intégrée. 13 & 14 octobre 2022, Nantes.

Vincent-Hubert F. (2022). Les capteurs passifs : un outil d'évaluation de la qualité microbiologique des eaux. Journée Santé, Environnement et Microbiologie 2022. 18 octobre 2022, Nantes.

Vincent-Hubert F. (2022). Detection of sars-cov-2 in sewage with passive samplers. Séminaire du réseau Obépine, 7 Juin 2022, Paris.

Communications affichées

Barbe L., Jousse S., Besnard A., Schaeffer J., Wurtzer S., Moulin L., Le Guyader S., Desdouits M. (2022). Optimisation du séquençage du génome complet du SARSCoV- 2 dans les eaux usées par technologie Oxford Nanopore et étude rétrospective de l'émergence du variant Alpha. XXIVèmes Journées Francophones de Virologie. 11 & 12 avril 2022, Strasbourg.

Desdouits M., Polo Montero D., Le Mennec C., Strubbia S., Zheng X.-L., Ettayebi K., Le Pendu J., Atmar R. L., Estes M. K., Le Guyader S. (2022). Etude de la persistance des norovirus infectieux dans l'eau de mer grâce au modèle « entéroïdes ». XXIVèmes Journées Francophones de Virologie. 11 & 12 avril 2022, Strasbourg.

Euller G., Auger A., Breiman A., Jazat J., Le Moullac-Vaidye B., Chirat F., Desdouits M., Le Pendu J., Guerardel Y., Le Guyader S. (2022). Caractérisation des glycanes impliqués dans les interactions entre huître et norovirus. XXIVèmes Journées Francophones de Virologie. 11 & 12 avril 2022, Strasbourg.

Le Mennec C., Gourmelon M., Godino Sanchez A., Schaeffer J., Serghine J., Noel C., Desdouits M., Vitre T., Goragner H., Le Guyader S.(2022). Les phoques : une source de contamination fécale bactérienne et virale du littoral ? SFM 2022 - 17e congrès national de la SFM « La microbiologie dans tous ses états ». 3 au 5 octobre 2022, Montpellier.

Bonny P. Schaeffer J., Besnard A., desdouits M. Essian Ngang J.-J., **Le Guyader S.** :Metagenomic assessment of human and animal RNA viruses in Sanaga clams, Cameroon. IAFP meeting, Pittsburg (USA), 31 juillet-3 août.

Vincent-Hubert F., Veron A., Vaudelin N., Garry P., Piquet J.-C., Rocq, S., Le Guyader S. (2022). Optimization of norovirus detection with passive sampling in river water for metagenomic analysis. ISFEV 2022 - 7th International Society for Food and Environmental Virology. 16-20 May 2022, Santiago de Compostela, Spain.

Vincent-Hubert F., Veron A., Parnaudeau S., Wacrenier C., Gabellec R., Bouget J.-F., Allenou J.-P., Garry P., Piquet J.-C., Rocq S., Le Guyader S. (2022) Détection de norovirus par échantillonnage passif à l'échelle d'un bassin versant en amont de sites ostréicoles SFM 2022 - 17e congrès national de la SFM « La microbiologie dans tous ses états ». 3 au 5 octobre 2022, Montpellier.

Rapports

Delmas L. Chao M.-L., Alunno Bruscia M., Biseau A., Daniel A., Buchet R., **Rocq S.**, Boulben S., Renault T., Riou P., Le Pivert O., Wessel N., Mauffret A., Brun M., Lefebvre A., Devreker D., Robert A., Boye A., Brind'Amour A., Delaunay D., Regimbart A., Foucher E., Gerigny O., Galgani F., Mongruel R., Bas A., Le Gentil E. (2022). DCSMM - DCE. L'appui aux politiques publiques : Cadre d'intervention, enjeux et perspectives. Séminaire DCSMM - DCE. 18 et 19 janvier 2022. Ordre du jour, Compte-rendu et Présentations.

Garry P., Le Guyader S., Desdouits M., Vincent-Hubert F., Piquet J.-C., Wacrenier C., Barbe L., Blanchard Y., Contrant M., Bigault L. (2022). DISCO : Dissémination et Stabilité du SARS-CoV2 dans l'environnement côtier. Rapport final.

Garry P., Ollivier J., Le Mennec C., Parnaudeau S., Wacrenier C. (2022). Rapport d'essai d'aptitude. Recherche des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les coquillages du 21 juin 2022. 22/01_Norovirus/VHA.

Garry P., Kaelin G., Kergaravat C., Parnaudeau S., Schaeffer J., Veron A. (2022). Rapport d'essai d'aptitude. Recherche des Salmonella spp. dans les coquillages vivants du 18 juin 2022. Rapport définitif n° 22/01 Sa-Hu.

Kaelin G., Rocq S. (2022). Plan d'échantillonnage national de la surveillance sanitaire microbiologique des zones de production de coquillages (REMI). Prescription du réseau de surveillance microbiologique des zones de productions (REMI). <https://archimer.ifremer.fr/doc/00762/87377/>

Kaelin G., Rocq S. (2022). Rapport sur le suivi des opérateurs de prélèvements et d'analyses du REMI . Année 2021.

Kaelin G., Piquet J-C., Rocq S. (2022). Rapport sur le suivi des opérateurs de prélèvements et d'analyses du REMI. 3ème et 4ème trimestre de l'année 2020.

Le Fur I., Grizon J., Seugnet J-L., Geairon P., Piquet J-C., **Rocq S.** (2022). Etude sanitaire de la zone de "Château" - Groupe 2 (coquillages bivalves fousseurs). Département de Charente-Maritime. RST/ODE/UL/LERPC 22. 010. <https://doi.org/10.13155/92123>

Le Fur I., Piquet J-C., Grizon J., Geairon P., **Rocq S.** (2022). Etude sanitaire de la zone de "Daire" - Groupe 2 (coquillages bivalves fousseurs). Département de Charente-Maritime. RST/ODE/UL/LERPC 22. 009. <https://doi.org/10.13155/91996>

Le Fur I., Gautier E., Grizon J., Geairon P., Pepin J-F., Bruneau A., Grouhel-Pellouin A., **Piquet J-C., Rocq S.** (2022). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département de Charente-Maritime (17). Edition 2022. RST/ODE/UL/LER.PC22.003. <https://doi.org/10.13155/88087>

Piquet J-C., **Rocq S., Kaelin G.** (2022). Eléments d'aide à la décision pour le déclenchement d'alertes préventives dans le cadre du REMI. Prescription du réseau de surveillance microbiologique des zones de production (REMI) Version 1 (15/03/2022). <https://archimer.ifremer.fr/doc/00755/86740/>

Piquet J-C., **Kaelin G., Rocq S.** (2022). Rapport sur le suivi des opérateurs de prélèvements et d'analyses du REMI. 1er et 2ème trimestre de l'année 2020.

Piquet J-C., **Rocq S., Kaelin G.** (2022). Procédure nationale de la surveillance sanitaire microbiologique des zones de production de coquillages. Prescriptions du réseau de surveillance microbiologique des zones de production (REMI). Version 2 (08/02/2022). <https://doi.org/10.13155/86243>

Rocq S., Boulben S. (2022). Etude sanitaire des zones 29.08.061 « rivière de Bélon aval » et 29.08.062 « rivière de Bélon intermédiaire » - groupes 2 et 3 (coquillages bivalves fousseurs et non fousseurs). RBE/MASAE/LSEM 22-02. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00800/91194/>

Serais O., Gianaroli C., Cimiterra N., Munaron D., Gueguen Y., Gautier E., Grouhel-Pellouin A., **Rocq S.** (2022). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Région Occitanie. Edition 2022. ODE/UL/LER/LR/22.03 - 107p. <https://doi.org/10.13155/88103>

Rapport d'activités

Garry P., Le Guyader S. (2022). Rapport d'activités 2021. Laboratoire Santé Environnement et Microbiologie. Laboratoire National de Référence Microbiologie des coquillages. RBE/MASAE/LSEM 22-01. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00760/87250/>

Expertises / Avis

Avis :

Le Fur I., **Rocq S.**, Piquet J-C., Bruneau A. (2022). Avis de l'Ifremer sur la révision des points REMI et sur l'opportunité de procéder à un classement alternatif de la zone 17.02.01 « Est du Pertuis Breton mytilicole ». DDTM 17 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer de Charente-Maritime, Service des activités maritimes, La Rochelle, Ref. ODE/LITTORAL/LER/PC-22.002 et Expertise Ifremer N° 22-008, 1p., 23p. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00750/86186/>

Le Fur I., Piraud A., Guesdon S., Lemoine M., Neaud-Masson N., **Rocq S.**, **Reynaud Y.**, Bruneau A. (2022). Demande d'avis concernant les points de suivi REMI / REPHYTOX moules de bouchot. Transformation de lieux ponctuels en lieux surfaciques. DDTM 17 - Direction Départementale des Territoires et de la Mer de Charente-Maritime, Service des activités maritimes, La Rochelle, Ref. ODE/LITTORAL/LER/PC-22.006 - Expertise Ifremer N°22-016, 6p. <https://archimer.ifremer.fr/doc/00783/89511/>

Compte rendu d'analyse

Parnaudeau S., Garry P., Le Guyader S., Ollivier J. (2022). Rapport d'essai n°22/008. Recherche des norovirus (NoV) dans les coquillages. DDPP 49 - Direction Départementale de la Protection des Populations du Maine et Loire, Cité administrative 15 B, rue Dupetit-Thouars 49047 Angers Cedex 1, Ref. TIAC 22-049-002, 2p.

Parnaudeau S., Garry P., Le Guyader S., Ollivier J. (2022). Rapport d'essai n°22/010. Recherche des norovirus (NoV) dans les coquillages. DDPP 44 - Direction Départementale de la Protection des Populations de Loire-Atlantique, 10 Boulevard Gaston Doumergue, BP 76315, 44263 NANTES cedex 2, Ref. TIAC 22-044-003 et TIAC 22-044-004, 2 p.

Parnaudeau S., Garry P., Le Guyader S., Ollivier J. (2022). Rapport d'essai n°22/007. Recherche des norovirus (NoV) dans les coquillages. DDPP 16 - Direction Départementale de la Protection des Populations de Charente, 4 rue Raymond Poincaré BP 71016, 16001 Angoulême Cedex, Ref. TIAC 22-016-001, 1 p.

Parnaudeau S., Garry P., Le Guyader S., Ollivier J. (2022). Rapport d'essai n°22/006. Recherche des norovirus (NoV) dans les coquillages. DDPP 44 - Direction Départementale de la Protection des Populations de Loire-Atlantique, 10 Boulevard Gaston Doumergue, BP 76315, 44263 NANTES cedex 2, Ref. TIAC 22-017-005, 1 p.

Parnaudeau S., Garry P., Le Guyader S., Ollivier J. (2022). Rapport d'essai n°22/009. Recherche de virus de l'hépatite A dans les coquillages. MAAF, Direction Général de l'Alimentation, Bureau des Produits de la Mer et d'Eau Douce 251, rue de Vaugirard 75 732 PARIS cedex 15, Ref. TIAC 22-042-004, 2 p.