

Rapport annuel d'activité

2018

**Centre National de Référence
Virus des gastro-entérites**

**Année d'exercice
2017**



RÉSUMÉ ANALYTIQUE

I. LE CNR VIRUS DES GASTRO-ENTÉRITES

Le CNR virus des gastro-entérites (CNRvge) est hébergé au sein du Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon. Le CNRvge y bénéficie d'une autonomie administrative (Unité Fonctionnelle spécifique) mais partage locaux et équipements avec le laboratoire au sein de la Plate-forme de Biologie Hospitalo-Universitaire (PBHU). Le CNRvge a été reconduit en 2017 et son responsable est le docteur Alexis de ROUGEMONT. Quatre biologistes (environ 2 ETP), 5 techniciens (4,3 ETP) et 1 secrétaire participent à l'activité.

II. LES MISSIONS ET LE CONTEXTE

Le CNRvge a des missions d'expertise, de surveillance et d'alerte en lien avec Santé Publique France (SPF) dans le domaine des gastro-entérites virales. En France comme en Europe, les gastro-entérites virales posent surtout un problème de morbidité, mais qui est polymorphe car **i)** deux virus en sont les principaux agents, les rotavirus (pour lesquels nous disposons d'un vaccin) et les norovirus; **ii)** trois groupes de patients sont principalement concernés par ces infections : les enfants pour le rotavirus, les personnes âgées vivant en collectivités (EHPAD surtout) pour les norovirus; et enfin, les immunodéprimés ; **iii)** et ces infections surviennent régulièrement en période hivernale ou bien par épidémies brutales (cas groupés) lors de contaminations alimentaires ou hydriques.

III. LES OBJECTIFS DU CNR ET LES PRINCIPAUX RÉSULTATS EN 2017

Dans ce contexte, le CNRvge a concentré ses actions autour de 3 objectifs principaux : **i)** l'expertise virologique pour la communauté médicale, **ii)** la surveillance des gastro-entérites infantiles à rotavirus et **iii)** les gastro-entérites épidémiques en EHPAD.

i) Activités d'expertise virologique

- **évaluation de deux tests immunochromatographiques et un test de biologie moléculaire de divers fabricants pour la détection des norovirus dans les selles** dont les nouveaux variants recombinants GII.4. Les résultats nous permettent un conseil avisé aux collègues qui nous contactent.
- **investigations virologiques chez 361 patients immunodéprimés.** Nous apportons notre expertise dans le diagnostic et le suivi de ces patients.
- **expertises virologiques de 323 cas sporadiques.** Nous apportons notre aide et notre expertise dans le diagnostic de cas parfois complexes.
- **bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal.** Nous apportons notre expertise aux institutions en charge de la réglementer (ANSM) et aux cliniciens utilisant cette approche thérapeutique (transfert technique et conseils).

ii) Gastro-entérites infantiles à rotavirus

Afin de pouvoir apprécier l'impact de la vaccination sur l'évolution ou l'émergence des génotypes du rotavirus, le CNRvge réalise une surveillance moléculaire continue depuis la saison 2001-2002. Les principaux résultats montrent une variabilité cyclique des génotypes avec l'émergence des souches G9 et G12, et une grande variabilité géographique. **Le point significatif de la saison 2016-2017 est la poursuite de la diffusion du génotype G9P[8] (74,1%) suite à sa réémergence en 2014-2015. Cette situation est comparable à celle de la saison 2004-2005.** Le génotype G1P[8], moins fréquent cette saison (9,0%), reste le premier génotype toutes saisons confondues.

iii) Gastro-entérites épidémiques en EHPA / EHPAD ou cas groupés de gastro-entérites

Le CNRvge, en collaboration avec SPF, les CIRE, les ARS, les EHPAD et les LABM, réalise les investigations virologiques s'intégrant dans la prise en charge épidémiologique globale de ces épidémies.

- la modification majeure de la dernière saison hivernale de surveillance (2016-2017) a été l'émergence **de nouveaux recombinants GII.4 possédant une polymérase de type GII.16 (GII.P16-GII.4(2012)).**
- une étude prospective effectuée sur **huit années consécutives** montre que les épidémies à **norovirus représentent une charge importante pour les des établissements de long séjour** qui nécessiterait d'être évaluée sur le plan médico- économique.

IV. BILAN SCIENTIFIQUE

Les travaux de recherche du CNRvge ont fait l'objet de **11 publications internationales en 2017.**

EXECUTIVE SUMMARY

I. THE NRC FOR GASTROENTERITIS VIRUSES

The NRC for gastroenteritis (NRCgev) virus is located in the Laboratory of Virology at the University Hospital of Dijon. The NRCgev benefits from administrative autonomy (specific Functional Unit) but shares premises and equipment with the laboratory within the Hospital-University Biology Platform. The NRCgev was renewed in 2017 and its head is Alexis de ROUGEMONT, MD PhD. Four biologists (about 2 FTEs), 5 technicians (4.3 FTEs) and 1 secretary are involved in the activity.

II. MISSIONS AND CONTEXT

The NRCgev has expertise, surveillance and alert missions related to Santé Publique France (SPF) in the field of viral gastroenteritis. In France as in Europe, viral gastroenteritis are essentially a problem of morbidity, but it is polymorphic because *i)* two viruses are the main agents, rotavirus (for which there is a vaccine) and norovirus; *ii)* three groups of patients are mainly concerned by these infections: children for rotavirus, elderly people living in communities (especially nursing homes) for noroviruses; and at last, immunocompromised patients; *iii)* and these infections occur frequently during winter time (person-to-person transmission) or food- and waterborne outbreaks (grouped cases).

III. OBJECTIVES AND MAIN RESULTS OF THE NRC IN 2017

In this context, the NRCgev has focused its actions around 3 main objectives: *i)* virological expertise for the medical community, *ii)* surveillance of rotavirus gastroenteritis in children and *iii)* gastroenteritis outbreaks in nursing homes.

i) Virological expertise activities

- **Evaluation of two immunochromatographic tests and one molecular biology test from various manufacturers for the detection of noroviruses in stool samples** including the new recombinant variants GII.4. The outcomes help us to provide useful advice to colleagues who call us.
- **Virological investigations in 361 immunocompromised patients.** We bring our expertise in the diagnosis and follow-up of these patients
- **Virological expertise of 323 sporadic cases.** We bring our help and expertise in the diagnosis of sometimes complex cases.
- **Virological assessment prior to fecal microbiota transplant.** We bring our expertise to regulation institution (ANSM) and clinicians using this therapeutic approach (technical transfer and advice).

ii) Infant rotavirus gastroenteritis

In order to assess the impact of vaccination on the evolution or emergence of new rotavirus genotypes, the NRCgev is monitoring rotavirus infections since the 2001-2002 season. The main results show cyclic change in genotypes with the emergence of G9 and G12 strains, and a great geographical variability. **The significant observation of the 2016-2017 season is the continued spread of the G9P[8] genotype (74.1%) following its re-emergence during the 2014-2015 season. This situation is comparable to that of the 2004-2005 season.** The G1P[8] genotype, less frequent this season (9.0%), remains the first all-season genotype.

iii) Epidemic gastroenteritis in nursing homes or grouped cases of gastroenteritis

The NRCgev, in collaboration with SPF, the CIRE (Cellules d'Intervention en Région), the ARS (Agence Régionale de Santé), nursing homes and private laboratories, carries out virological investigations relevant in the global epidemiological management of these epidemics.

- the last winter surveillance season (2016-2017) showed the emergence of **new GII.4 recombinants homing a GII.16 polymerase (GII.P16-GII.4 (2012))**.
- a prospective study carried out over **eight consecutive years shows that norovirus outbreaks represent a significant burden for nursing homes** which would need to be evaluated on a medico-economic level.

IV. SCIENTIFIC REPORT

The NRCgev research works led to **11 international publications in 2017.**

SOMMAIRE

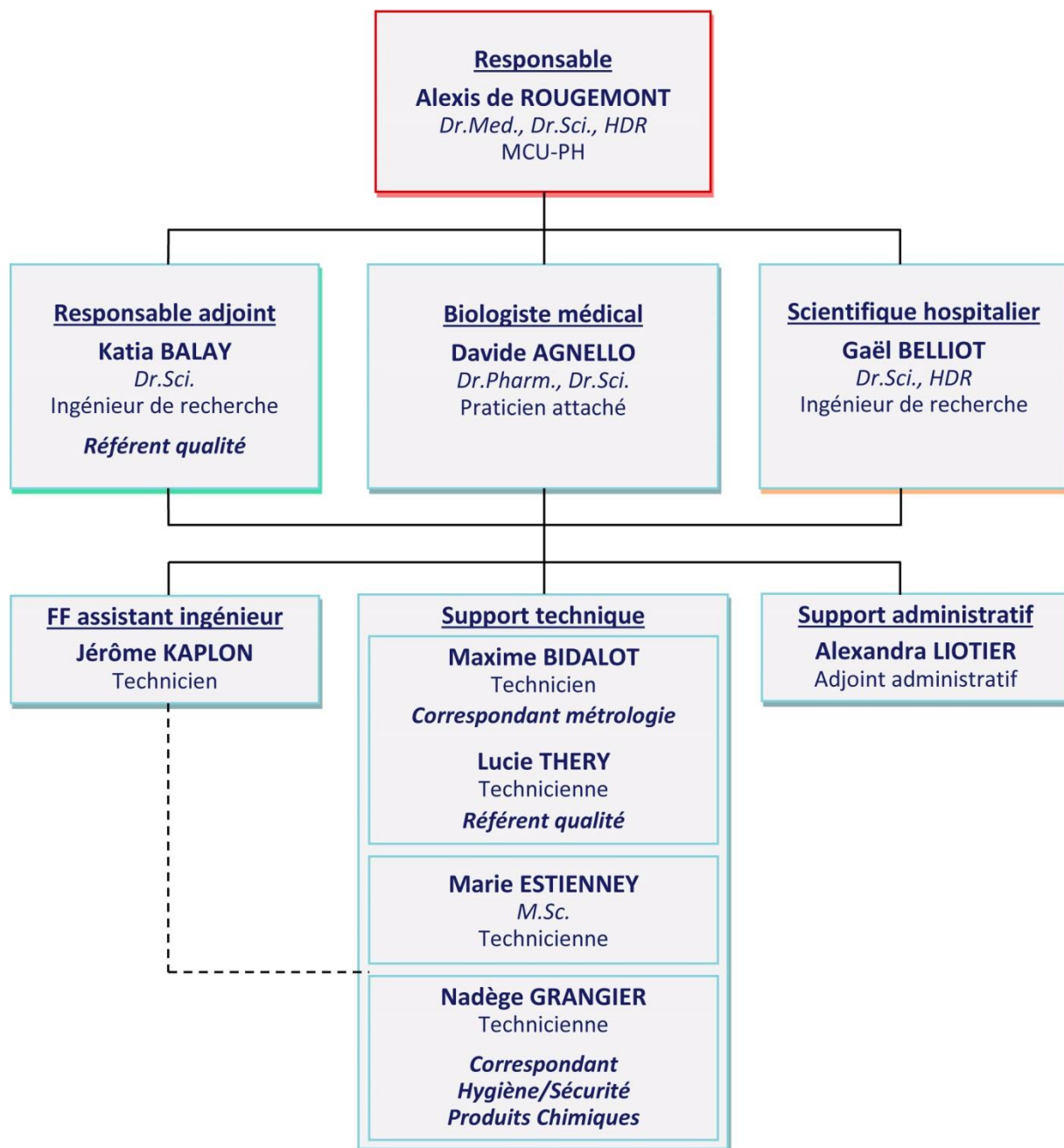
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	1
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	3
2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR	3
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES	3
2.3 TRANSFERT DES TECHNIQUES À D'AUTRES LABORATOIRES	3
2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES	4
2.5 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DU CNR EN 2017	4
2.5.1 Investigations virologiques des épidémies de cas groupés	4
2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal	6
2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques	7
2.5.4 Délai de restitution des résultats	9
2.6 ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE	10
3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE	11
3.1 DESCRIPTION DU RÉSEAU DE PARTENAIRES	11
3.1.1 Réseau de surveillance des cas groupés de gastro-entérites	11
3.1.2 Réseau de surveillance des gastro-entérites à rotavirus	13
3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES INFECTIONS	13
3.2.1 Caractéristiques épidémiologiques des cas groupés	13
3.2.2 Caractéristiques virologiques des épidémies de gastro-entérites à rotavirus en France : bilan de la surveillance de la saison 2016-2017	16
3.3 INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX	23
3.3.1 Réseaux internationaux « NoroNet » et « EuroRotaNet »	23
3.3.2 Réseaux avec les pays Africains	24
3.4 ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE	24
3.4.1 Suivi des établissements long séjour du CHU de Dijon	24
3.4.2 Caractérisation de nouveaux virus dans les selles de patients	24
4. ALERTE	25
4.1 CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE (SPF)	25
4.2 PROCÉDURES D'ALERTE DE SPF ET DES AUTRES PARTENAIRES	25
4.2.1 Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...)	25
4.2.2 Arrivée de prélèvements sans annonce préalable	25
4.3 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	25
4.3.1 Transmission des données à SPF Voozanoo	25
4.3.2 Anonymisation des prélèvements	25
5. ACTIVITÉS DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	27
5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ	27
5.1.1 Site internet « www.cnr-ve.org »	27
5.1.2 Activité de formation	27
5.1.3 Activité de conseil aux professionnels de santé	27
5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES	27

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR	29
6.1 ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU CNR EN COURS 2017	29
6.1.1 Études en cours non publiées	29
6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie (<i>abstracts</i>)	30
6.1.3 Études épidémiologiques en France (<i>abstracts</i>)	31
6.1.4 Investigation d'épidémies d'origine alimentaire ou hydrique (<i>abstracts</i>)	32
6.1.5 Détection des virus entériques dans l'environnement (<i>abstracts</i>)	32
6.1.6 Recherche fondamentale sur les virus entériques (<i>abstracts</i>)	33
6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2017)	33
6.2.1 Publications nationales	33
6.2.2 Publications internationales	34
6.2.3 Communications nationales	34
7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX, INDUSTRIELS	35
7.1. COOPÉRATIONS STRUCTURELLES DANS LE CADRE DES ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE ET D'ALERTE	35
7.2. COOPÉRATIONS DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE	35
7.2.1 Coopérations universitaires	35
7.2.2 Projets	35
7.2.3 Collaboration industrielle avec la société bioMérieux	36
7.2.4 Conclusion sur nos coopérations	36
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR LES ANNÉES SUIVANTES	37
8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	37
8.1.1 Évaluation de trousse de diagnostic	37
8.1.2 Développement de techniques	37
8.1.3 Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections	38
8.1.4 Travaux d'évaluation de techniques	38
8.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires	39
8.1.6 Recherche liées avec les missions du CNR des virus des gastro-entérites	39
8.2. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE	40
8.2.1 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à rotavirus	40
8.2.2 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à norovirus	40
8.3. CONTRIBUTION À L'ALERTE	40
8.4. ACTIVITÉ D'INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL	40
8.4.1 Modalités de diffusion de l'information et des résultats	40
8.4.2 Collaboration/expertises auprès d'instances nationales ou internationales	41
8.4.3 Activité de formation	41

1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR

Les missions et l'organisation du CNR des virus des gastro-entérites sont détaillées dans l'**annexe 1**. Elles ont été définies dans le cahier des charges spécifiques du CNR paru en 2016 pour la période 2017-2021. Aucune modification n'est intervenue à ce niveau en 2017.

Organigramme CNR virus des gastro-entérites (CNRvge)



2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

Éléments clefs de l'activité d'expertise du CNRvge en 2017 :

- délai moyen de rendu des résultats de 2,3 jours
- évaluation de deux tests immunochromatographiques et un test de biologie moléculaire pour la détection des norovirus dans les selles dont les nouveaux variants recombinants GII.4.
- expertises virologiques de 237 épidémies de cas groupés : 170 souches de norovirus dont 88,8% de GII.4 et émergence des GII.P16-GII.4(2012).
- investigations virologiques chez 361 patients immunodéprimés : 23,5% de patients positifs et prépondérance des norovirus (49 souches).
- expertises virologiques de 323 cas sporadiques.
- bilan virologique de 18 selles pour transplantation de microbiote fécal.

2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR

Nous déployons actuellement une technique multiplex maison de PCR en temps réel (RT-qPCR) pour la détection des nouveaux astrovirus des clades MLB (MLB-1 à MLB-3) et VA (VA-1 à VA-5) dans les selles et autres prélèvements.

Nous développons également des techniques de RT-qPCR pour la détection de nouveaux virus impliqués dans les diarrhées virales : les cosavirus et salivirus (*Picornaviridae*) et les bufavirus (*Parvoviridae*).

Nous avons d'autre part développé une technique maison de RT-qPCR pour la détection du virus de l'hépatite A.

Enfin, nous développons progressivement des techniques de séquençage haut-débit (NGS) pour la détection des virus entériques ARN dans les selles à l'aide de la plate-forme Illumina (MiSeq et NextSeq) disponible au CHU. Un technicien faisant fonction d'assistant ingénieur est actuellement en cours de formation en bio-informatique.

Les procédures de référence disponibles pour la détection par qPCR/RT-qPCR (adénovirus, virus Aichi, astrovirus, bocavirus, rotavirus du groupe A, norovirus GI et GII, sapovirus, entérovirus, paréchovirus, hépatite A, hépatite E) et par RT-PCR (CMV et génotypage des rotavirus groupe A) sont détaillées dans l'annexe 2.

2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES

En 2017, à la demande de la société CorisBioConcept, nous avons évalué leur trousse de détection des norovirus dans les selles par immunochromatographie (ICG), en parallèle de la trousse de détection des norovirus par ICG Nadal®Norovirus de chez Nal van Minden, et comparé leurs performances à la technique de RT-qPCR employée en routine au CNR. Cette évaluation a porté sur 150 échantillons de notre collection. Ces résultats n'ont pas donné lieu à publication car la trousse est toujours en cours de développement. Pour rappel, en 2016, nous avons également évalué une autre trousse de détection des norovirus par ICG, Bionexia de chez Biomérieux, qui a donné lieu à une communication sous forme de poster au 27ème ECCMID en avril 2017.

En 2017, nous avons par ailleurs réalisé une petite évaluation de la trousse de détection des norovirus et rotavirus par RT-qPCR, G-DiaNota de chez Diagenode, à la demande de la société, pour connaître les performances de cette trousse vis-à-vis des norovirus de génotype GII.P16-GII.2 et GII.P16-GII.4. Les résultats obtenus étaient très concluants, à savoir une sensibilité de 100% pour ces génotypes.

Ces évaluations de trousse de diagnostic nous permettent de donner des conseils appropriés aux laboratoires de microbiologie publics ou privés souhaitant les utiliser.

2.3 TRANSFERT DES TECHNIQUES À D'AUTRES LABORATOIRES

Des réactifs pour le diagnostic des norovirus et des rotavirus sont désormais largement commercialisés. De ce fait, la demande de transfert de techniques se pose rarement. Pour répondre à la demande des laboratoires français, mais aussi étrangers ou d'Outre-Mer, nous fournissons nos procédures et nous assurons un soutien technique à distance.

Néanmoins, la demande la plus fréquente des laboratoires français, comme étrangers, est **la fourniture de témoins positifs**. Nous disposons à cet effet d'un stock d'échantillons de selle dont le virus est parfaitement caractérisé.

Avec l'objectif de disposer d'un contrôle externe pour les tests immunochromatographiques, nous avons développé une collection d'antigènes synthétiques sous forme de particules virales de synthèse (VLP) dérivées principalement des norovirus humains dont nous possédons un large panel. Ces VLP correspondent en autres aux principaux génotypes circulant en France, dont les derniers variants (**annexe 2**).

2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES

Nos collections de selles sont référencées au Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand-Cabanne du CHU de Dijon dans la section « microbiologie » en 4 collections distinctes : « rotavirus », « norovirus », « autres virus » et « selles négatives ». Une filière spécifique a été mise en place pour le traitement et l'archivage des selles au CRB.

Nos prélèvements, souches caractérisées, VLP et anticorps sont disponibles à tous les laboratoires publics qui en font la demande dans un but d'évaluation de leurs techniques de diagnostic. La mise à disposition de ces matériels biologiques viraux à des sociétés privées est possible dans le cadre d'un contrat entre ces sociétés et notre établissement.

2.5 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DU CNR EN 2017

2.5.1 Investigations virologiques des épidémies de cas groupés

1/ Données épidémiologiques

Dans la quasi-totalité des épidémies, l'alerte a été effectuée directement ou indirectement via SPF, les CIRE ou les délégations territoriales des ARS concernées. Les prélèvements ont été transmis par des laboratoires publics ou privés, ou directement par l'établissement concerné par l'épidémie. L'acheminement a été effectué par voie postale dans la plupart des cas ou, lorsque le nombre de prélèvements le justifiait, par un transporteur agréé (p. ex. la société TSE à Lyon).

En 2017, nous avons expertisé 237 épidémies dont 179 étaient positives pour un virus entérique **soit 75,5%** (pour 89,9% d'entre elles, un norovirus était retrouvé seul ou associé à un autre virus) (**Tableau 2**). Si on analyse **les 58 épidémies « négatives » (24,5%)**, on constate que pour 22 (37,9%) d'entre elles nous n'avions qu'un seul prélèvement. Or, l'observation des données montre qu'en disposant de **3 à 4 prélèvements par épidémie nous pouvions prouver l'étiologie d'une épidémie quand elle est virale (Tableau 3).**

Entre 2012 et 2016, Nous avons expertisé 1457 épidémies et détecté un virus pour 1218 d'entre elles soit 83,6%. Nous avons retrouvé un norovirus seul ou associé à d'autres virus pour 90,3% de ces épidémies positives.

Au total en 2017, 803 échantillons ont été analysés, soit une moyenne de $3,4 \pm 2,2$ échantillons et une médiane de 3 échantillons par épidémie :

- **179 épidémies « positives » comprenant :**
 - **637 prélèvements analysés**, soit une moyenne de $3,6 \pm 2,0$ échantillons et une médiane de 2 échantillons analysés / épidémie,
 - **446 prélèvements positifs**, soit une moyenne de $2,5 \pm 1,5$ positifs et une médiane de 2 positifs / épidémie,
- **58 épidémies « négatives » comprenant 166 prélèvements analysés**, soit une moyenne de $2,9 \pm 2,7$ échantillons et une médiane de 2 échantillons analysés / épidémie.
- **rapport (échantillons positifs / analysés)**
 - 55,5% des échantillons analysés contenaient au moins un virus,
 - 70,0% des échantillons analysés issus des épidémies « positives » contenaient au moins un virus.

Tableau 2 : Tableau annuel comparatif des prélèvements analysés entre 2012 et 2017

épidémies		infections	virus								étiologie inconnue
			NoV	SaV	RVA	AdV	AstV	AiV	EV	autres	
2012	338	mono : 266 mixtes : 13	237 13	5 4	20 6	4 4	0 2	0 2	0 1		59 (17,5%)
2013	304	mono : 254 mixtes : 12	232 7	3 8	9 2	7 5	3 4	0 3	0 1		38 (12,5%)
2014	242	mono : 174 mixtes : 11	156 11	5 6	6 7	3 5	3 2	0 1	1 0		57 (23,6%)
2015	225	mono : 179 mixtes : 19	152 19	6 7	15 6	2 3	1 3	2 5	1 1		27 (11,8%)
2016	348	mono : 267 mixtes : 23	254 19	1 8	6 9	3 7	2 2	0 2	0 2	1*	58 (16,9%)
2017	237	mono : 173 mixtes : 6	155 6	3 3	12 3	2 0	1 1	0 0	0 0		58 (24,5%)

NoV : norovirus ; SaV : sapovirus ; RVA : rotavirus ; AdV : adénovirus ; AstV : astrovirus ; AiV : virus Aichi ; EV : entérovirus ; *Bocavirus

Pour 90 des 179 épidémies « positives », le nombre de prélèvements positifs correspondait exactement au nombre de prélèvements reçus au laboratoire du CNR. Cette proportion est globalement proche de celle observée les deux années précédentes avec 50,3% d'adéquation contre 47,2% (2016) et 52,5% (2015) mais plus faible que la moyenne de l'ensemble de la période 2012-2016 (55,5%).

En 2017, nous avons expertisé **237 épidémies dont 179 étaient positives** pour un virus entérique soit **75,5%** (pour 89,9% d'entre elles, un norovirus était retrouvé seul ou associé à un autre virus). Si on analyse **les 58 épidémies « négatives » (24,5%)**, on constate que pour 22 (37,9%) d'entre elles nous n'avions qu'un seul prélèvement.

Tableau 3 : Distribution des épidémies selon le nombre de prélèvements analysés et le nombre de prélèvements positifs

2017		Nombre de prélèvements analysés											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	14	17	Total
Nombre de prélèvements positifs	0	22	12	10	4	3	3	1	1	1		1	58
	1	25	9	8	7	3	1	2					55
	2		22	11	6	7	1						47
	3			26	8	2	4	1		1			42
	4				8	8	2						18
	5					3	1		3				7
	6						5	1	1				7
	7									1	1		2
	8								1				1
Total		47	43	55	33	26	17	5	6	3	1	1	237

2/ Principales souches virales caractérisées

Les norovirus (Tableau 4)

- **170 souches de norovirus ont été caractérisées en 2017 dans 161 épidémies dont :**
 - 19 souches de NoV-GI, soit 11,2%
 - **161 souches de NoV-GII, soit 88,8%**
- **le génotype GII.4 représentait 55,3% des NoV avec 94 souches** dont :
 - **50 souches GII.P16-GII.4(2012)**, nouveau NoV recombinant prédominant apparu fin 2016,
 - 24 souches GII.P4(2009)-GI.4(2012),
 - 13 souches GII.4(2012).
- **le génotype GII.17 représentait 14,6% des NoV avec 22 souches.** Il s'agit du variant GII.17 Kawasaki-308 qui avait émergé en Europe en 2016 et était devenu temporairement le génotype de norovirus principal en France.
- **les autres génotypes** GII.2, GII.6 et GII.7 circulent régulièrement et peuvent être relativement fréquents selon les saisons. Ce fut le cas en 2012 (environ 10% des souches de norovirus caractérisées) et en 2014 (13,4%) mais ils furent rares en 2016. Fin 2016 a vu apparaître le recombinant GII.P16-GII.2 concomitamment avec le GII.P16-GII.4.
- sur la période 2012-2016, nous avons caractérisé 1206 souches de norovirus dans 1100 épidémies. Pour comparaison, les NoV-GII représentaient 87,8% des norovirus caractérisés durant cette période, ce qui est encore la fréquence observée pour 2017.

Les autres virus détectés en 2017 :

- **rotavirus : 14 souches ont été caractérisées dans 15 épidémies** (2 n'étaient pas typables). Le principal génotypes retrouvé était **G9P[8]** suivi du génotype G2P[4] et G4P[8],
- **sapovirus : 6 souches SaV-GI.2**, le génotype le plus fréquent avec le GII.1,
- **adénovirus : 1 souche AdV de type 4** mais aucune souche entérique (types 40 et 41),
- **astrovirus : 1 souche AstV de type 1**, le génotype le plus fréquent.

3/ Conclusions sur les virus entériques caractérisés

Les norovirus représentent la majorité (89,9%) des virus isolés à partir des selles analysées dans le cadre d'une investigation de cas groupés de gastro-entérites. Il s'agit essentiellement de **norovirus du génogroupe II (88,8% des norovirus détectés)**.

Les variants du génotype GII.4 étaient prédominants et se succédaient selon un cycle de 2 à 3 années. En 2017, le variant recombinant GII.P16-GII.4(2012) qui a émergé en 2016 en France est devenu le génotype majeur avec 19,4% des souches de norovirus caractérisées, suivi par le génotype GII.17 avec 12,9%. Ce génotype GII.17 variant Kawasaki-308 qui avait émergé au cours de l'hiver 2015-2016 avec presque 45% des souches de norovirus caractérisées est donc devenu minoritaire.

L'hiver 2016-2017 a donc été marqué par l'apparition du **recombinant GII.P16-GII.4(2012)**..

2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal

Nous participons depuis 2014 à divers programmes de recherche sur le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) par transplantation de microbiote fécal (TMF), notamment avec l'équipe du Pr. Harry SOKOL de l'APHP.

En 2017, nous avons analysés 18 échantillons de selles pour les CHU d'Amiens, Angers, Brest, Clermont-Ferrand, Nantes et Saint-Etienne dans le cadre de TMF. Notre expérience a été mise à disposition des autres laboratoires afin de favoriser l'accès à cette nouvelle thérapeutique.

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des souches de norovirus caractérisées entre 2012 et 2017.

		2012			2013			2014			2015			2016			2017		
Norovirus		GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%
Génogroupe I (GI)	GI non typable	9		3,5%	5		1,9%	14		7,2%	4		2,1%	1		0,3%	5		2,9%
	GI.1							1		0,5%				5		1,7%	1		0,6%
	GI.2							6		3,1%	5		2,6%	2		0,7%	3		1,8%
	GI.3	7		2,7%	9		3,4%	8		4,1%	8		4,1%	5		1,7%	5		2,9%
	GI.4	5		1,9%	4		1,5%	2		1,0%	2		1,0%	4		1,3%	2		1,2%
	GI.5										3		1,6%	4		1,3%			
	GI.6	9		3,4%	10		3,8%	2		1,0%	5		2,6%	1		0,3%	1		0,6%
	GI.Pb-GI.6																1		0,6%
	GI.7	3		1,2%													1		0,6%
	GI.8				1		0,4%	1		0,5%									
	GI.9				2		0,8%												
Génogroupe II (GII)	GII non typable		8	3,1%		10	3,9%		10	5,2%		5	2,6%		14	4,7%		13	7,6%
	GII.1		10	3,9%		3	1,2%		8	4,1%		17	8,9%		3	1,0%			
	GII.2		2	0,8%		6	2,3%		8	4,1%		16	8,2%		9	3,0%		6	3,5%
	GII.P16-GII.2														9	3,0%		12	7,1%
	GII.3		3	1,2%					2	1,0%					5	1,7%			
	GII.P21-GII.3		1	0,4%		3	1,1%		2	1,0%		2	1,0%		1	0,3%			
	GII.4(1987)														1	0,3%		1	0,6%
	GII.4(2006a)																	1	0,6%
	GII.4(2009)		91	35,0%		3	1,1%		4	2,1%									
	GII.4(2009/2012)					32	12,2%		25	12,9%		47	24,4%		31	10,4%		24	14,1%
	GII.4(2012)		88	33,8%		152	58,0%		70	36,1%		47	24,4%		37	12,5%		13	7,6%
	GII.Pe-GII.4(2012)											2	1,0%		4	1,3%		3	1,8%
	GII.P16-GII.4(2012)														14	4,7%		50	19,4%
	GII.P16-GII.4(2016)																	2	1,2%
	GII.5					1	0,4%												
	GII.P22-GII.5					1	0,4%												
	GII.6		9	3,5%		12	4,6%		26	13,4%		3	1,6%		5	1,7%		2	1,2%
	GII.P7-GII.6		6	2,3%		1	0,4%		1	0,5%									
	GII.7		8	3,1%		2	0,8%								1	0,3%		2	1,2%
	GII.8					1	0,4%												
	GII.12											1	0,5%						
	GII.13		1	0,4%								1	0,5%		1	0,3%			
	GII.P21-GII.13											1	0,5%		1	0,3%			
	GII.14					3	1,1%					1	0,5%		1	0,3%			
	GII.16														1	0,3%			
	GII.17					1	0,4%		3	1,5%		22	11,4%		133	44,8%		22	12,9%
	GII.21								1	0,5%					1	0,3%			
	GII.22														2	0,7%			
	GIV.1											1	0,5%						
total		33	227		31	231		34	160		27	160		22	275		19	151	
%		13%	87%		12%	88%		18%	82%		14%	86%		7,4%	92,6%		11,2%	88,8%	

2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques

Au cours de l'année 2017, le CNR a procédé à l'analyse de 1078 prélèvements de selles issus de cas de diarrhées sporadiques.

1/ Surveillance de patients immunodéprimés (Figure 1)

Nous avons reçu **361 selles représentant le suivi de 279 patients**. Nous n'avons reçu qu'un seul prélèvement pour 226 patients et 2 à 6 prélèvements pour 56 patients. Au total, **85 (23,5%) selles** chez 65 (23,3%) patients **étaient positives** pour 1 virus (57 patients) ou 2 virus (8 patients). Par ordre de fréquence : **norovirus (38 patients)**, sapovirus (8 patients), adénovirus tout type (11 patients), rotavirus (chez 17 patients), bocavirus (5 patients), aichi virus (2 patients), entérovirus (2 patients).

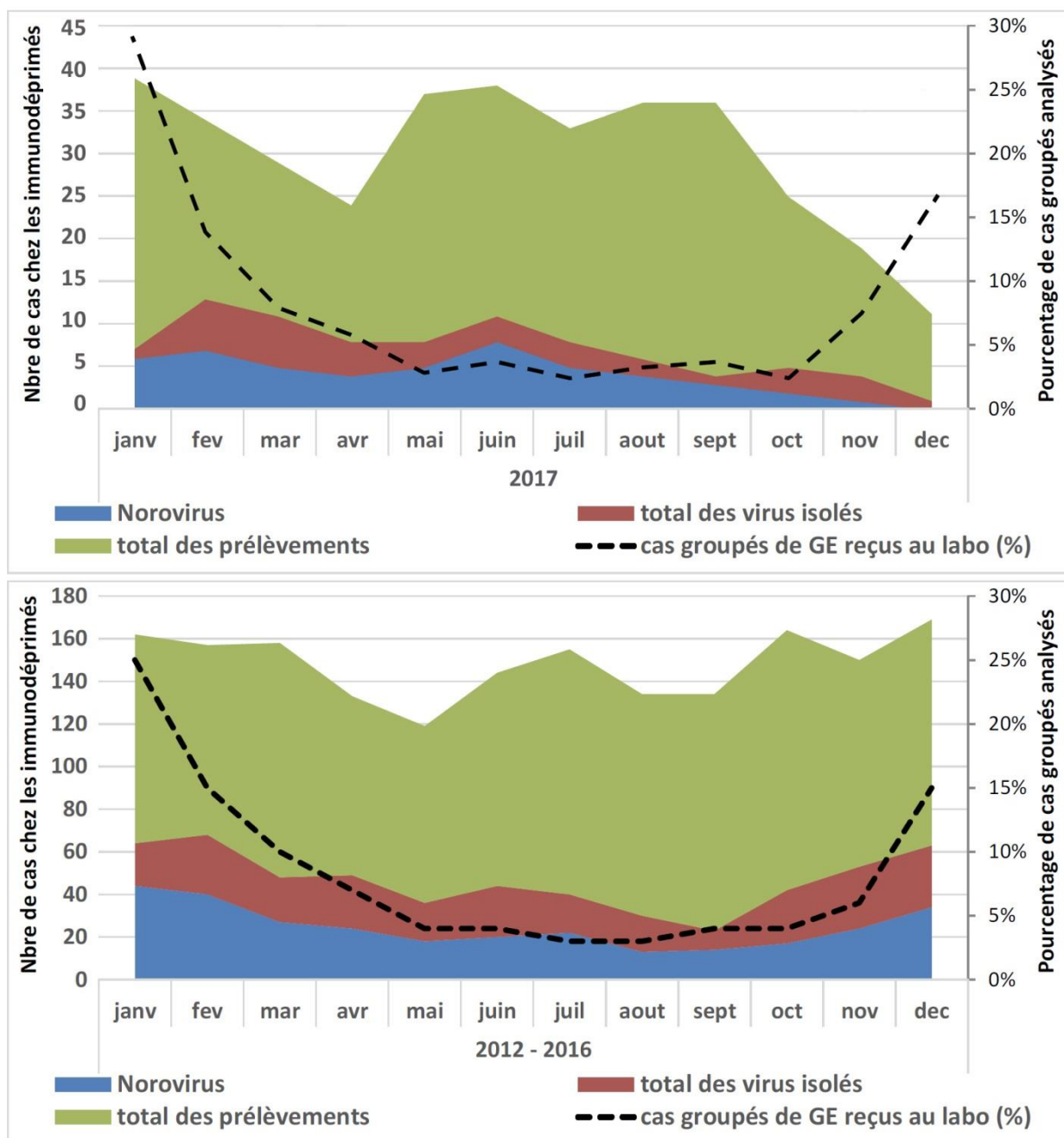


Figure 1 : Répartition saisonnière des virus isolés des selles diarrhéiques des patients immunodéprimés (1 prélèvement/patient) (a) 361 patients entre janvier 2017 et décembre 2017 ; (b) 1779 patients entre janvier 2012 et décembre 2016.

Les principales souches virales caractérisées chez ces sujets immunodéprimés correspondaient à 94 souches de virus :

- **norovirus : 49 souches (Tableau 5)**
 - 3 souches de NoV-GI
 - **46 souches de NoV-GII**, soit 93,9% des norovirus détectés **dont 26 variants GII.4 (56,5%)** comprenant les nouveaux recombinants GII.P16-GII.4(2012) et GII.P16-GII.4(2016)
- **adénovirus : 13 souches non entériques** (groupe C essentiellement [types 2 et 3])
- **rotavirus : 12 souches** dont une majorité de G9P[8]
- **sapovirus : 9 souches** dont des souches de GI.1, GI.2, GII.1 et GII.3
- **bocavirus : 5 souches**
- **aichi virus : 4 souches** dont 1 de génotype A et 3 de génotype B

Tableau 5. *Détail des typages des norovirus détectés chez des immunodéprimés en 2017*

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI non typés	2	GI.2	1
Génogroupe II	GII non typé	10	GII.4(2006a)	1
	GII.Pg-GII.1	1	GII.4(2006b)	4
	GII.2	3	GII.4(2009/2012)	3
	GII.3	1	GII.Pe-GII.4(2009/2012)	6
	GII.P21-GII.3	1	GII.4(2012)	2
	GII.6	1	GII.P16-GII.4(2012)	8
	GII.17	3	GII.P16-GII.4(2016)	2

2/ Diagnostic de cas sporadiques de diarrhées aiguës

En 2017, nous avons analysés les selles de 323 patients souffrant de diarrhée aiguë et provenant de CHR, CHU ou LABM de toute la France. La moyenne d'âge était à 33 ans et la médiane à 14 ans [3 jours ; 98 ans]. En tout 52 patients étaient positifs pour au moins 1 virus entérique dont 9 patients présentaient de 2 à 6 virus dans les selles. En tout, ont été détectés 42 norovirus (**Tableau 6**), 34 rotavirus (dont 18 G9P[8]), 28 adénovirus (dont 5 AdV entériques de type 41), 10 entérovirus, 8 paréchovirus, 7 sapovirus et 4 bocavirus mais aucun astrovirus.

Tableau 6. *Détail des typages des norovirus détectés dans les cas sporadiques en 2017*

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI non typés	1	GI.2 GI.Pb-GI.6	1 1
Génogroupe II	GII non typés	18	GII.4(2009/2012)	9
	GII.2	1	GII.4(2012)	1
	GII.P21-GII.3	1	GII.Pe-GII.4(2012)	2
	GII.17	2	GII.P16-GII.4(2012)	2
			GII.P16-GII.4(2016)	4

2.5.4 Délai de restitution des résultats

Afin de répondre au mieux au besoin d'un résultat diagnostique rapide pour le traitement des épidémies groupées et des cas sporadiques, le CNR s'est organisé afin de réduire au maximum les délais de restitution des résultats d'analyse. La recherche des norovirus GI et GII dans les selles, analyse accréditée COFRAC, est l'analyse principale qui sert de baromètre pour l'évaluation des délais de restitution.

L'analyse « norovirus GI/GII » est majoritairement réalisée dans un délai inférieur à 7 jours avec un pic à 1 et 2 jours, et une moyenne de 2,3 jours (Figure 2).

Un allongement du délai de restitution peut être dû :

- à un rajout de l'analyse en 2ème intention (concerne 4 prélèvements)
- à un traitement en 2 temps (concerne 5 prélèvements).
- à une inhibition sur une autre analyse qui nécessite de répéter l'analyses (6 prélèvements)
- à un jour férié qui décale la mise en œuvre des autres analyses (1 prélèvement)
- à une analyse d'un autre virus fait tardivement (5 prélèvements)
- à un retard non justifié (1 prélèvement)

Au final, 13 analyses norovirus ont été rendues en retard en 2017, soit 1,07% du total des analyses effectuées au CNR.

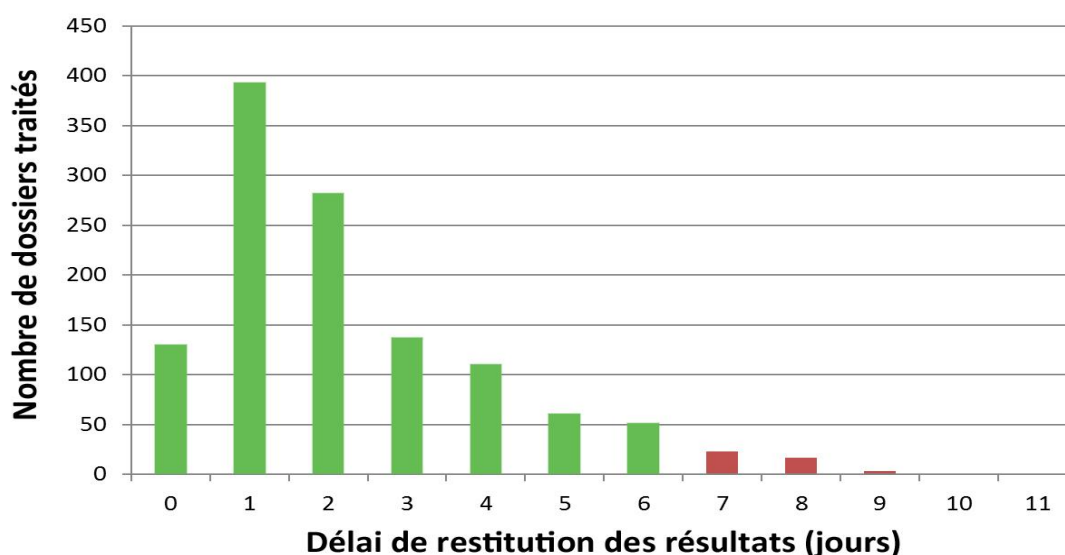


Figure 2 : Délai de restitution des résultats d'analyse de norovirus dans les selles en 2017

2.6 ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE

Le CNR a accès à une plate-forme de séquençage haut-débit comportant actuellement un séquenceur Illumina® MySeq® hébergé sur la Plate-forme de Biologie Hospitalo-Universitaire (PBHU) du CHU de Dijon. Un séquenceur NextSeq® viendra compléter la plate-forme au cours de l'année 2018.

Bien qu'un recours à un bio-informaticien soit possible, le CNR a décidé de former un de ces techniciens faisant fonction d'assistant ingénieur à la bio-informatique pour le traitement des données. Les données seront traitées via le logiciel Galaxy puis à l'aide du logiciel de métagénomique BioNumerics que nous alimentons en continu depuis plusieurs années au sein du CNR. La mise en place des activités de séquençage NGS sur prélèvements de selles est un long processus qui permettra au CNR de répondre à la demande de détection du « virome intestinal » humain. Cette détection sera volontairement limitée à la détection des virus ARN majoritairement responsables des gastro-entérites chez l'homme. De nombreuses interférences existent avec notamment les ARN génomiques de l'hôte mais surtout les ARN ribosomaux des microbiote et mycobiote intestinaux. Le CNR est actuellement en capacité d'effectuer des analyses de type NGS pour les norovirus et les rotavirus dans les selles mais elles ne sont pas encore disponibles pour l'investigation d'épidémies.

3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

Éléments clefs de l'activité de surveillance du CNRVge en 2017 :

- surveillance du réseau national rotavirus :
 - participation de 18 CHU/CHG (extension de la surveillance vers le sud et l'ouest)
 - analyses de 843 prélèvements de selles : poursuite de la diffusion du génotype G9P[8] (74,1%) suite à sa réémergence en 2014-2015.
- surveillance des épidémies dans les EHPAD
 - analyses de 236 épidémies : survenue de novembre à mars/avril
 - transmission le plus fréquemment de personne-à-personne

3.1 DESCRIPTION DES RÉSEAUX PARTENAIRES

3.1.1 Réseau de surveillance des cas groupés de gastro-entérites

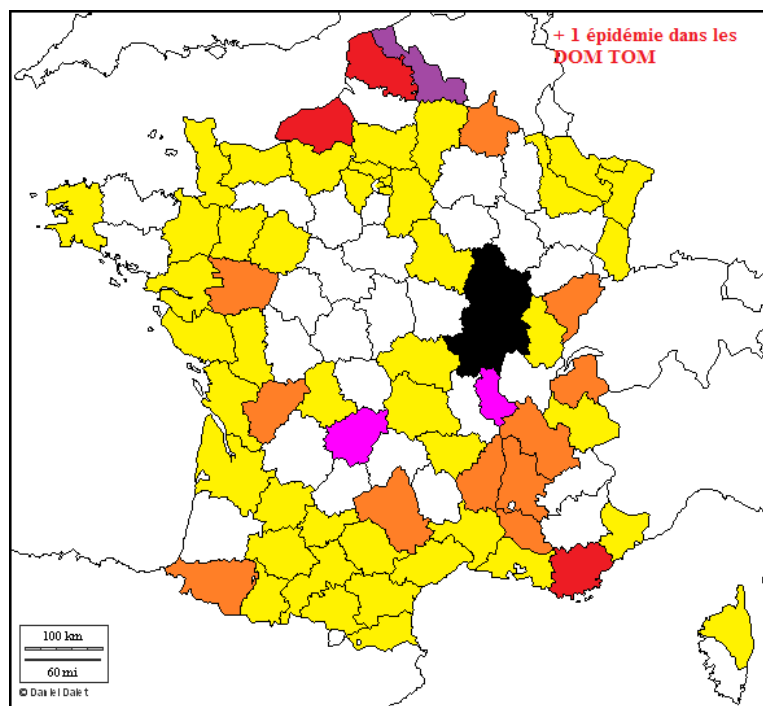
1/ Réseaux de surveillance

- **Santé Publique France (SPF)** et les **CIRE**, les **Délégations territoriales des ARS** et d'autre part les **services hospitaliers**, les **CLIN** ou les **services d'hygiène des établissements de soins**.

Les **Délégations territoriales des ARS** ou les **CIRE** notifient les épidémies et déclenchent l'alerte et l'investigation virologique. Plus rarement, l'alerte nous est donnée par un service hospitalier, le **CLIN** ou le service d'hygiène d'un établissement de soins. Toutes les données nous parvenant sont immédiatement transmises à **SPF** pour la coordination des investigations épidémiologiques et virologiques. **SPF et les CIRE** réalisent les investigations épidémiologiques.

- **Réseau Sentinelles** : nos interlocuteurs en 2017 étaient Thomas GORONFLOT et Lucie FOURNIER.
- **Les autres laboratoires de référence** :
 - **IFREMER** – Centre de Nantes (Dr. Françoise LE GUYADER) : laboratoire de référence pour les virus entériques dans les **produits de la mer**. Ce laboratoire fait partie du même réseau européen que le nôtre (NoroNet). Nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).
 - **ANSES – Unité de virologie des Aliments et de l'eau**, Maisons-Alfort (Dr. Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour **l'eau et les aliments**. Nous collaborons avec ce laboratoire pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).
 - **ANSES – Laboratoire d'Hydrologie de Nancy**, 40, Rue Lionnois F-54000 NANCY (Dr Benoît GASSILLOUD).
 - **Centre National de Référence Virus des hépatites à transmission entériques (Hépatites A et E)**. AP-HP - Paris Paul Brousse (Pr. Anna- Maria ROQUE-AFONSO) et CHU de Toulouse (Pr. Jacques IZOPET). Nous collaborons étroitement avec ces CNR, notamment pour les épidémies d'origine hydrique ou alimentaire.
- **Centre National de Référence Entérovirus et Paréchovirus**, Hospices Civils de Lyon (Pr. Bruno LINA) et CHU de Clermont-Ferrand (Pr. Cécile HENQUELL). Nous collaborons étroitement avec les CNR : nous assurons la détection dans les selles, en cas de positivité le virus ou le prélèvement est adressé au CNR des entérovirus et paréchovirus pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique.

2/ Provenance des échantillons

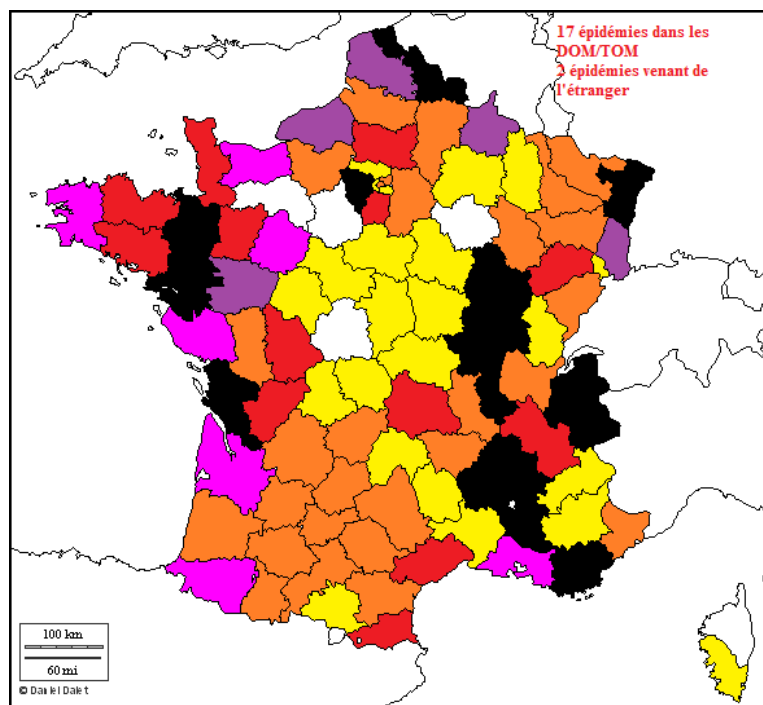


Répartition géographique des épidémies reçues au CNR des virus entériques :

Répartition géographique des épidémies reçues au CNR Virus des Gastro-entérites en 2017

CODE COULEUR :

	aucune épidémie
	1 à 3 épidémies
	4 à 6 épidémies
	7 à 9 épidémies
	10 à 12 épidémies
	13 à 15 épidémies
	+ de 15 épidémies



Répartition géographique des épidémies reçues au CNR des virus entériques :

Répartition géographique des épidémies reçues de 2012 à 2016

CODE COULEUR :

	aucune épidémie
	1 à 6 épidémies
	7 à 12 épidémies
	13 à 18 épidémies
	19 à 24 épidémies
	25 à 31 épidémies
	+ de 32 épidémies

Figure 3 : Répartition géographique des épidémies reçues. (a) bilan de l'activité du CNR en 2017 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2016. La plupart des départements nous ont envoyé des prélèvements au moins une fois depuis 2012.

3.1.2 Réseau de surveillance des gastro-entérites à rotavirus

Une surveillance moléculaire des souches de rotavirus en milieu pédiatrique avait été mise en place en prévision de la prochaine disponibilité de vaccins anti-rotavirus. Depuis 2004 et surtout l'hiver 2006 nous avons développé un réseau de surveillance épidémiologique et moléculaire des rotavirus comprenant 11 CHU de province, 3 établissements de l'Assistance Publique de Paris (hôpitaux de Saint Vincent de Paul-Necker, Robert Debré et Trousseau) et 2 CHR (Charleville-Mézières et Orléans). En 2017, le CHU de Toulouse et le CHR de Cahors ont rejoint le réseau rotavirus. Ce réseau national est connecté à un plus large réseau européen, le réseau **EuroRotaNet** (Figure 4).

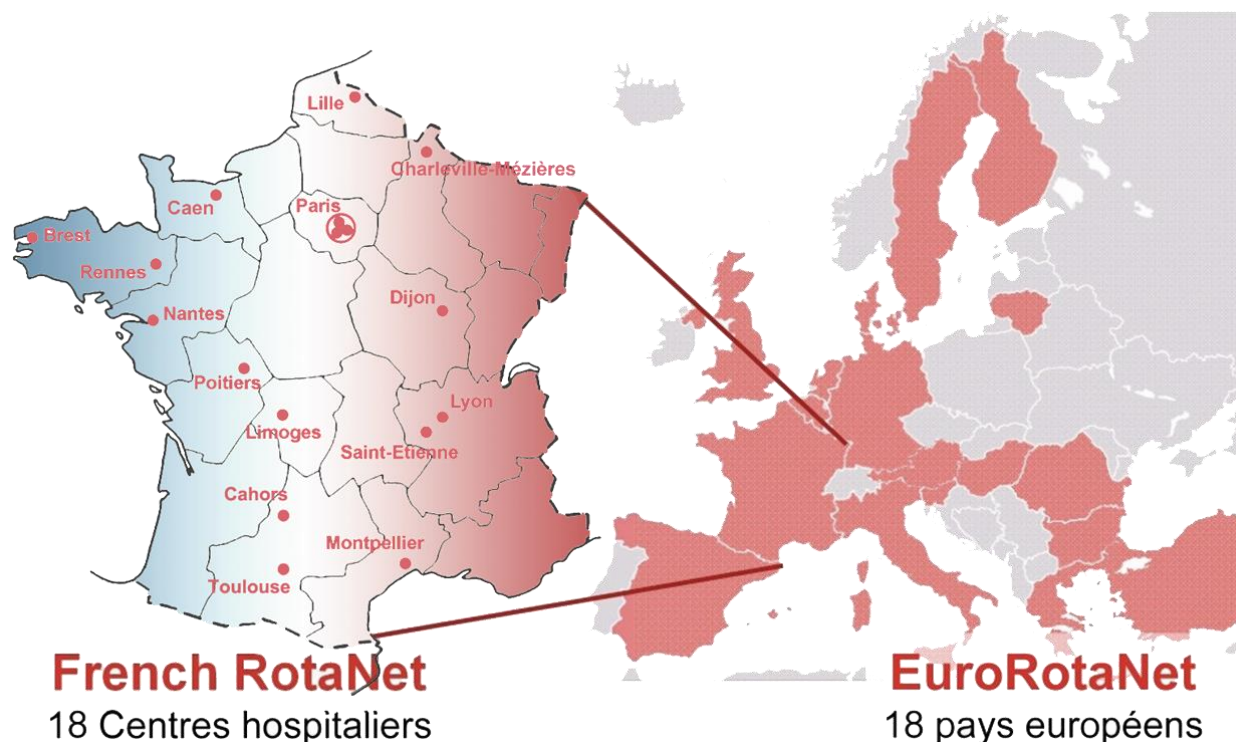


Figure 4 : Répartition des centres participant au réseau national rotavirus en 2017.

Participation des CHU/CHRU de Brest, Caen, Dijon, Lille, Limoges, Lyon, Montpellier, Nantes, Paris (Necker-Enfants Malades, Robert-Debré, Armand-Trousseau), Poitiers, Rennes, Saint-Etienne, Toulouse et des CH de Cahors, Charleville-Mézières, Lille (GHICL).

3.2 SURVEILLANCE DE L'ÉVOLUTION ET DES CARACTÉRISTIQUES DES INFECTIONS

3.2.1 Caractéristiques épidémiologiques des cas groupés

1/ Aspect saisonnier des épidémies

La saisonnalité hivernale est très marquée pour les épidémies survenant en EHPAD et hôpitaux, au contraire de celles survenant dans les centres pour adultes ou lors de réceptions (**Figure 5**). On retrouve cette même différence si l'on compare les épidémies transmises de personne-à-personne (hivernales) de celle transmises par les aliments ou l'eau (toute l'année).

En 2017, 75,1% des épidémies analysées au CNR sont survenues entre novembre et mars (environ 70% entre 2012 et 2016). Cette forte saisonnalité hivernale concerne les épidémies survenant en établissements de soins (80,0%), mais pas celles survenant en collectivités ou dans les restaurants (43,8%). Cette différence était plus marquée en 2017 que pour les années précédentes 2012-2016 (environ 75,0% et 50,0%, respectivement). Cette observation est comparable aux différences de saisonnalité entre les épidémies transmises de personne-à-personne et celles d'origine alimentaire ou hydriques.

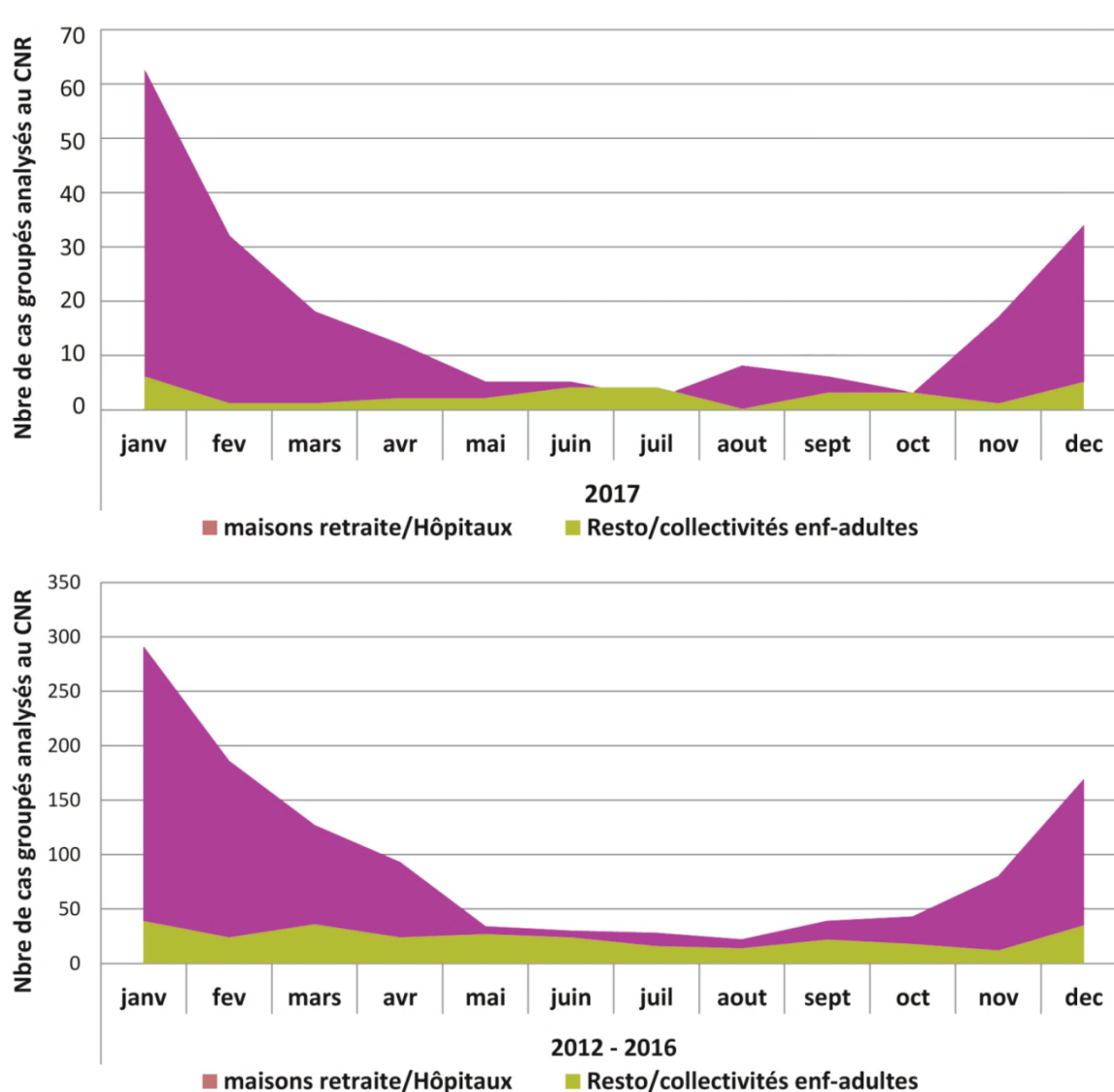


Figure 5 : Répartition temporelle des cas groupés pris en charge par le CNR en fonction de l'origine de l'épidémie. (a) bilan de l'activité du CNR en 2017 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2016.

2/ Sites et modes de transmission

Qu'il s'agisse du mode de transmission ou du site de l'épidémie, la répartition observée en 2017 est globalement similaire à l'ensemble de la période 2012-2016 (Tableau 7).

Tableau 7 : Répartition des épidémies selon le site et le mode de contamination.

sites/transmissions		pers-à-pers	inconnu	aliments	hydrique	Total
2017	EHPAD	124 (52,5%)	46 (19,5%)	9 (3,8%)	1 (0,4%)	180 (76,3%)
	hôpitaux	12 (5,1%)	11 (4,7%)	2 (0,8%)	0 -	25 (10,6%)
	réception	2 (0,8%)	1 (0,4%)	18 (7,6%)	0 -	21 (8,9%)
	centre enfants	2 (0,8%)	0 -	0 (0,0%)	0 -	2 (0,8%)
	centre adultes	2 (0,8%)	1 (0,4%)	5 (2,1%)	0 -	8 (3,4%)
	Total	142 (60,2%)	59 (25,0%)	34 (14,4%)	1 (0,4%)	236
2012-2016	EHPAD	619 (43,1%)	299 (20,8%)	50 (3,5%)	6 (0,4%)	974 (67,8%)
	hôpitaux	91 (6,3%)	63 (4,8%)	14 (1,0%)	0 -	168 (11,7%)
	réception	8 (0,6%)	6 (0,4%)	134 (9,3%)	0 -	148 (10,3%)
	centres enfants	36 (2,5%)	16 (1,1%)	41 (2,9%)	6 (0,4%)	99 (6,9%)
	centres adultes	11 (0,8%)	12 (0,8%)	24 (1,7%)	0 -	47 (3,3%)
	Total	765 (53,3%)	396 (27,6%)	263 (18,3%)	12 (0,8%)	1436

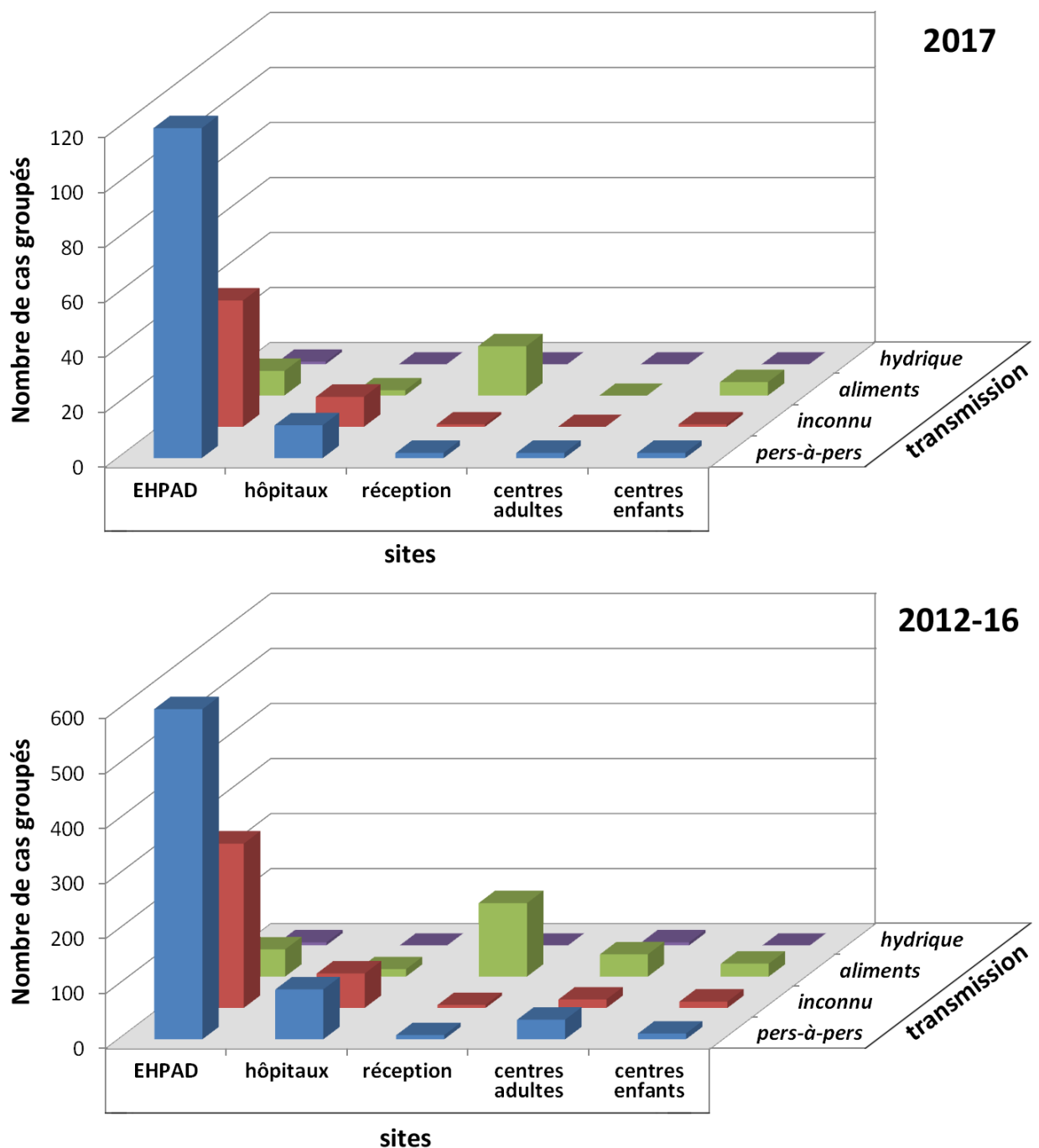


Figure 6 : Relation entre type d'établissement et le mode de transmission.
 (a) bilan de l'activité du CNR en 2017 et (b) bilan de l'activité entre 2012 et 2016.

– **Site ou établissement :**

En 2017, la majorité des 236 épidémies est survenue dans des EHPAD : 180 soit 76,3%. Les autres sites concernés ont été essentiellement des services hospitaliers (25 ; 10,6%) ou des réceptions/banquets (21 ; 8,9%). Globalement, ces résultats sont comparables à ceux constatés au cours de la période 2012-2016 avec, proportionnellement et de manière non significative, une légère augmentation du nombre de cas observés dans les EHPAD (+8,5 points) et une baisse du nombre de cas observés dans les centres pour enfants (-6,1 points).

– **Mode de transmission :**

En 2017, le mode de transmission de **personne-à-personne**, le plus fréquent, est incriminé dans 142 épidémies soit 60,2% des cas. Cependant, le mode de transmission restait inconnu ou non renseigné pour un quart des épidémies (59 ; 25,0%). Une origine alimentaire a été à l'origine de 34 épidémies (14,4%). Les épidémies d'origine hydrique restent marginales (1 ; 0,4%). Globalement, ces résultats

sont comparables à ceux constatés au cours de la période 2012-2016 avec, proportionnellement et de manière non significative, une légère augmentation du nombre de cas à transmission de personne-à-personne (+6,9 points) et une légère baisse du nombre de cas à transmission d'origine alimentaire (-3,9 points).

– Relation site et mode de transmission :

En 2017, comme sur la période 2012-2016, la majorité des épidémies est advenue dans des EHPAD ou des services hospitaliers. Le principal mode de propagation des virus entériques dans ces établissements était une transmission de personne-à-personne (57,6% en 2017 et 49,4% de 2012 à 2016). Cependant, les causes inconnues restent encore fréquentes (24,2% en 2017 et 25,6% de 2012 à 2016). L'origine alimentaire y est toutefois retrouvée dans quelques épidémies (4,6% en 2017 et 4,5% de 2012 à 2016).

Comme attendu, une origine alimentaire est principalement trouvée dans les épidémies survenant lors d'une réception, dans les écoles et dans les centres pour adultes.

3.2.2 Caractéristiques virologiques des épidémies de gastro-entérites à rotavirus en France : bilan de la surveillance de la saison 2016-2017

Dix-huit centres participent à cette étude depuis 2006 et **12 centres ont envoyé des prélèvements durant la saison 2016-2017**.

Au total, nous avons reçu et analysé **843 prélèvements durant la saison 2016-2017 (soit 9672 souches de rotavirus « génotypées » entre 2006 et 2017)**

1/ Distribution saisonnière des épidémies à rotavirus

Les infections à rotavirus sont saisonnières et surviennent durant les mois d'hiver. Cependant les résultats de notre étude européenne (réseau EuroRotaNet) montrent un gradient Sud-Nord et Ouest-Est avec un pic d'infections plus précoce en Espagne (décembre à février) et plus tardif (avril-mai) dans les pays du nord et de l'est de l'Europe. **En France, le pic des infections de la saison 2016-2017 est apparu en février et les trois mois durant lesquels il y avait le plus de prélèvements positifs étaient janvier-février-mars.** Cette saison a été légèrement plus précoce par rapport à la saison dernière et au pic moyen observé sur les résultats compilés des saisons 2006 à 2017 (**Figure 7**).

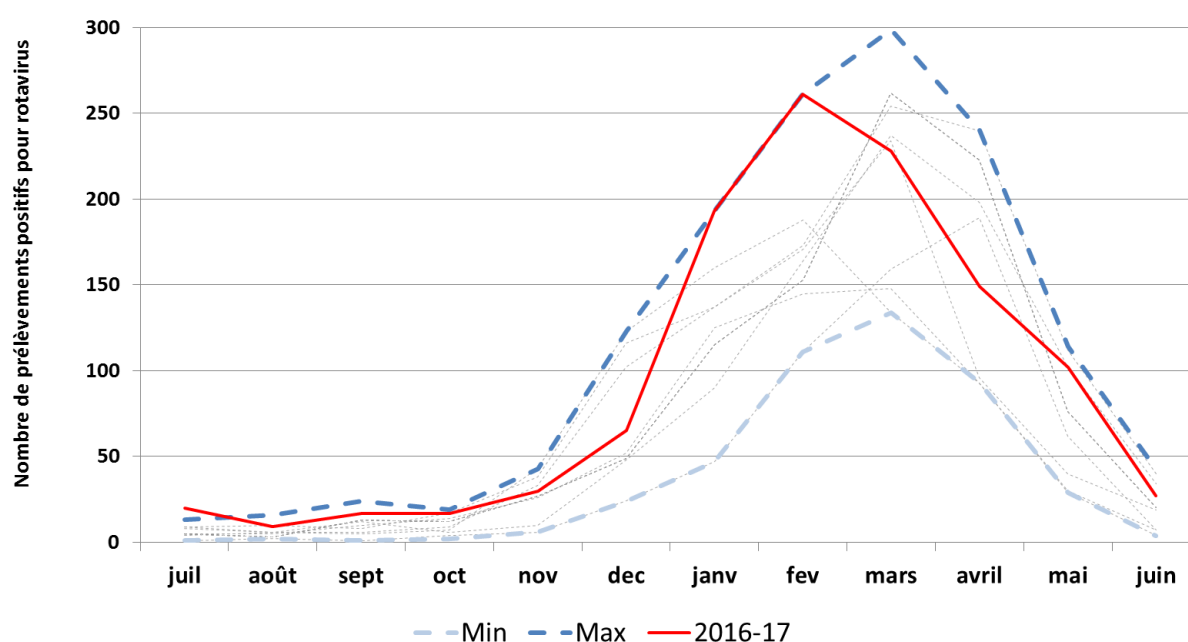


Figure 7 : Distribution temporelle des infections à rotavirus pour la saison 2016-17 comparée aux maximums et minimums des saisons de 2006 à 2017.

Cependant, il y a globalement peu de différence d'une année à l'autre puisque le pic des infections a lieu en mars pour 8 saisons sur 11 de 2006 à 2017, les autres ayant eu lieu en février pour les saisons 2007-08 et 2016-17, et en avril pour 2006-07. Les mois les plus importants sont février à avril pour 7 saisons (2006-07, 2009-10 et de 2011 à 2016) et janvier à mars pour les 4 autres (2007-08, 2008-09, 2010-11 et 2016-17).

2/ Analyse de la répartition des combinaisons génotypiques G/P

Saison 2016-2017 (Figure 8)

En tout 843 prélèvements ont été caractérisés au cours de la saison 2016-17. En comparaison avec l'étude globale, les résultats importants de cette dernière saison sont :

- le génotype G9P[8] continue sa diffusion après sa réémergence au cours de la saison 2014-15 (32,1) et surtout au cours de la saison 2015-16 avec une forte fréquence de détection (64,1%). Ce génotype représentait au cours de la dernière saison 74,1% des souches circulantes de rotavirus. Ces G9P[8] appartiennent au lignage III pour le génotype G9 et au lignage P[8]-3 pour le génotype P[8]. Ces souches diffèrent peu de celles détectées au cours de la dernière décennie et notamment d'avec celles de la saison 2004-2005 qui a vu ce génotype émerger en France.
- Les autres génotypes importants sont :
 - G1P[8] (9,0%) qui demeure néanmoins le premier génotype toutes saisons confondues
 - G2P[4] (7,5%) qui conserve son niveau moyen en terme de fréquence (6,2% sur la période 2006-2017).
 - G3P[8] (2,7%) et G4P[8] (0,8%) qui sont en nette régression par rapport à leur fréquence moyenne (7,0% et 2,3%, respectivement)
 - G12P[8] (0,5%) qui est en nette diminution depuis son émergence ces 5 dernières saisons.

La persistance d'un certain nombre de souches non typables (1,4%) est liée à l'amélioration de nos méthodes de détection et ne reflète pas l'émergence de souches atypiques. La détection par PCR en temps réel, plus sensible, entraîne en effet une augmentation des prélèvements diagnostiqués positifs sans que l'on puisse caractériser plus en détail le rotavirus détecté par les techniques conventionnelles de biologie moléculaire car les charges virales sont généralement très faibles.

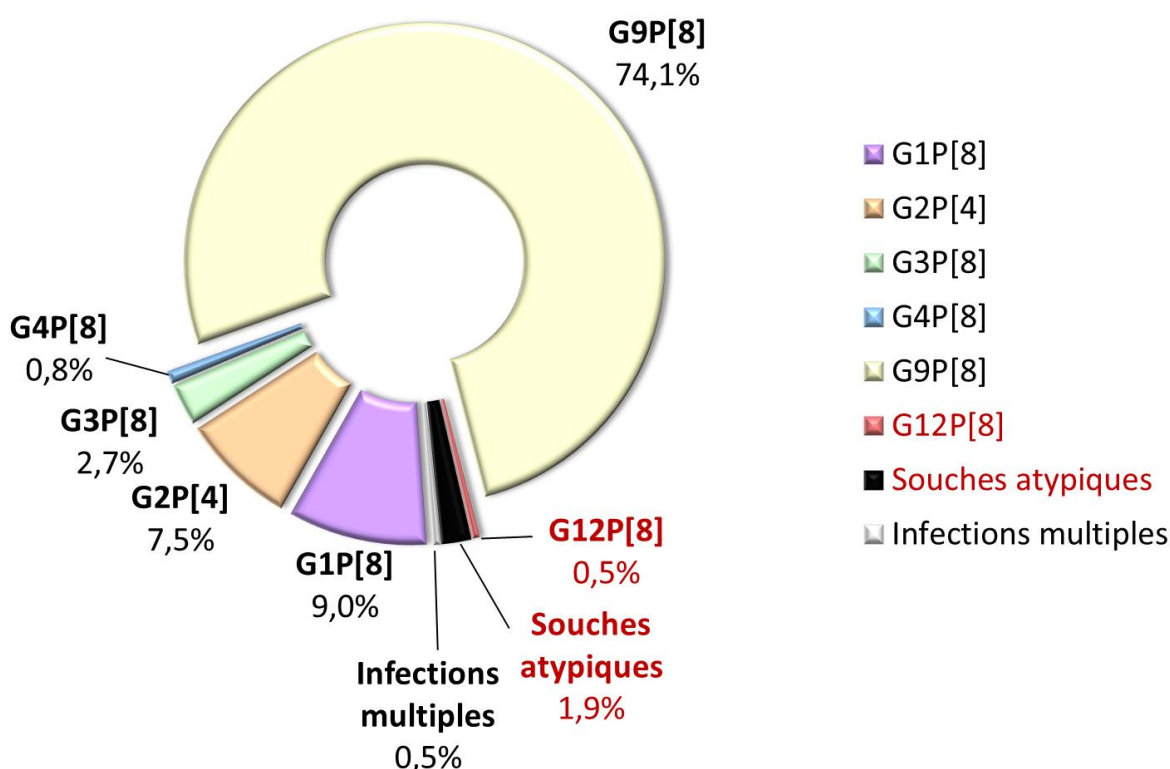


Figure 8 : Distribution des combinaisons de génotypiques G et P des rotavirus détectés en France durant la saison 2016-2017 (843 souches).

Bilan 2006-2017 (Figure 9)

Le recueil des prélèvements sur l'ensemble des saisons 2006-2007 à 2016-2017 est de **9672 souches de rotavirus** totalement ou partiellement caractérisées (figure 6a et tableau 4). Les six principales combinaisons de génotypes G/P (>1%) ont été durant ces onze années : **G1P[8] (52,5%) suivie de G9P[8] (27,2%), cumulant à elles seules 79,7% des souches détectées, puis G3P[8] (7,0%) et G2P[4] (6,2%).**

Les autres combinaisons d'importance significative étaient **G4P[8] (2,3%) et G12P[8] (1,4%)**. Ainsi, les cinq combinaisons génotypiques classiques (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8] et G9P[8]) représentaient 95,2% des souches caractérisées. Les **génotypes ou combinaisons atypiques** (incluant notamment quelques associations de génotypes G et P classiques) représentent **1,7 %** et les infections mixtes 1,7%.

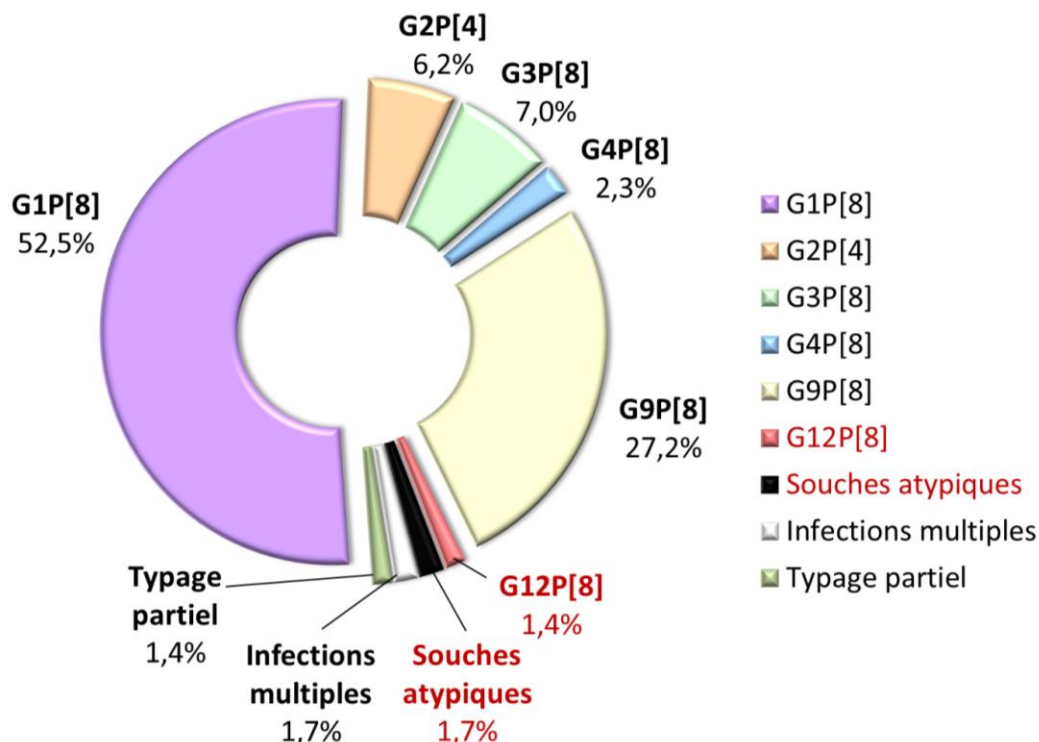


Figure 9 : Distribution des combinaisons de génotypes G et P des rotavirus détectés en France durant l'ensemble de la surveillance 2006-2017 (9672 souches).

3/ Analyse de la répartition des génotypes G ou P

L'analyse séparée des **génotypes G** (Tableau 8, Figures 10 et 11) montre une répartition des souches semblable à celle observée pour les combinaisons G/P. Les génotypes G inhabituels détectés en France en 2016-2017 ont été **G6 (0,6%) et G8 (0,1%)**. Aucun génotype G5 ou G10 (souches d'origine bovine) n'a été caractérisé durant la saison 2016-2017.

Le fait marquant de cette saison 2016-2017 est la **persistance à une fréquence très élevée des rotavirus de génotype G9** (632 souches (76,3%)).

Le **génotype G12** (4 souches (0,5%)) semble désormais circuler de manière moins régulière en France que depuis son émergence au cours de la saison 2011-2012. Cette observation est similaire à celle de la saison 2013-14 qui était une saison plutôt « creuse » (7 prélèvements (0,6%)) pour les G12. Cette émergence du génotype G12 (associé au génotype P[8]) a été observée dans toute l'Europe mais avec des différences selon les pays. L'Espagne est le pays où cette émergence a été la plus marquée avec une fréquence >60% dans le Pays Basque.

Tableau 8 : Distribution et prévalence par année des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2017 et durant la saison 2016-2017.

	Nombre de souches de rotavirus génotypées		
	2006-2016 n=8929	2016-2017 n=828	2006-2017 n=9887
Génotypes G^a			
G1	5004 (55,2)	80 (9,7)	5084 (51,4)
G2	567 (6,3)	70 (8,5)	637 (6,4)
G3	737 (8,1)	25 (3,0)	762 (7,7)
G4	253 (2,8)	9 (1,1)	262 (2,6)
G6	17 (0,2)	5 (0,6)	22 (0,2)
G8	13 (0,1)	1 (0,1)	14 (0,1)
G9	2198 (24,2)	632 (76,3)	2830 (28,6)
G10	2 (<0,1)	0	2 (<0,1)
G12	138 (1,5)	4 (0,5)	142 (1,4)
Infections mixtes (types G)			
G1 + G2	19 (0,2)	1 (0,1)	20 (0,2)
G1 + G3	22 (0,2)	0	22 (0,2)
G1 + G4	9 (0,1)	0	9 (0,1)
G1 + G9	62 (0,7)	1 (0,1)	63 (0,6)
G2 + G3	1 (<0,1)	0	1 (<0,1)
G2 + G4	1 (<0,1)	0	1 (<0,1)
G2 + G9	4 (<0,1)	1 (0,1)	5 (0,1)
G3 + G4	2 (<0,1)	0	2 (<0,1)
G3 + G9	21 (0,2)	0	21 (0,2)
G4 + G9	8 (0,1)	0	8 (0,1)
Génotypes P^a			
P[3]	3 (<0,1)	2 (0,2)	2 (<0,1)
P[4]	602 (6,7)	64 (7,7)	569 (6,0)
P[5]	1 (<0,1)	0	1 (<0,1)
P[6]	51 (0,6)	12 (1,5)	56 (0,6)
P[8]	8172 (91,5)	753 (91,2)	8438 (86,5)
P[9]	6 (0,1)	21 (2,5)	26 (0,3)
P[14]	9 (0,1)	0	9 (0,1)
Infections mixtes (types P)			
P[4] + P[8]	34 (0,4)	3 (<0,1)	37 (0,4)

^a Inclus les infections multiples

Les **génotypes P** (Tableau 8 et Figures 10 et 11) sont peu diversifiés et très largement dominés par le génotype **P[8]** (globalement 95,3% entre 2006-2017 et 92,5% en 2016-2017), alors que le génotype **P[4]** représente globalement 7,5% entre 2006-2017 et 6,4% cette dernière saison.

Ce résultat concernant le génotype P[4] est à considérer dans le suivi des effets de la vaccination (en particulier avec le vaccin Rotarix® constitué d'une souche G1P[8] atténuée). Entre 2006 et 2017, les génotypes atypiques en France étaient représentés par **P[3], P[5], P[6], P[9] et P[14]** ce qui représentait 70 (0,8%) souches. Durant la saison 2016-2017 nous avons détecté les **génotypes P[6] (3 souches), P[5] et P[14] (1 souche chacun) soit 0,6% des souches.**

La constance de la prévalence du génotype P[8] entre 2006 et 2016 est rassurante et doit être soulignée s'agissant de l'efficacité de la vaccination puisque les deux vaccins commercialisés possèdent cette valence antigénique dans leur composition.

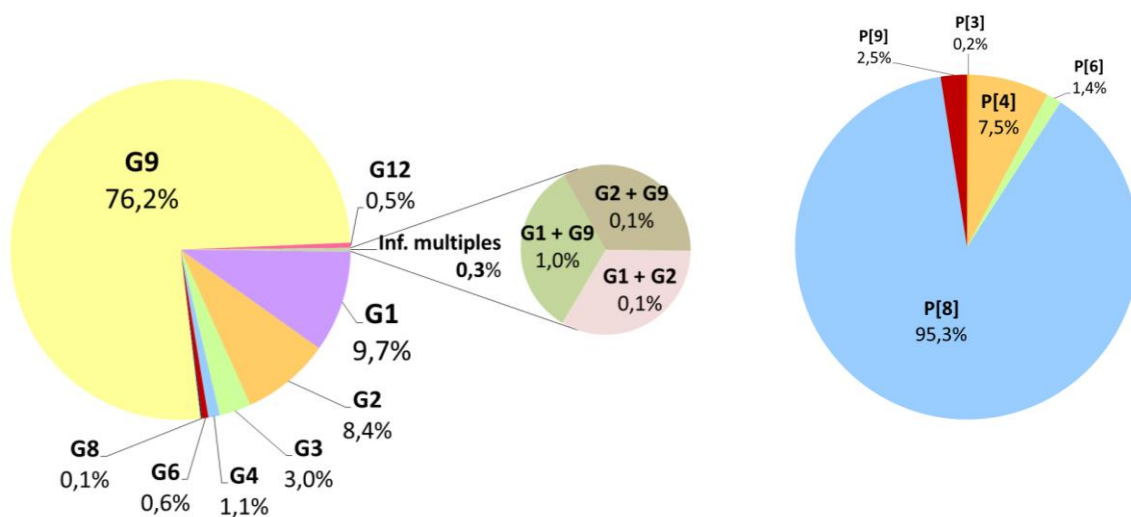


Figure 10 Distribution des génotypes G et P détectés en France pour la saison 2016-2017

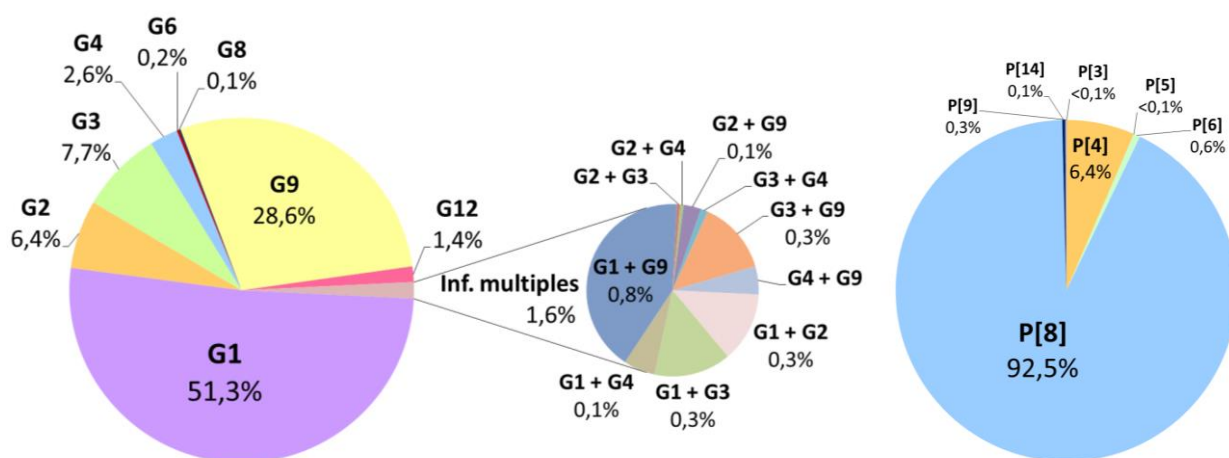


Figure 11. Distribution des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2017

4/ Variations temporo-spatiales des combinaisons de génotypes G/P

a/ Variations des génotypes G/P entre 2006-2017 (Figure 12)

Évolution des génotypes G/P « classiques »

L'évolution des génotypes G/P durant cette période de surveillance est marquée par :

- la **prédominance du génotype G9P[8]** : après sa brutale émergence en 2004-2005 (65,0%), sa fréquence diminuait régulièrement de 25,1% à 6,3% en 2012-2013. Sa réapparition à un taux élevé au cours des saisons 2013-2014 et 2014-15 (21,1% puis 30,9%) puis sa réémergence au cours des saisons 2015-16 et 2016-17 (66,0% et 74,1%, respectivement) soulève des questions quant à sa circulation et son évolution. Il sera important de comparer nos résultats à ceux obtenus en Europe, l'émergence brutale observée en 2004-2005 avait été un phénomène observé sur tout le continent.
- Le **génotype G1P[8]** stable depuis plus de 10 ans a vu sa fréquence chuter avec la réémergence des G9P[8] (entre 53,0% et 73,1% entre 2005 et 2015 ; 16,8% en 2015-2016 et 9,0% en 2016-2017). Ce phénomène a déjà été observé en 2004-2005 mais il n'avait duré qu'une seule saison. Les résultats des génotypages de la saison prochaine 2017-2018 seront à regarder de près avec soit une inversion des fréquences G1P[8] et G9P[8] comme lors de la saison 2005-2006, soit une persistance des G9P[8] à un haut niveau de prévalence.

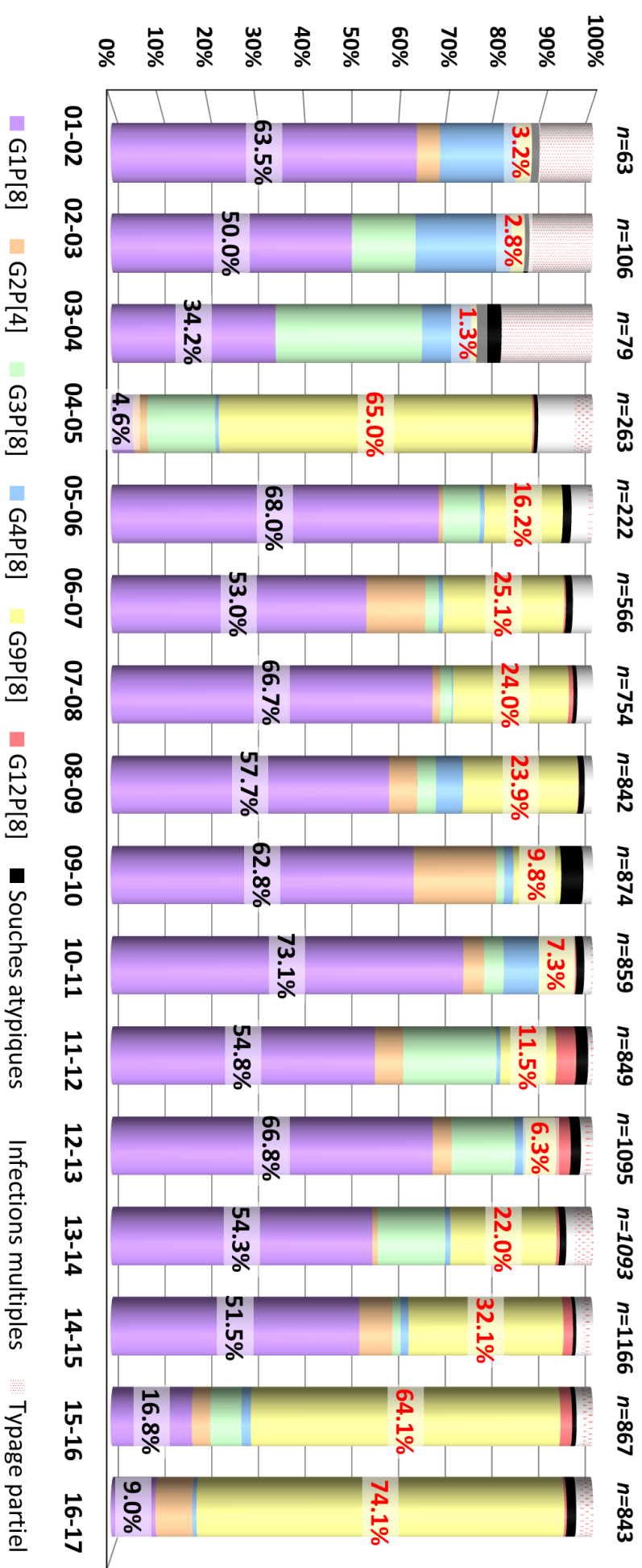


Figure 12. Évolution des combinaisons de génotypes G/P de rotavirus en France entre 2001 et 2017
 (Noter que la période 2001 à 2006 est une étude limitée.)

- le **génotype G12P[8] : son émergence récente** (4,2% en 2011-12 et 3,0% en 2012-2013) laissait penser qu'il deviendrait l'un des six génotypes importants en France. Après une saison 2013-2014 creuse (7 souches ; 0,6%), ce génotype a été détecté à une fréquence de 2,1% (23 souches) en 2014-2015 puis 2,6% en 2015-2016, confirmant la persistance de la circulation des rotavirus G12 en France. La saison 2016-2017 a montré un net recul de la circulation des G12P[8] comme au cours de la saison 2013-2014. Aucune donnée ne permet actuellement de savoir si il y aura une résurgence de la fréquence ou une stabilisation de la circulation des G12P[8] à de bas niveaux de fréquence.
- les autres génotypes **G2P[4], G3P[8] et G4P[8] évoluent de façon cyclique selon les saisons** : G2P[4] (entre 1,6% et 17,2%) ; G3P[8] (entre 1,6% et 19,3%) ; G4P[8] (entre 0,3% et 7,3%).

Évolution des génotypes ou combinaisons atypiques

- en dehors du génotype G12P[8], décrit précédemment dans les souches dites « classiques », les **génotypes atypiques** sont des combinaisons incluant l'un des génotypes **G6, G8, G10, P[3], P[5], P[6], P[9] et P[14]**. Sur l'ensemble de l'étude elles représentent **82 souches (0,8%) dont 12 (1,4%) en 2016-2017**. Parmi ces génotypes inhabituels, le génotype P[6] est le plus important (59 souches au total dont 10 en 2016-2017). Certaines de ces souches peuvent être d'origine animale, notamment bovine et caprine. Il s'agissait pour la dernière saison de souches G1P[6] (3), G4P[6] (1), G6P[6] (4) et G9P[6] (1) ainsi que des souches G6P[14] (1) et G8P[14] (1).
- les **combinaisons atypiques**, par exemple G2 associé à P[8] ou G1, G3, G4, G9 ou G12 associé à P[4] représentent 1,0% des souches détectées de 2006 à 2017 et 0,9% sur la dernière saison (8 souches dont 7 G2P[8] et 1 G3P[4] durant la saison 2016-2017).

b/ Variabilité géographique des génotypes de rotavirus (Figure 13)

Nous avons montré dans les précédents rapports qu'il existait une **variabilité géographique, selon les centres**. Nous retrouvons lors de cette saison 2016-2017 cette même variabilité géographique mais beaucoup moins marquée, compte-tenu de la forte fréquence de détection des G9P[8] qui varie de 51,2% à 89,9%. Néanmoins, cela concerne tous les génotypes. On peut noter, en particulier, une fréquence plus marquée des G2P[4] à Charleville (23,4%) et des G1P[8] à Saint-Etienne (34,9%).

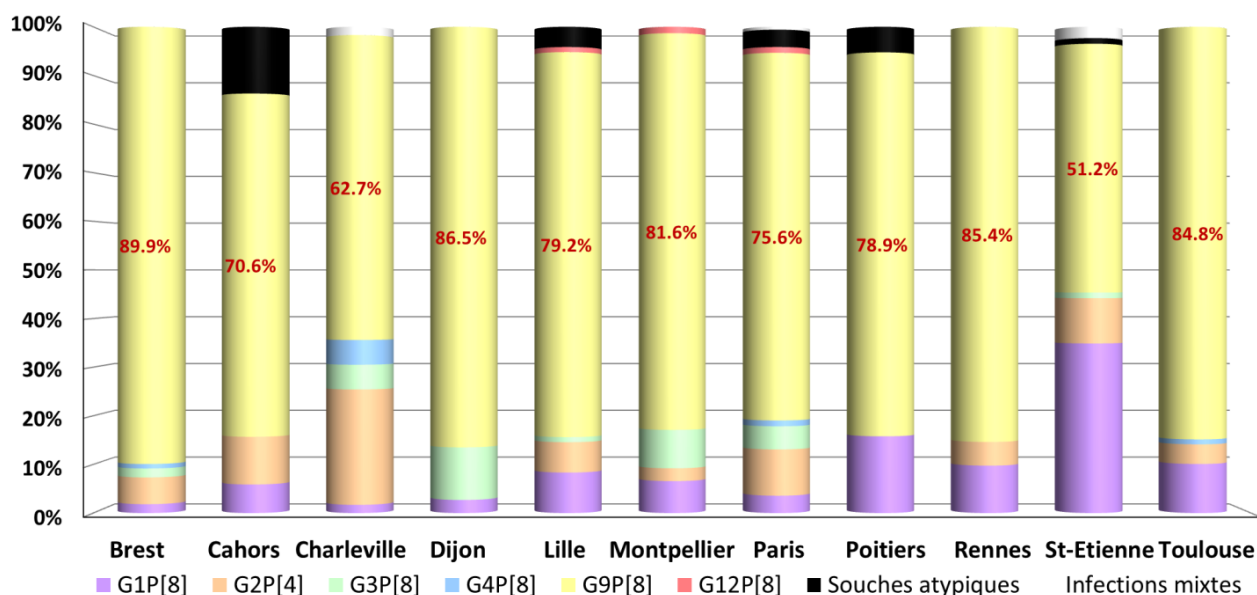


Figure 13 : Distribution des génotypes en France selon les centres durant la saison 2016-17

5/ Conclusions

La surveillance épidémiologique des souches de rotavirus a été effectuée en France en dehors de toute pression vaccinale. En effet, la couverture vaccinale ne dépasse pas, en 2018, 5% tous vaccins confondus (c.-à-d. pour les vaccins Rotarix® (monovalent, GSK) et Rotateq® (pentavalent, Merck)).

La distribution saisonnière des épidémies de gastro-entérites à rotavirus s'étale en France principalement entre décembre et avril avec de faibles variations selon les saisons. En revanche, il

semble exister une différence entre les centres parisiens, où les épidémies commenceraient plus tôt, dès décembre, suivi par la province de février à avril.

Les résultats significatifs concernant la répartition des génotypes des rotavirus sont :

- la **large prédominance du génotype G1** à l'exception des saisons 2004-2005, et plus récemment, 2015-2016 et 2016-2017.
- **l'émergence de nouveaux génotypes** :
 - le **génotype G9** est devenu, depuis la saison 2004-2005, un génotype « classique » avec G1, G2, G3 et G4. Il a ré-émergé au cours des saisons 2015-2016 et 2016-2017 avec une forte prévalence (66,0% et 74,5%, respectivement).
 - **l'émergence dès la saison 2011-2012 du génotype G12**, globalement moins brutale que celle du génotype G9, représentant en France environ 4% des souches avec des différences significatives selon les centres. Ce génotype reste marginal et circule de moins en moins en France.
- la **variation cyclique des génotypes G2, G3 et G4**. Le génotype G2P[4] doit cependant être plus particulièrement suivi dans les pays où la couverture vaccinale est élevée, principalement avec le vaccin monovalent.
- la stabilité de la fréquence des souches inhabituelles (notamment le génotype P[6]) et l'existence, parmi celles-ci, de **souches d'origine animale** infectant les enfants.

Outre cette variabilité saisonnière des génotypes, il existe une **grande variabilité géographique**. Variabilité selon les centres en France et quelle que soit la saison. Cette variabilité est également retrouvée au niveau des pays européens.

3.3 INTERFACES AVEC LES RÉSEAUX DE SURVEILLANCE NATIONAUX OU INTERNATIONAUX

3.3.1 Réseaux internationaux « NoroNet » et « EuroRotaNet »

Le **réseau européen NoroNet** regroupe les laboratoires des réseaux européens constitués à partir de financements de la Communauté Européenne. Ce réseau mondial regroupe plusieurs laboratoires européens, d'Amérique du Nord et du Sud, d'Asie et d'Océanie. Il a pour mission la surveillance et la caractérisation des virus des gastro-entérites, essentiellement les norovirus. Ils nous offrent l'accès et le partage d'une base de données ; la possibilité d'une comparaison des souches de norovirus et d'une surveillance prospective des nouveaux variants. Ils sont des outils majeurs de la caractérisation des souches de norovirus détectées. Le CNRVge participe à ce réseau depuis sa création. Nos partenaires français sont SPF et l'IFREMER.

- *Composition du réseau NoroNet : Europe (Pays-Bas, Grande-Bretagne, Allemagne, Hongrie, Suède et France) ; Amérique (USA, Canada, Nicaragua Venezuela, Chili) ; Asie Israël, Japon, Chine, Inde, Malaisie) ; Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande).*

Le **réseau « EuroRotanet »** a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus responsables des gastro-entérites chez les enfants. Le CNR des virus des gastro-entérites de Dijon a participé à la création de ce réseau européen. Ce réseau nous permet une actualisation de nos techniques de caractérisation des génotypes de rotavirus et un partage des données virologiques et épidémiologiques. Outre notre participation aux recherches épidémiologiques dans un cadre européen, l'intégration de notre laboratoire dans ces réseaux nous donne l'accès aux **contrôles de qualité externes (rotavirus)**.

- *Composition des réseaux européens : Ces réseaux regroupent 14 laboratoires de 12 pays européens : **Pays Bas**: RIVM, Bilthoven (Dr M. Koopmans) ; **Finlande**: Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH) ; **Danemark**: Virus Diagnostics Laboratory, Copenhagen (Dr Böttiger) ; **Suède**: Karolinska Institute, Slona (Dr Svensson L) ; **Grande Bretagne**: Central Public Health Laboratory, London (Dr Brown D) ; **Allemagne**: Robert Koch- Institut, Berlin (Dr Schreier E) ; **Espagne**: Institut de Salud Carlos III, Madrid (Dr Sanchez A), Universitat de Barcelona (Dr Bosch A) et Universitat de Valencia (Dr Buesa J) ; **Italie**: Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), **Slovénie** : Medical Faculty of Ljubljana (Dr. Poljsak-Prijatelj M); **Hongrie** : County Institute of State Public Health Service (Dr Szucs G) ; **France** : IFREMER (Dr F. Le Guyader S), CNR hépatites A (APHP Paul Brousse, Pr AM. Roque-Afonso) et E (CHU Toulouse, Pr J. Izopet), CNR virus des gastro-entérites (CHU Dijon, Dr A. de Rougemont).*

3.3.2 Relations avec les pays Africains

Ces collaborations ont pour objectifs 1) la formation de virologistes aux techniques de détection-caractérisation des virus entériques et 2) une surveillance épidémiologique des virus entériques dans la population et dans l'environnement des pays du pourtour méditerranéen et d'Afrique subsaharienne afin d'anticiper un risque de diffusion en Europe.

1/ Réseau avec le Maghreb

Ces collaborations ont été soutenues par les **programmes CMCU et Hubert Curien** du Ministère des Affaires Etrangères et du Ministère de la Recherche.

Durant l'année 2017 ce réseau a été principalement actif avec la **Tunisie**. Nous avons accueilli Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (chercheur universitaire invité de l'Université de Monastir) dont les travaux portent sur les norovirus et les virus Aichi.

2/ Programme d'Appui à la Recherche en Réseau en Afrique (PARRAF)

Dès 2010 nous avons commencé une collaboration avec le Niger (Centre de Recherche Médicale et Sanitaire et l'Université, Niamey). Nous avons étendu cette collaboration au Burkina Faso à partir de 2011 et jusqu'à présent dans le cadre d'un programme « PARRAF ».

En 2017, le programme PARRAF regroupe 2 partenaires « Nord », notre CNR et l'Unité des bactéries pathogènes entériques dirigée par le Dr François-Xavier WEILL et 5 partenaires « Sud » : l'Institut Pasteur de Dakar (**Sénégal**), l'Université de Ouagadougou (**Burkina Faso**), l'Institut National de Santé Publique (**Guinée Conakry**), l'Institut National de Recherche en Santé Publique (**Mali**), Centre de Recherche Médicale et Sanitaire de Niamey (**Niger**).

Au cours de l'année 2017 ce réseau a été principalement actif avec le Burkina Faso. Nous avons accueilli Mme le Dr. Nafissatou OUEDRAOGO (assistant-chercheur invité de l'Université de Ouagadougou) dont les travaux portent sur les rotavirus et les norovirus.

3.4 ÉTUDES PONCTUELLES CONCOURANT À LA SURVEILLANCE

3.4.1 Suivi des établissements long séjour du CHU de Dijon

Ce travail prospectif de surveillance a été commencé fin 2016. Il s'agit d'étudier le microbiote intestinal chez les patients présentant une diarrhée virale à norovirus (collaboration avec l'Institut les Prs. Philippe LANGELLA et Harry SOKOL du laboratoire MICALIS, INRA, Jouy-en-Josas)

3.4.2 Caractérisation de nouveaux virus dans les selles de patients

En collaboration avec le laboratoire d'Eric DELWART (Université de Californie, San Francisco, USA) nous recherchons par une approche métagénomique la présence de virus inhabituels ou nouveaux dans les selles de patients diarrhéiques préalablement sélectionnés. En 2015/2016 cette recherche nous a permis de caractériser de nouveaux virus pour lesquels le nom de *Smacoviridae* a été proposé pour cette nouvelle famille de virus.

4. ALERTE

4.1 CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE (SPF)

Un point hebdomadaire avec Santé Publique France est effectué le mardi de novembre à avril. Le réseau Sentinelles est associé à cette réunion téléphonique. Nos contacts à SPF sont Madame Nathalie JOURDAN-DA SILVA et Madame Nelly FOURNET. Nos interlocuteurs au réseau Sentinelles ont été tout d'abord Monsieur Thomas GORONFLOT, remplacé ensuite par Mme Lucie FOURNIER.

4.2 PROCÉDURES D'ALERTE DE SPF ET DES AUTRES PARTENAIRES

4.2.1 Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...)

- Informer le demandeur de l'existence de formulaires à remplir disponibles sur le site internet du CNR
- Déterminer l'identifiant de l'épidémie (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :

code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année (Exemple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)

- Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** (<https://voozanoo.invs.sante.fr>).

4.2.2 Arrivée de prélèvements sans annonce préalable

- Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyés au prescripteur, par fax ou par mail, les formulaires pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

Important : Penser à noter la date de réception des prélèvements sur les papiers joints (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)

4.3 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

4.3.1 Transmission des données à SPF Voozanoo

Voozanoo est une base de données partagée entre SPF et le CNR, qui permet un échange en temps réel des informations épidémiologiques et moléculaires sur les épidémies de gastro+entérites annoncées et/ou traitées (voir paragraphe 4.4. et annexe 3).

- Enregistrement d'une épidémie dans la base Voozanoo : annonce d'une épidémie au CNR directement par un laboratoire, une ARS. Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à SPF, créer une nouvelle fiche pour entrer les premières informations.
- Rendu des résultats à SPF : les résultats préliminaires et définitifs sont entrés dans la base Voozanoo de SPF. Parallèlement, les résultats définitifs sont entrés dans le système informatique des laboratoires (SIL) du CHU de Dijon (Corlabs) pour archivage ; ce système informatique est protégé par un accès sécurisé.

4.3.2 Anonymisation des prélèvements

- Enregistrement des prélèvements reçus au CNR : repérer sur le serveur sécurisé le tableau de synthèse (*S:\CNR Virus Enteriques\Tableaux de synthèse\Synthèse échantillons*) le ou les numéros et identifier chacun des échantillons face au numéro en fin de liste (commencer par E...) puis les enregistrer sur le serveur du CHU (*S:\CNR Virus Entériques\Tableaux de synthèse\Synthèse échantillons*).
- Classement des dossiers : annexer les documents joints aux prélèvements dans une chemise identifiée par :
 - le nom de la ville qui a inspiré le numéro d'identifiant,
 - l'identifiant de l'épidémie (*code département / 2 premières lettres de la ville / mois / année*)
 - le numéro du carton suivi du numéro de la chemise (Exemple : 15.03 correspond au carton n°15, la chemise n°3 dans ce carton),
 - les **numéros des échantillons** correspondants (E.... à E....).

5. ACTIVITÉS DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ

5.1.1 Site internet « www.cnr-ve.org »

Le site nous permet une présentation du CNR et de ses missions. Il détaille les différentes procédures : conditions de prélèvement des selles, de leur conservation et de leur acheminement au CNR, les virus recherchés au CNR. Il est continuellement mis à jour.

Sur le site se trouvent également toutes les communications et publications du CNR et met à disposition les rapports d'activité du CNR.

Lien web : <http://www.cnr-ve.org>

5.1.2 Activité de formation

L'activité de formation se fait essentiellement par l'accueil et l'encadrement de stagiaires. Une formation par séminaire et publications didactiques est également proposée.

Stagiaires accueillis en 2017 :

- Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (Université Monastir, Tunisie)
- Mme le Dr. Nafissatou OUEDRAOGO (Université de Ouagadougou)
- M. Vincent TESSON (doctorant PhD, INRA Avignon)
- M. Georges TARRIS (interne de médecine en anatomo-pathologie en année recherche)
- M. Bastien CAUQUIL (interne de pharmacie en biologie)
- Mlle Léna EBERHART (étudiante en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Alizé GODIN (étudiante en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Justine CHOLLET (étudiante en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Maria BOLDOR (étudiante en médecine en stage M1 d'initiation à la recherche)
- Mlle Océane CORDIER (IUT de Dijon)

5.1.3 Activité de conseil aux professionnels de santé

Comme par le passé, le CNR virus des gastro-entérites apporte son aide ou ses conseils aux établissements publics, de soins ou d'hébergement (publics ou privés), aux administrations qui lui en font la demande.

5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES

Le CNR participe régulièrement au Groupe de Travail « Sécurité Virale » de l'**ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament)**.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR

6.1 ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU CNR EN COURS POUR 2017

6.1.1 Études en cours non publiées

1/ Évaluation de trousse commerciale de biologie moléculaire (RT-qPCR) pour la détection isolée ou combinée des rotavirus et norovirus dans les selles

Objectifs : évaluer les sensibilités et spécificités de trousse commerciale de RT-qPCR simplex et multiplex pour la détection des rotavirus et des norovirus disponibles en France. Un panel d'une centaine de selles de chaque virus sera testé afin de déterminer les performances de ces trousse

Partenariats : une dizaine de fabricants ont été contactée afin d'obtenir à titre gracieux les trousse nécessaires à l'étude.

État d'avancement : L'étude est en cours de mise en place et démarrera dès que toutes les trousse seront à la disposition du CNR.

2/ Études de la prévalence des infections à cosavirus, salivirus et bufavirus chez les enfants de moins de 5 ans

Objectifs : évaluer la circulation de nouveaux virus retrouvés dans les selles de sujets diarrhéiques et établir leur lien de causalité avec la diarrhée. Il s'agit de 2 nouveaux genres de *Picornaviridae* (Cosavirus et Salivirus) et 1 nouveau genre de *Parvoviridae* (Bufavirus). L'étude porte sur les populations pédiatriques consultant ou hospitalisées aux CHU de Dijon et Saint-Etienne sur une année complète. Les virus sont détectés par (RT)-qPCR dans les selles.

Partenariats : l'étude est effectuée collaboration avec le CHU de Saint-Etienne qui fournit les selles des enfants réceptionnées au laboratoire de virologie.

État d'avancement : En tout, 537 selles d'enfants de moins de 5 ans diarrhéiques ou non ont été collectés pendant 1 an aux CHU de Dijon et de Saint-Etienne, et ont été recherchées à l'aide de techniques de PCR en temps réel. Au total 170 selles ont été trouvées positives pour l'un des 3 virus : 86 (16,0%) cosavirus, 2 (0,4%) salivirus (génotype A1) et 85 (15,8%) bufavirus. Une co-infection avec un ou plusieurs autres virus entériques (norovirus, rotavirus, astrovirus, sapovirus, aichivirus, adénovirus, parechovirus et bocavirus) a été retrouvée pour 86 (56,0%) selles. L'analyse génotypique permettra également de déterminer les génotypes viraux circulant en France.

Tableau 9 : Résultats préliminaires

	NoVGI	NoVGII	RVA	AstV	SaV	AiV	AdV	PeV	BoV	Co-inf.
CosV n=86	0 0,0%	7 8,1%	43 50,0%	1 1,2%	1 1,2%	0 0,0%	1 1,2%	2 2,3%	1 1,2%	56 65,1%
SalV n=2	0 0,0%	1 50,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 50,0%
BuV n=85	1 1,2%	13 15,3%	7 8,2%	1 1,2%	7 8,2%	0 0,0%	2 2,4%	2 2,4%	1 1,2%	34 40,0%
Total n=170	1 0,6%	21 12,4%	50 29,4%	2 1,2%	8 4,7%	0 0,0%	3 1,8%	4 2,4%	2 1,2%	91 53,5%

Rq : les 3 adénovirus retrouvés étaient des adénovirus non entériques (AdV-2, 3 et 6)

3/ Étude histopathologique d'un cas de décès consécutif à une infection à rotavirus

Objectifs : mettre en évidence la capacité de diffusion extra-intestinale et de la réplication de rotavirus (RVA) dans les organes chez un enfant de 16 mois sans antécédent décédé d'une diarrhée à rotavirus à l'aide de techniques immunohistochimiques et d'immunofluorescence ciblant les protéines virales structurales (VP2 et VP6) et non-structurales (NSP2, NSP4 et NSP5) dans divers organes.

Partenariats : l'étude est effectuée collaboration avec le Service de Pathologie du CHU de Dijon.

État d'avancement : Les analyses de biologie moléculaire (RT-qPCR) ont mis en évidence une importante virémie à RVA de génotype G1P[8] et la présence de génome dans les divers tissus explorés. L'étude immunohistochimique a permis de montrer la présence intracellulaire des protéines virales NS et VP au niveau du pôle apical des cellules des portions ascendantes et descendantes de l'anse de Henlé, démontrant une réplication active du RVA. Ces résultats sont confirmés par la co-détection des protéines virales par immunofluorescence dans ces structures. Les protéines virales n'ont pas été détectées dans les structures cellulaires du cœur, du foie, du poumon et du péricarde malgré la détection du génome du RVA par RT-qPCR, car celle-ci était liée à la virémie intra-capillaire. Cette étude démontre la capacité du RVA à se répliquer dans certaines cellules épithéliales tubulaires rénales impliquées dans la réabsorption hydro-électrolytique. Nos données suggèrent que RVA pourrait jouer un rôle critique dans l'occurrence de la mort subite chez le nourrisson en causant des dommages organiques irréversibles et une insuffisance rénale. En conséquence, outre la réhydratation, nos données suggèrent que la fonction rénale devrait être surveillée chez les nourrissons souffrant de GEA sévère et nécessitant une hospitalisation.

6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie (*abstracts*)

Au cours de l'année 2017, le CNRvge a publié 2 études portant sur l'évaluation de réactifs de biologie :

- une étude portant sur la sensibilité et la spécificité d'un test ICG et d'un test ELISA comparativement aux techniques de biologie moléculaire pour le diagnostic des rotavirus au Niger.
- une étude portant sur l'efficacité des tests ICG pour le diagnostic des norovirus et des rotavirus dans les établissements de soins pour personnes âgées dépendantes (EHPAD).

1/ *Diagnostic accuracy of VIKIA® Rota-Adeno and Premier™ Rotaclone® tests for the detection of rotavirus in Niger*

Objective: We conducted a parallel evaluation of the diagnostic accuracy of VIKIA® Rota-Adeno, a rapid diagnostic test (RDT) and Premier™ Rotaclone® an enzyme immunoassay (EIA) using reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) as the reference standard. The study was part of a rotavirus surveillance project in Niger.

Results: The sensitivity of both tests was 80.7%. After exclusion of one indeterminate result by visual reading, the specificity of the Premier™ Rotaclone® was 100% by visual or optical density readings and that of VIKIA® Rota-Adeno test was 95.5%. Inter-reader agreement was excellent for both tests (kappa = 1). Our results showed almost similar performance of the EIA and RDT when compared to RT-PCR. Hence, the VIKIA® Rota-Adeno could be a good alternative for use in peripheral health centres where laboratory capacity is limited.

2/ *Viral prevalence and laboratory investigations of gastroenteritis in institutions for dependent people*

Objectives: Viruses are recognized as important agents of gastroenteritis outbreaks in institutions caring for dependent people. We aimed to define norovirus (NoV) and rotavirus (RV) immunochromatographic tests (ICT) and reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) used in gastroenteritis investigations.

Methods: Fourteen sites were monitored from 2010 to 2015, with 360 laboratory investigations. Twenty-two outbreaks and 44 sporadic case patients were investigated with ICTs (114 NoVs and 80 RVs) and RT-PCRs (114 NoVs and 52 RVs).

Results: ICTs were useful during outbreaks (identification of NoVs and RVs in respectively 76.5% and 75.0% of episodes) despite the NoV sensitivity limit (55.1%) and the four RV false positive results observed for 10 samples. Given the NoV ICT performance and the observed variations of the NoV and RV prevalence (between 20.0% and 5.0%), ICTs are not appropriate to identify sporadic gastroenteritis case patients. Positive predictive values <60.0% were observed when the prevalence of RV and NoV was low (<5.0%). NoV and RV RT-PCR indications are sporadic gastroenteritis case patients, negative NoV and RV ICT during outbreaks, control of positive RV ICT in cases of suspected NoV and RV co-circulation, patients with long symptom duration, and NoV genogroup and genotype identifications (infection control and epidemiological surveillance). Inclusion of patients with specific clinical symptoms is recommended

irrespective of the technique.

Conclusion: On the basis of the ICT limits identified in this work, RT-PCR development seems essential to improve viral gastroenteritis investigations in institutions caring for dependent people.

6.1.3 Études épidémiologiques en France (abstracts)

Au cours de l'année 2017, le CNRvge a publié 3 études épidémiologiques portant sur :

- l'incidence des gastro-entérites virales en médecine générale en France depuis 1991
- la prédominance des rotavirus de génotype G9P[8] chez les enfants en France entre 2014 et 2017
- l'émergence des norovirus GII.P16-GII.4 et GII.P16-GII.2 en France à l'hiver 2016-2017

1/ Secular trends in incidence of acute gastroenteritis in general practice, France, 1991 to 2015

We analysed 25 years of general practitioner (GP) visits for acute gastroenteritis (AG) surveillance in France, by the GP Sentinelles network. We searched for time trends of acute gastroenteritis incidence during winter periods. Data from emergency departments and drug reimbursement were additional data sources. A time-series analysis was performed using a generalised additive model for all data sources for the winter period. Virological data were incorporated and compared with the three data sources. The cumulative incidence of GP visits for winter AG exhibited an increasing trend from 1991 until 2008, when it reached 6,466 per 100,000 inhabitants. It decreased thereafter to 3,918 per 100,000 inhabitants in 2015. This decreasing trend was observed for all age groups and confirmed by the generalised additive model. For emergency department visits a decreasing trend was observed from 2004. Drug reimbursement data analyses demonstrated a decreasing trend from when data began in 2009. The incidence reported by GPs and emergency departments was lower following the emergence of norovirus GII.4 2012 ($p < 0.0001$). Winter AG incidences seem to follow long-term rising and decreasing trends that are important to monitor through continuous surveillance to evaluate the impact of prevention strategies, such as future immunisation against acute viral gastroenteritis.

2/ Predominance of G9P[8] rotavirus strains throughout France, 2014-2017

Objectives: Group A rotavirus is a major cause of acute gastroenteritis in young children worldwide. A prospective surveillance network has been set up in France to investigate rotavirus infections and to detect the emergence of potentially epidemic strains.

Methods: From 2014 to 2017, rotavirus-positive stool samples were collected from 2394 children under 5 years old attending the paediatric emergency units of 13 large hospitals. Rotaviruses were genotyped by RT-PCR with regard to their outer capsid proteins VP4 and VP7.

Results: Genotyping of 2421 rotaviruses showed that after a marked increase in G9P[8] (32.1%) during the 2014e2015 season, G9P[8] became the predominant genotype during the 2015e2016 and 2016e2017 seasons with detection rates of 64.1% and 77.3%, respectively, whereas G1P[8] were detected at low rates of 16.8% and 6.6%, respectively. Phylogenetic analysis of the partial rotavirus VP7 and VP4 coding genes revealed that all of these G9P [8] strains belonged to the lineage III and the P [8]-3 lineage, respectively, and shared the same genetic background (G9-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1) as did most of previously detected G9P[8] strains and particularly the emerging G9P[8] strains from the 2004e2005 season in France.

Conclusions: G9P[8] rotaviruses have become the predominant circulating genotype for the first time since their emergence a decade ago. In the absence of rotavirus immunization programmes in France, our data give an insight into the natural fluctuation of rotavirus genotypes in a non-vaccinated population and provide a base line for a better interpretation of data in European countries with routine rotavirus vaccination

3/ Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017

An early increase in outbreaks of norovirus gastroenteritis characterised at the French National Reference Centre occurred this winter season. They were concurrent with an unusual pattern of circulating strains, with three predominant genotypes: the re-emergent variant GII.P4 2009-GII.4 2012

found in 28% of norovirus outbreaks and two new emergent recombinant strains GII.P16-GII.4 2012 and GII.P16-GII.2 never before observed in France, found in 24% and 14% of norovirus outbreaks, respectively.

6.1.4 Investigation d'épidémies d'origine alimentaire ou hydrique (abstracts)

Au cours de l'année 2017, le CNRvge a publié 2 études épidémiologiques portant sur :

- une large épidémie à norovirus dans l'armée française déployée en République Centre Afrique
- une épidémie liée à des aliments contaminés par un norovirus GII.17 dans l'armée en France

1/ Challenging investigation of a norovirus foodborne disease outbreak during a military deployment in Central African Republic

In January 2016, a large-scale outbreak of acute gastroenteritis was reported among French armed forces deployed in the Central African Republic. Challenging investigations, conducted from France, made it possible to identify a norovirus genogroup II in both stool and food samples, confirming a norovirus foodborne disease outbreak. Infected food handler management is discussed.

2/ Norovirus GII.17 Outbreak Linked to an Infected Post-Symptomatic Food Worker in a French Military Unit Located in France

In February 2016, an outbreak of gastroenteritis occurred in a French military unit located in Poitiers, France. Attack rate was of 34% (103/300). A case-control study identified association between illness and cake consumption. Stool samples were tested positive for Norovirus GII.17 for one patient and one post-symptomatic food worker (FW). The FW presented vomiting one day before cake preparation. The NoV strain was probably spread through food worker hand contact. Prevention of Norovirus foodborne outbreaks implies new guidelines for FWs management in France and Europe.

6.1.5 Détection des virus entériques dans l'environnement (abstracts)

Au cours de l'année 2017, le CNRvge a publié 2 études environnementales portant sur :

- la détection d'Aichi virus de génotype B dans les lignes de retraitement des eaux en Tunisie
- l'évaluation de 2 RT-qPCR triplex pour la quantification des virus entériques dans l'environnement

1/ Detection of Aichi virus genotype B in two lines of wastewater treatment processes

Enteric viruses are released in important quantities into the environment where they can persist for a very long time. At very low doses, they can cause human gastroenteritis, and are responsible for a substantial number of waterborne diseases. The aims of this study were multiple: firstly, to study the circulation of Aichi viruses (AiV) in wastewater sampled at the scale of a pilot wastewater treatment plant; secondly, to evaluate the performance of two wastewater treatment procedures, as natural oxidizing lagoons and rotating Biodisks, concerning the AiV removal; and finally, to determine the different type of AiV genotype found during this study. Hence, the pilot wastewater treatment plant is principally irrigated by the wastewater of three neighbouring clinics. Wastewater samples were collected during 2011 from the two lines of biological treatment procedures. AiV detection in wastewater were achieved using the Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) technique, and the identification of AiV genotype was realized by the direct sequencing of PCR products. The result revealed that AiV strains were identified in 50% (n = 51) of the wastewater samples. A significant increase of the AiV detection frequency was registered from upstream to downstream of the five ponds constituting the natural oxidizing lagoon process, and at the exit of the rotating Biodisks procedure. All detected AiV strains showed the highest nucleotide sequence identity to genotype B that has been recently observed in patients in Asia. This finding represented the first Tunisian survey that revealed and mentioned the first detection of AiV genotype B in sewage and by the same argued for a noticeable resistance or survival of this type of virus in the two lines of treatment considered.

2/ Evaluation of Two Triplex One-Step qRT-PCR Assays for the Quantification of Human Enteric Viruses in Environmental Samples

Human enteric viruses are responsible for waterborne and shellfish-associated disease outbreaks worldwide. Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR) is often used to assess the health risks

associated with shellfish and environmental water, but viral titres in sediments are less commonly investigated. In this study, we developed and validated two multiplex qRT-PCR assays for aquatic sediment and shellfish samples targeting viruses that are a common cause of gastroenteritis (norovirus GI, GII and hepatitis A virus), two emerging viruses (sapovirus and hepatitis E virus), along with mengovirus (MgV), which is often used as a sample process control for the assessment of RNA extraction efficiency. Singleplex and multiplex assays demonstrated comparable PCR efficiencies and gave reliable results over a wide concentration range. The multiplex assays showed remarkable sensitivity with a limit of detection of 1 RNA copy/ μ L nucleic acid extract for all target viruses and limits of quantification of 3-18 RNA copies/ μ L for the targeted human pathogenic viruses and 20-40 RNA copies/ μ L for MgV. The results demonstrated the veracity of multiplex qRT-PCR for the estimation of viral titres in sediment and shellfish, allowing the rapid assessment of viral infection risks associated with environments exposed to wastewater contamination.

6.1.6 Recherche fondamentale sur les virus entériques (abstracts)

Au cours de l'année 2017, le CNRvge a publié 2 études fondamentales portant sur :

- la détection et la quantification des VLP de norovirus par nanotechnologie
- les interactions du norovirus murin MNV avec les radeaux lipidiques (DRM)

1/ A Biocatalytic Nanomaterial for the Label-Free Detection of Virus-Like Particles

The design of nanomaterials that are capable of specific and sensitive biomolecular recognition is an on-going challenge in the chemical and biochemical sciences. A number of sophisticated artificial systems have been designed to specifically recognize a variety of targets. However, methods based on natural biomolecular detection systems using antibodies are often superior. Besides greater affinity and selectivity, antibodies can be easily coupled to enzymatic systems that act as signal amplifiers, thus permitting impressively low detection limits. The possibility to translate this concept to artificial recognition systems remains limited due to design incompatibilities. Here we describe the synthesis of a synthetic nanomaterial capable of specific biomolecular detection by using an internal biocatalytic colorimetric detection and amplification system. The design of this nanomaterial relies on the ability to accurately grow hybrid protein-organosilica layers at the surface of silica nanoparticles. The method allows for label-free detection and quantification of targets at picomolar concentrations.

2/ HS-AFM and SERS Analysis of Murine Norovirus Infection: Involvement of the Lipid Rafts

Studies on human norovirus are severely hampered by the absence of a cell culture system until the discovery of murine norovirus (MNV). The cell membrane domains called lipid rafts have been defined as a port of entry for viruses. This study is conducted to investigate murine norovirus binding on the mouse leukemic monocyte macrophage cell line. Lipid raft related structures are extracted from cells by detergent treatment resulting detergent-resistant membrane (DRMs) domains. The real-time polymerase chain reaction technique is performed to detect the viral genome, thereby the MNV binding on the DRMs. The interactions between MNV and DRMs are investigated by high-speed atomic force microscopy (HS-AFM) combined with surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). The inoculation of the virus onto cells results in the aggregations of detergent-resistant membrane domains significantly. The characteristic Raman band of MNV is found in inoculated samples. To be sure that these results are originated from specific interactions between DRM and MNV, methyl- β -cyclo-dextrin (M β CD) is applied to disrupt lipid rafts. The MNV binding on DRMs is precluded by the M β CD treatment. The cholesterol chains are defined as a key factor in the interactions between norovirus and DRMs. The authors conclude that the MNV binding involves the presence of DRMs and cholesterol dependent.

6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2017)

6.2.1 Publications nationales

1. **A de Rougemont, G Belliot.** 90-55-0068-A - Norovirus. In *Encyclopédie Médico-Chirurgicale – Biologie Médicale*. Editions Elsevier-Masson.

6.2.2 Publications internationales

1. Rivière, M ; Baroux, N ; Bousquet, V ; **Ambert-Balay, K** ; Beaudeau, P ; Jourdan-Da Silva, N ; Van Cauteren, D ; Bounoure, F ; Cahuzac, F ; Blanchon, T ; Prazuck, T ; Turbelin, C ; Hanslik, T. Secular trends in incidence of acute gastroenteritis in general practice, France, 1991 to 2015. *Euro Surveill*, 2017, 22.
2. **Kaplon, J ; Grangier, N** ; Pillet, S ; Minoui-Tran, A ; Vabret, A ; Wilhelm, N ; Prieur, N ; Lazrek, M ; Alain, S ; Mekki, Y ; Foulongne, V ; Guinard, J ; Avettand-Fenoel, V ; Schnuriger, A ; Beby-Defaux, A ; Lagathu, G ; **Pothier, P ; de Rougemont, A**. Predominance of G9P[8] rotavirus strains throughout France, 2014-2017. *Clin Microbiol Infect*, 2017.
3. Lagare, A ; Moumouni, A ; **Kaplon, J** ; Langendorf, C ; **Pothier, P** ; Grais, RF ; Issaka, B ; Page, AL. Diagnostic accuracy of VIKIA® Rota-Adeno and Premier? Rotaclone® tests for the detection of rotavirus in Niger. *BMC Res Notes*, 2017, 10, 505.
4. Gaspard, P ; **Pothier, P** ; Roth, C ; Larocca, S ; Heck, B ; **Ambert-Balay, K** , Viral prevalence and laboratory investigations of gastroenteritis in institutions for dependent people., *Med Mal Infect*, 2017, 47, 546-553.
5. Watier-Grillot, S ; Boni, M ; Tong, C ; Renoult, PA ; Fournier, A ; Joie, L ; Mérens, A ; Chesnay, A ; Perelle, S ; Fraisse, A ; **Ambert-Balay, K** ; Chal, D ; Larréché, S ; Michel, R ; de Santi, VP. Challenging Investigation of a Norovirus Foodborne Disease Outbreak During a Military Deployment in Central African Republic. *Food Environ Virol*, 2017, 9, 498-501.
6. **Bidalot, M ; Théry, L ; Kaplon, J ; De Rougemont, A ; Ambert-Balay, K**. Emergence of new recombinant noroviruses GII.p16-GII.4 and GII.p16-GII.2, France, winter 2016 to 2017. *Euro Surveill*, 2017, 22.
7. Sykora, S ; Corroero, MR ; Moridi, N ; **Belliot, G ; Pothier, P** ; Dudal, Y ; Corvini, PF ; Shahgaldian, P. A Biocatalytic Nanomaterial for the Label-Free Detection of Virus-Like Particles. *Chembiochem*, 2017, 18, 996-1000
8. Aybeke, EN ; **Belliot, G** ; Lemaire-Ewing, S ; **Estienney, M** ; Lacroute, Y ; **Pothier, P** ; Bourillot, E ; Lesniewska, E. HS-AFM and SERS Analysis of Murine Norovirus Infection: Involvement of the Lipid Rafts. *Small*, 2017, 13.
9. Sanchez, MA ; Corcostégui, SP ; De Broucker, CA ; Cabre, O ; Watier-Grillot, S ; Perelle, S ; **Ambert-Balay, K** ; Pommier de Santi, V. Norovirus GII.17 Outbreak Linked to an Infected Post-Symptomatic Food Worker in a French Military Unit Located in France. *Food Environ Virol*, 2017, 9, 234-237
10. Ibrahim, C ; Hammami, S ; Mejri, S ; Mehri, I ; **Pothier, P** ; Hassen, A. Detection of Aichi virus genotype B in two lines of wastewater treatment processes. *Microb Pathog*, 2017, 109, 305-312.
11. Farkas, K ; Peters, DE ; McDonald, JE ; **de Rougemont, A** ; Malham, SK ; Jones, DL. Evaluation of Two Triplex One-Step qRT-PCR Assays for the Quantification of Human Enteric Viruses in Environmental Samples. *Food Environ Virol*, 2017, 9, 342-349

6.2.3 Communications nationales

1. V Bellet, H Marini, L Guet, C Amant, S Caltot, K Kerleau, V Lemée, I Roland, **A de Rougemont, K Balay, V Merle**. Gestion d'une épidémie de 151 cas de gastro-entérite aiguë dans un établissement psychiatrique. 28ème Congrès de la Société Française d'Hygiène Hospitalière, Nice, juin 2017.

7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX, INDUSTRIELS

7.1. COOPÉRATIONS STRUCTURELLES DANS LE CADRE DE NOS ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE ET D'ALERTE

IFREMER - Centre de Nantes (Dr Françoise LE GUYADER) : laboratoire de référence pour les virus entériques dans les **produits de la mer**. Nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).

ANSES – Unité de virologie des Aliments et de l'eau, Laboratoire de sécurité des aliments, Maisons Alfort (Dr Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour **l'eau et les aliments**. Nous collaborons avec ce laboratoire pour tous les cas groupés de gastro-entérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).

ANSES - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy, 40, Rue Lionnois F-54000 NANCY (Dr Benoît GASSILLOUD).

7.2. COOPÉRATIONS DANS LE CADRE DE PROJETS DE RECHERCHE

7.2.1 Coopérations universitaires

Depuis 2016, l'équipe de recherche du CNRVge est intégrée à l'équipe « **Procédés Microbiologiques et Biotechnologiques** » à **L'Unité Mixte de Recherche « Procédés Alimentaires et Microbiologiques » (UMR PAM)**, placée sous la gestion conjointe d'AgroSup Dijon et de l'Université de Bourgogne. Fondée le 1^{er} janvier 2012, elle est constituée de 3 équipes : **PMB, PAV (« Physico-Chimie de l'Aliment et du Vin »)**, et **VALMIS (« Vin-ALiment-Microbiologie-Stress »)**. Elle est installée sur 4 sites : AgroSup Dijon, l'IUVV, l'INRA et l'UFR des Sciences de Santé. L'UMR PAM est un acteur majeur du progrès scientifique et technologique dans le domaine des aliments et du vin. Les travaux conduits par l'équipe PMB s'affichent dans le cadre « santé et alimentation » et sont tournés vers le monde de l'industrie. Ils ont pour finalité l'amélioration de la qualité de la nutrition en élaborant de nouveaux produits ou procédés à partir de microorganismes, et l'évaluation des risques que posent les virus dans l'alimentation (sécurité alimentaire). À cette fin, l'activité de recherche est centrée sur la maîtrise de l'activité et de la fonctionnalité de microorganismes soumis à différents types de perturbations environnementales d'amplitude et de cinétique variés. Nos travaux sont surtout axés sur les norovirus et leur éradication suivant les conclusions du *Codex alimentarius* de 2012.

Notre équipe participe à l'étude du pouvoir pathogène des virus persistants dans l'environnement et les facteurs de stress qui y sont associés et sur l'optimisation de leur destruction au cours de traitements technologiques tout aussi bien applicable dans les secteurs de l'agro-alimentaire, de l'hygiène et de la clinique. Les travaux mettent en œuvre des stratégies et des outils performants et adaptés à cette approche dont des outils moléculaires de détection, de caractérisation et de quantification des virus dans l'environnement et différents types de matrices ; la production et la purification d'antigène et de particule de synthèse en système bactérien et en baculovirus ; ou encore la génétique inverse, la mutagenèse et l'expression de gènes.

7.2.2 Projets

Projet européen OXYVIR

Le CNRVge participe depuis de 2017 au projet OXYVIR subventionné par le Fond Européen pour les Affaires Maritimes et la Pêche (FEAMP) sur 3 ans. Ce projet OXYVIR porte sur la survie des norovirus et l'étude de leur pouvoir infectieux en conchyliculture et en particulier en ostréiculture. Dans le cadre de ce projet, le CNRVge apporte son expertise scientifique et technologique sur les norovirus et l'utilisation de particules virales de synthèse (VLP). Les membres du consortium sont les suivants : ACTALIA (Saint Lô, association Loi 1901), le Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement (UMR 7564, Université de Lorraine, Nancy), le Laboratoire de Chimie et Physique des milieux complexes (Université de Lorraine, Metz), Spéciales GILLARDEAU (entreprise conchylicole) et le Pôle de compétitivité AQUIMER (Boulogne sur mer).

7.2.3 Collaboration industrielle avec la société bioMérieux

Depuis 2010, le CNR collabore avec bioMérieux pour la mise au point d'un test rapide d'immunochromatographie pour la détection des norovirus. Ce test a été mis sur le marché en 28 novembre 2016 et permet la détection simultanée des norovirus, rotavirus et adénovirus (<http://www.biomerieux-diagnostics.com/bionexia-noro-rota-adeno-rapid-test>). La collaboration est continue et consiste en l'évaluation et la modification éventuelle du kit en fonction de l'émergence de nouvelles souches (p. ex. les NoV GII.17) ou la fourniture de VLP de norovirus pour le contrôle qualité.

7.2.4 Conclusion sur nos coopérations

Nos activités de surveillance nous ont conduites à collaborer régulièrement avec l'IFREMER et l'ANSES. Nos participations à des contrats de recherche, ANR ou autres nous ont permis de collaborer avec d'autres laboratoires avec lesquels nous avons conservé des contacts.

Parallèlement à ce réseau national, nous avons recherché à mieux insérer notre CNR dans le contexte scientifique local travaillant dans les domaines de la microbiologie alimentaire ou de l'environnement. Ainsi, notre collaboration avec l'UMR PAM (Pr. Laurent BENEY) a été soutenue par la Région Bourgogne.

8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR LES ANNÉES SUIVANTES

8.1. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

8.1.1 Évaluation de trousse de diagnostic

Diagnostic des norovirus

Nous poursuivrons notre **évaluation des nouvelles trousse de diagnostic par immuno-chromatographie (ICG) et de diagnostic moléculaire**. Les évaluations que nous pratiquons montrent une amélioration de la sensibilité, néanmoins les firmes poursuivent le développement et l'amélioration de ces trousse car la sensibilité n'est pas encore satisfaisante.

Diagnostic de rotavirus

Contrairement au diagnostic des norovirus, les méthodes d'immunochromatographie sont très satisfaisantes en termes de sensibilité. Nous poursuivons cette veille, notamment avec l'arrivée de trousse ICG « triplex noro-rota-adeno » et développerons des évaluations des trousse de diagnostic par biologie moléculaire. Néanmoins, nous envisageons l'évaluation de ces tests chez le nouveau-né et le prématuré en réanimation pédiatrique. Face à un nombre important de faux positifs, cette étude visera à déterminer la pertinence et les limites des tests ICG chez des enfants ayant une immaturité du système digestif.

Diagnostic des pathogènes entériques

Plusieurs fournisseurs développent une **approche « syndromique »** du diagnostic en recherchant tous les pathogènes entériques en une seule analyse. Outre l'aspect technique de ces réactifs, nous évaluons l'aspect stratégique de leur utilisation afin de définir et limiter les indications de ces réactifs coûteux.

8.1.2 Développement de techniques

Transferts technologiques et développement du NGS

Fort de nos collaborations, nous avons entrepris une démarche de développement du **séquençage haut débit (Next Génération Sequencing)** pour la détection des virus entériques dans les selles à l'aide de la technologie Illumina sur MiSeq®/NextSeq®. Nos tests préliminaires se sont portés sur notre capacité à détecter et séquencer les génomes de norovirus et de rotavirus issus de notre biobanque et cultures. À terme, nous prévoyons la possibilité de d'amplifier les génomes de la majorité des virus entériques à génome ARN simple ou double brin.

Amélioration des techniques de quantification des virus entériques dans les selles

Ces techniques quantitatives s'appuient sur l'utilisation systématique de gammes ARN des virus cibles afin d'en déterminer la charge dans les selles. La synthèse des ARN à partir de plasmide pour l'élaboration des gammes est effectuée au laboratoire.

Développement de l'étude des constellations de gènes de rotavirus

Cette technique actuellement en notre possession permet d'étudier l'ensemble des 11 gènes de rotavirus et de mettre en évidence des recombinaisons. Cette approche est importante lorsqu'il s'agit de comparer un rotavirus à une souche vaccinale lors de gastro-entérites aiguës post-vaccinales. Elle sera généralisée à un plus grand nombre d'échantillons au cours de l'année.

Détection de nouveaux virus impliqués ou suspectés dans les gastro-entérites humaines

Nous avons développé une technique de détection des nouveaux astrovirus recombinants appartenant aux clades MLB et VA. Ces astrovirus pourraient représenter près d'un quart des gastro-entérites à astrovirus chez l'homme. Ces virus sont également pourvoyeurs d'infections neurologiques sévères lors de complications. L'évaluation de ces techniques est en cours et une étude épidémiologique prospective suivra.

D'autres virus, plus exotiques, peuvent être impliqués dans les GEA : deux nouveaux genres de *Piriconaviridae* : les cosavirus et les salivirus, et un nouveau *Protoparvoviridae*, le bufavirus. Nous possédons déjà une bonne expérience dans la détection de ces virus et l'évaluation de leur prévalence dans la population pédiatrique est en cours.

8.1.3 Mode de constitution, de stockage et mise à disposition des collections

Constitution et stockage

Nos collections comprennent des souches virales pour les virus cultivant sur cellules, des échantillons de selle comprenant des virus caractérisés, des gènes clonés et des pseudo- particules virales (VLP), des anticorps monoclonaux spécifiques des norovirus et rotavirus. Cette collection constituée depuis 2002 comprend l'ensemble des virus responsables de gastro-entérites connus et la plupart des génotypes de ceux-ci.

Cette collection est anonyme pour ce qui concerne les échantillons de selle. Cette collection est conservée dans le **Centre de Ressources Biologiques (CRB) Ferdinand-Cabanne** (www.crbferdinandcabanne.fr) dont le numéro d'accréditation est **BB-0033-00044**. Une petite partie, nécessaire pour notre activité quotidienne, est conservée en miroir sous forme d'aliquotes dans les enceintes froides à -40°C ou -80°C.

Mise à disposition des collections

Les souches caractérisées, les VLP et les anticorps sont conservés au sein du CNR et du CRB microbiologique du CHU de Dijon. Tous les produits ou souches d'intérêt pour le diagnostic biologique de routine des gastro-entérites virales sont disponibles pour les laboratoires d'analyses médicales y compris les laboratoires privés.

Tous les produits ou souches d'intérêt scientifique sont disponibles pour les laboratoires de recherche académique selon les conditions habituelles, c'est-à-dire après signature d'un « *Material Transfert Agreement* » entre notre établissement et les demandeurs.

Tous les produits ou souches d'intérêt de notre collection sont disponibles pour les sociétés privées dans le cadre d'un contrat entre notre établissement et ces sociétés.

Toutes les séquences génomiques virales d'intérêt sont à disposition de nos collègues des réseaux « NoroNet » et « EuroRotaNet ». Certaines de ces séquences sont incluses dans des banques de données accessibles à tous comme GenBank.

8.1.4 Travaux d'évaluation de techniques

Collaborations industrielles

Durant le précédent contrat, nous avons établi des relations privilégiées avec les industriels fabriquant les réactifs de diagnostic des virus responsables de gastro-entérites, principalement BioMérieux et Coris Bioconcept mais également R-Biopharm, Operon, Diasorin, Diagenode, Certest Biotc et Mobidiag. Ces laboratoires nous demandent régulièrement d'évaluer leurs nouveaux réactifs ou les modifications apportées à leur trousse de détection. Notre collection complète tant pour les norovirus et les rotavirus que pour les virus plus rares nous permet d'évaluer les réactifs vis-à-vis de ces virus et de disposer d'un échantillon représentatif des virus circulant dans les différentes classes d'âge de la population. Ces éléments associés à une standardisation de nos évaluations sont toujours un atout de poids pour de futures évaluations ou collaborations avec ces industriels.

Évaluations futures

Nous poursuivrons les évaluations des nouveaux réactifs de diagnostic comme précédemment. Ces évaluations régulières nous permettent de **conseiller nos collègues biologistes dans leur choix lors des appels d'offre**.

Une nouvelle approche de diagnostic, dite « syndromique » retiendra particulièrement notre attention. Nous avons déjà évalué cette technique (réactif Biofire® de BioMérieux®) mais d'autres réactifs sont ou seront prochainement sur le marché. Outre l'évaluation des performances de ces réactifs, il nous conviendra d'en définir l'utilisation. En effet, le coût élevé de ces test, environ 140 euros par analyse, obligera les biologistes à en cibler les indications. Outre les caractéristiques virologiques des virus des échantillons, nos panels d'évaluation tiendront compte des caractéristiques cliniques et épidémiologiques (patients immunodéprimés, enfants, personnes âgées en institution, etc..).

8.1.5 Projets de transferts de techniques vers d'autres laboratoires

Des réactifs pour le diagnostic des norovirus et des rotavirus étant commercialisés, les demandes de transfert de techniques de diagnostic pour ces virus se posent donc rarement. Néanmoins, **nos procédures sont disponibles** et nous assurerons un **soutien technique à distance**. Ces processus sont principalement adaptés aux virus moins fréquents comme les virus Aichi et les Sapovirus.

La demande la plus fréquente émane des laboratoires pour la **fourniture de témoins positifs**. Nous disposons à cet effet d'un stock d'échantillons de selle dont le virus est parfaitement caractérisé. En collaboration avec l'ANSM nous avons élaboré un contrôle externe des tests rapides par immunochromatographie des rotavirus. L'ANSM s'était chargée de la distribution de ces préparations aux laboratoires participant à l'évaluation de leur technique. À la demande de cette Agence, nous serions en mesure de préparer à nouveau ce type de contrôle externe pour les rotavirus. Nous avons également développé une collection d'antigènes synthétiques sous forme de VLP correspondant aux principaux génotypes de norovirus, dont les derniers variants. Ces VLP peuvent être utilisées comme contrôle externe dans les tests de détection des norovirus par immunochromatographie.

8.1.6 Recherche liées avec les missions du CNR des virus des gastro-entérites

Poursuite de la surveillance des souches de rotavirus du groupe A et de leur dérive antigénique dans un contexte vaccinal chez l'enfant grâce à l'extension du Réseau National Rotavirus vers le Sud et l'Ouest de la France. En particulier, nous nous intéresserons à l'émergence de nouveaux génotypes ainsi qu'à l'impact de la vaccination sur la sélection préférentielle de souches de rotavirus. Nous poursuivrons également l'étude de la relation entre HBGA (antigènes tissulaires de groupes sanguins) et rotavirus, et pour laquelle nous avons acquis une solide expérience au CNR.

Surveillance des souches de norovirus épidémiques et l'émergence de nouveaux variants/génotypes dans la population. Nous évaluerons la capacité épidémique des souches qui pourraient émerger et leur fixation aux HBGA (antigènes tissulaires de groupes sanguins), ligands naturels des norovirus. Établissement des profils d'interaction et d'affinité des nouveaux variants épidémiques GII.4 et GII.17 avec les HBGA sur des salives phénotypées et par résonance plasmonique de surface.

Évaluation de la circulation et de la prévalence des infections aux nouveaux astrovirus recombinants MLB et VA dans la population pédiatrique française. D'après la littérature, ces virus représenteraient près de 25% des cas de gastro-entérites à astrovirus chez l'homme. Ces virus, issus d'une recombinaison entre astrovirus humains et animaux, auraient également un tropisme neurologique, en particulier la souche MLB1.

Étude de prévalence chez l'enfant de moins de 5 ans des infections entériques à cosavirus, salivirus et bufavirus. Cette étude vise à évaluer la circulation et le pouvoir pathogène de ces virus. Les objectifs seront d'évaluer les prévalences respectives dans les selles d'enfants diarrhéiques et non-diarrhéiques (600 sujets) ; établir la corrélation clinico-biologique ; et déterminer les génotypes circulants (analyse phylogénétique)

Étude du microbiote intestinal chez les personnes âgées ayant présenté une GEA à norovirus. Les personnes âgées qui ont une diminution de la biodiversité de leur microbiote intestinal pourraient être plus vulnérables aux infections à norovirus et à leurs conséquences post-infectieuses. Les objectifs seront de déterminer les éléments du microbiote qui pourraient prédire la survenue et/ou la sévérité d'une infection à norovirus ; d'évaluer les conséquences des infections gastro-intestinales à norovirus sur la composition du microbiote intestinal chez les personnes âgées en EHPAD.

Étude virologique des infections à norovirus chez les patients allogreffes de moelle (collaboration avec l'APHP). Ces patients immunodéprimés infectés par le norovirus ont la particularité de présenter une excrétion virale au long cours avec des épisodes itératifs de diarrhée sévère. La réplication intense du virus dans les cellules intestinales pourrait être à l'origine d'une diversification génétique et antigénique de souche et participer à la pérennisation de l'infection ou être source de nouvelles infections.

Étude de séroprévalence des bufavirus dans la population française. À l'aide de VLP de bufavirus, nous effectuerons des analyses de séroprévalence sur les sérums de 700 sujets répartis en 7 tranches d'âges de 0 à 100 ans afin d'évaluer le taux d'exposition de la population.

Expression des HBGA et réponse Th1/Th17 au cours de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) : rôle des norovirus. À ce jour, aucune évaluation histopathologique de l'expression tissulaire des ligands des norovirus (HBGA) n'a été conduite chez des patients porteurs de MICI. Très peu d'études sur la distribution in situ des sous-populations lymphocytaires lors d'une phase active de MICI ont été conduites. Les interactions norovirus-hôte en fonction des profils génétiques de FUT2 et FUT3 dans le cadre de MICI restent également à étudier. L'objectif principal de l'étude sera de déterminer les liens éventuels des HBGA et de l'infection par les norovirus chez les patients souffrant de MICI. Le projet s'articulera en plusieurs volets : analyser le niveau d'expression des HBGA au niveau de la surface des entérocytes, chez des patients atteints de MICI ; analyser la capacité de liaison des norovirus au niveau de la surface des entérocytes de patients souffrant de MICI ; analyser la répartition tissulaire des sous-populations lymphocytaires Th1 et Th17 au niveau de la surface des entérocytes de patients atteints de MICI ; et réaliser sur tissu intestinal un phénotypage et génotypage des gènes FUT2 et FUT3.

Développement d'une méthode technico-économique réaliste pour estimer le danger lié aux norovirus humains dans les aliments à risque (collaboration industrielle). Étude des modifications physico-chimiques des VLP de norovirus (GII.4, autres) en suspension au cours de l'inactivation par oxydation (chlore ou ozone) et par la température (50-60°C) : évaluation de l'impact sur la charge globale, l'hydrophobie, la reconnaissance et l'affinité pour les HBGA ; étude des modifications des VLP de norovirus adhérents sur une matrice de type végétaux frais au cours de l'inactivation par oxydation (chlore ou ozone) et par la température (50-60°C) : évaluation de l'impact sur la charge globale, l'hydrophobie, la reconnaissance et l'affinité pour les HBGA après extraction des virus par « élution - concentration » selon la méthode ISO 15216.

8.2. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

8.2.1 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à rotavirus

La surveillance des gastro-entérites infantiles sera poursuivie avec les 18 centres métropolitains. Nous tenterons d'impliquer des centres d'Outre-Mer, nos actions ont commencé en 2013 dans l'île de la Réunion. La poursuite de cette surveillance est importante et elle s'intègre dans une surveillance plus large, au niveau européen avec notre participation au réseau EuroRotaNet. Par ailleurs, nos collaborations avec nos **partenaires d'Afrique** seront poursuivies afin de mieux surveiller les souches en capacité d'émergence en France.

8.2.2 Surveillance épidémiologique des gastro-entérites à norovirus

La surveillance des souches de norovirus et l'étude de leur évolution reste un de nos objectifs prioritaires pour 2018. Notre collaboration avec les délégations territoriales des ARS et des CIRE nous permettent de recevoir les épidémies qui surviennent sur l'ensemble de la Métropole. Nous poursuivons nos **partenariats traditionnels** comme l'IFREMER, l'ANSES et les autres CNR, mais également avec **d'autres instituts** tels que l'INRA, AgroSup, ADRIA pour des recherches plus ponctuelles sur l'environnement ou la contamination des aliments.

8.3. CONTRIBUTION À L'ALERTE

Les procédures d'alerte seront poursuivies selon une procédure formalisée et actualisée. Tous événements apparaissant anormal ou nécessitant une discussion avec les épidémiologistes sont transmis à SPF via nos contacts. Les alertes européennes concernant les risques alimentaires sont diffusées par internet par le réseau FBVE-Net. SPF, ANSES et IFREMER sont également informées et par les mêmes voies que notre CNR.

8.4. ACTIVITÉ D'INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL

8.4.1 Modalités de diffusion de l'information et des résultats

Le site internet est pour nous un moyen de communication ou d'information important. Il détaille les conditions de prélèvements de selles, de leur conservation et de leur acheminement au CNR (www.cnr-ve.org). L'évolution du site internet pour les prochaines années concernera le développement d'un **serveur sécurisée des résultats** qui permettra de réduire les délais de rendus et d'échange avec nos partenaires.

8.4.2 Collaboration/expertises auprès d'instances nationales ou internationales

Comme par le passé, le CNR des virus des gastro-entérites apportera son aide ou ses conseils aux établissements publics, aux établissements de soins ou d'hébergement (publics ou privés), aux administrations qui lui en feraient la demande. Sous certaines conditions, nos conseils peuvent être dispensés aux entreprises privées.

8.4.3 Activité de formation

L'activité de formation se fera essentiellement par l'accueil et l'encadrement de stagiaires, la mise en place de conférences et/ou séminaires ainsi que via des enseignements postuniversitaires et des publications didactiques ou de vulgarisation.