

Rapport annuel d'activité

2022

Centre National de Référence
virus des gastro-entérites

Année d'exercice
2021



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 Dijon Bourgogne. Le CNRvge y bénéficie d'une autonomie administrative (UF 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 dans ses missions en 2017 et son responsable est le Professeur Alexis de ROUGEMONT. Les activités de diagnostic et de recherche du CNRvge reposent sur 0,9 ETP de biologistes médicaux, 1,4 ETP de biologistes scientifiques, 2,9 ETP de techniciens et 0,8 ETP de secrétaire.

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 et les norovirus; *ii)* trois groupes de patients sont principalement concernés : 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 2021

Dans ce contexte, le CNRvge a concentré ses actions autour de 3 axes principaux et 1 axe complémentaire : *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

- **investigations virologiques chez 275 patients immunodéprimés.** Nous apportons notre expertise dans le diagnostic et le suivi de ces patients.
- **expertises virologiques de 464 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).
- **détection systématique du coronavirus SARS-CoV-2 dans les selles** (selon DPS de l'ANSM) : **1155 selles investiguées (2,0% de positifs).**

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 2020-2021 est la prépondérance des G9P[8] (43,4%), forte poussée des G2P[4] (23,1%) et régression des génotypes G3P[8] (14,3%) et G12P[8] (2,3%).** Le génotype G1P[8], peu fréquent cette saison (11,7%), 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.

- les points majeurs de la saison de surveillance a été la **prépondérance du variant recombinant GII.4 Sydney[P16] (28,7%) et du GII.2[P16] (21,8%)**
- **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 et les collaborations du CNRvge ont fait l'objet de 8 **publications internationales.**

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 its missions in 2017 and its head is Prof. Alexis de ROUGEMONT, MD PhD. The diagnostic and research activities of the NRCgev are based on 0.9 FTE of medical biologists, 1.4 FTE of scientific biologists, 2.9 FTE of technicians and 0.8 FTE of secretary.

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 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 2021

In this context, the NRCgev has focused its actions around 3 main axes: *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

- **Virological investigations in 275 immunocompromised patients.** We bring our expertise in the diagnosis and follow-up of these patients
- **Virological expertise of 464 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).
- **Systematic detection of the SARS-CoV-2 coronavirus in stool** (according to ANSM DPS): **1155 stools investigated (2.0% positives).**

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 2020-2021 season is the preponderance of G9P[8] strains (43.4%), increases in G2P[4] genotype (23.1%) and regression of G3P[8] (14.3%) and G12P[8] (2.3%) genotypes.** The G1P[8] genotype, less frequent this season (11.7%), 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 (2020-2021) showed the preponderance of the **GII.4 Sydney[P16] (28.7%) and GII.2[P16] (21.8%)**
- **norovirus outbreaks remain a significant burden for nursing homes** which would need to be evaluated on a medico-economic level.

IV. SCIENTIFIC REPORT

The NRCgev and collaboration research works led to **8 international publications.**

SOMMAIRE

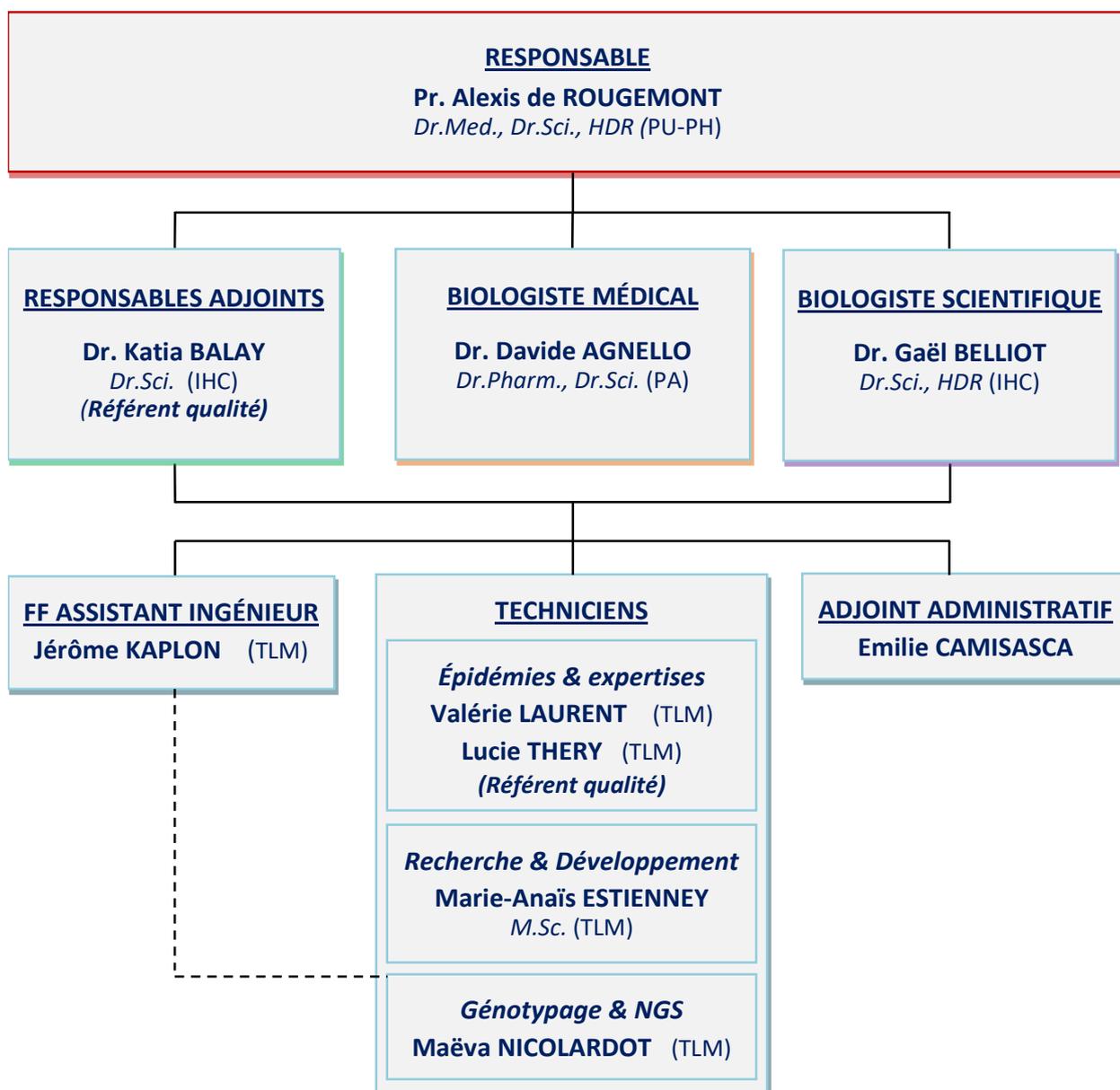
1. MISSIONS ET ORGANISATION DU CNR	1
2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE	2
2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR	2
2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES	2
2.3 TRANSFERT DES TECHNIQUES À D'AUTRES LABORATOIRES	2
2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES	2
2.5 ACTIVITÉS D'EXPERTISE DU CNR EN 2018	3
2.5.1 Investigations virologiques des épidémies de cas groupés	3
2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal	6
2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques	6
2.5.4 Délai de restitution des résultats	9
2.5.5 Activité de diagnostic de SARS-CoV-2 dans les selles	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 2017-2018	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	23
4. ALERTE	24
4.1 CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC SANTE PUBLIQUE FRANCE (SPF)	24
4.2 PROCÉDURES D'ALERTE DE SPF ET DES AUTRES PARTENAIRES	24
4.2.1 Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...)	24
4.2.2 Arrivée de prélèvements sans annonce préalable	24
4.3 DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE	24
4.3.1 Transmission des données à SPF Voozanoo	24
4.3.2 Anonymisation des prélèvements	24
5. ACTIVITÉS DE RETRO-INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	29
5.1 CONSEIL ET EXPERTISE AUX PROFESSIONNELS DE SANTÉ	29
5.1.1 Site internet « www.cnr-ve.org »	29
5.1.2 Activité de formation	29
5.1.3 Activité de conseil aux professionnels de santé	29
5.2 CONSEIL ET EXPERTISE AUX AUTORITÉS SANITAIRES	29
6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR	25

6.1 ACTIVITÉS DE RECHERCHE DU CNR EN COURS POUR 2021	26
6.1.1 Études en cours non publiées	26
6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie	27
6.1.3 Études épidémiologiques (<i>abstracts</i>)	30
6.1.4 Recherche fondamentale sur les virus entériques (<i>abstracts</i>)	31
6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2018)	33
6.2.1 Publications internationales	33
6.2.2 Publications nationales et chapitres d'ouvrage	34
7. COOPÉRATION AVEC LES LABORATOIRES DE SANTÉ ANIMALE, D'HYGIÈNE ALIMENTAIRE, ENVIRONNEMENTAUX, INDUSTRIELS	35
<hr/>	
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 avec l'INRA	36
7.2.4 Conclusion sur nos coopérations	36
8. PROGRAMME D'ACTIVITÉ POUR LES ANNÉES SUIVANTES	37
<hr/>	
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	40
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	41
8.3. CONTRIBUTION À L'ALERTE	41
8.4. ACTIVITÉ D'INFORMATION, FORMATION ET CONSEIL	41
8.4.1 Modalités de diffusion de l'information et des résultats	41
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 VIRUS DES GASTRO-ENTERITES

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 2017-2022. Aucune modification n'est intervenue à ce niveau en 2021.

Organigramme CNR virus des gastro-entérites (CNRvge)



2. ACTIVITÉS D'EXPERTISE

Éléments clefs de l'activité d'expertise du CNRVge en 2021 :

- délai moyen de rendu des résultats de 2,8 jours
- expertises virologiques de 119 épidémies de cas groupés : 80 souches de norovirus dont 92,0% de GII (46,0% de GII.4, majoritairement des GII.4 SydneyP[16]), et 21,6% GII.2[P16]) et 8,0% de GI.
- investigations virologiques chez 275 patients immunodéprimés : 20,8% de patients positifs et prépondérance des norovirus (47 souches).
- expertises virologiques de 464 cas sporadiques : 50,4% de patients positifs et prépondérance des norovirus (149 souches ; 96,6% de GII) et rotavirus (34 souches) .
- bilan virologique de 18 selles pour transplantation de microbiote fécal et 244 selles dans un cadre contractuel ou de partenariat.
- recherche systématique du coronavirus SARS-CoV-2 dans les selles (selon DPS de l'ANSM) : 1155 selles investiguées dont 23 positifs (2,0%).

2.1 ÉVOLUTION DES TECHNIQUES DU CNR

Outre la détection par PCR en temps réel (RT-qPCR) des astrovirus MLB-1/2/3 et VA-1/2/3/4/5 et des hépatites A et E dans les selles et autres prélèvements, nous sommes en cours de déploiement des techniques de RT-qPCR pour la détection des cosavirus et salivirus (*Picornaviridae*) et des bufavirus et tusavirus (*Parvoviridae*). Les procédures de référence disponibles pour la détection par qPCR/RT-qPCR sont détaillées dans l'annexe 2 et sur le site internet (www.cnr-ve.org).

Le développement se poursuit progressivement pour les 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 assistant ingénieur a été formé aux systèmes de bio-informatique.

2.2 TRAVAUX D'ÉVALUATION DES TECHNIQUES, RÉACTIFS ET TROUSSES

Au cours de l'année 2021, nous n'avons pas procédé à l'évaluation de nouvelles trousse. En revanche, le CNRVge a procédé à la mise en place d'EEQ norovirus pour la certification COFRAC des procédés de détection dans les laboratoires de biologie médicale publiques et privés.

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 entre autres aux principaux génotypes circulant en France, dont les derniers variants (annexe 2).

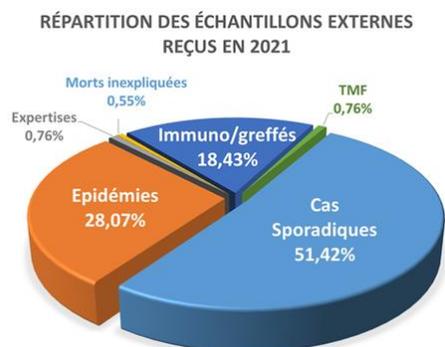
2.4 COLLECTIONS DE MATÉRIELS BIOLOGIQUES

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 avec l'acquisition d'un nouveau PSM dédié.

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 EN 2021

Au total, 1443 échantillons provenant d'épidémies groupées (28,1%), de patients immunodéprimés/greffés (18,4%), de cas sporadiques (51,4%) ou d'expertises spécifiques (2,1%) ont été analysés par le CNR en 2021.



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 2021, nous avons expertisé **119 épidémies dont 92 étaient positives** pour au moins un virus entérique soit **77,3%** (pour 89,1% d'entre elles, un norovirus était retrouvé seul ou associé à un autre virus) (Tableau 2). Si on analyse les **27 épidémies « négatives » (22,7%)**, on constate que pour 8 (29,6%) et 8 (29,6%) d'entre elles nous n'avons qu'un ou deux prélèvements, respectivement (soit dans un cas sur deux). 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 2020, Nous avons expertisé 2204 épidémies et détecté un virus pour 1794 d'entre elles soit 81,4%. Nous avons retrouvé un norovirus seul ou associé à d'autres virus pour 90,7% (1627) de ces épidémies positives.

Au total en 2021, 385 échantillons ont été analysés, soit une moyenne de $3,2 \pm 2,1$ échantillons et une médiane de 3 échantillons par épidémie :

- **92 épidémies « positives » comprenant : 310 prélèvements analysés**, soit une moyenne de $3,4 \pm 2,2$ échantillons et une médiane de 3 échantillons analysés par épidémie, dont **244 positifs**, soit une moyenne de $2,7 \pm 1,8$ positifs et une médiane de 2 positifs par épidémie,
- **27 épidémies « négatives » comprenant 75 prélèvements analysés**, soit une moyenne de $2,8 \pm 2,0$ échantillons et une médiane de 2 échantillons analysés / épidémie.
- **rapport (échantillons positifs / analysés) : 63,4%** des échantillons analysés contenaient au moins 1 virus, et 78,7% des échantillons issus des épidémies « positives » contenaient au moins 1 virus.

Tableau 2 : Tableau annuel comparatif des prélèvements analysés entre 2017 et 2021

épidémies			infections	virus							étiologie inconnue	
				NoV	SaV	RVA	AdV	AstV	AiV	EV		autres
mandat en cours	2017	237	mono : 173 mixtes : 6	155 6	3 3	12 3	2 0	1 1	0 0	0 0	- -	58 (24,5%)
	2018	184	mono : 135 mixtes : 10	119 8	8 7	7 3	1 2	0 2	0 2	0 0	- -	39 (21,2%)
	2019	214	mono : 157 mixtes : 13	144 13	2 8	6 2	4 2	1 0	0 2	0 5	- -	44 (20,6%)
	2020	112	mono : 74 mixtes : 8	70 7	0 3	3 1	0 3	0 0	0 0	1 3	- -	30 (26,8%)
	2021	119	mono : 81 mixtes : 11	72 10	0 4	3 2	3 6	2 0	0 0	0 0	1* 2*	27 (22,7%)

NoV : norovirus; SaV : sapovirus; RVA : rotavirus; AdV : adénovirus; AstV : astrovirus; AiV : virus Aichi; EV : entérovirus; *SARSCoV2

Pour 49 des 92 épidémies « positives », le nombre de prélèvements positifs correspondait exactement au nombre de prélèvements reçus au CNR. Cette proportion est globalement proche de celle observée les quatre années précédentes avec 53,2% d'adéquation contre 52,4% (2020), 47,7% (2019), 49,0% (2018) et 50,3% (2017) mais quasi similaire à la moyenne de l'ensemble de la période 2012-2020 (50,5%).

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

2021		Nombre de prélèvements analysés										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	11	Total
Nombre de prélèvements positifs	0											27
	1	19	5	5	1	1						31
	2		12	9	3	1						25
	3			7	4			1				12
	4				7	4						11
	5					0	2					2
	6						4		2	1		7
	7								2			2
	8									1	1	2
Total	19	17	21	15	6	6	1	4	2	1	92	

2/ Principales souches virales caractérisées

Les norovirus (Tableau 4)

- **87 souches de norovirus ont été caractérisées en 2021 dans 77 épidémies dont :**
 - 7 souches de NoV-GI, soit 8,0% ; **80 souches de NoV-GII, soit 92,0%**
 - pour comparaison, nous avons caractérisé 1874 souches dans 1640 épidémies dont 13,9% de NoV GI et 81,3% de NoV GII sur la période 2012-2020. Cette différence pourrait s'expliquer par le mode de transmission (hydrique, alimentaire ou de personne-à-personne).
- **le génotype GII.4 représentait 46,0% des NoV avec 40 souches** dont :
 - **25 souches GII.4 Sydney[P16]**, NoV recombinant prédominant apparu en 2016,
 - **8 souches GII.4 Sydney[P31]**, NoV recombinant apparu au début des années 2010,
 - 7 souches GII.4 Sydney 2012.
- **le génotype GII.2[P16] était en regain de circulation avec 21,6% des NoV détectés soit 19 souches.** Ce génotype a émergé et essentiellement circulé de 2016 à 2018, représentant de 3 à 10% des souches détectées, mais était rarement détecté en 2019 et 2020.
- **le génotype GII.17[P17] marque un pas dans sa circulation avec 6,9% des NoV détectés soit 6 souches** contre 22,2% en 2020, 4,4% en 2019 et 2018, et 14,6% en 2017. Il s'agit du variant GII.17 Kawasaki-308 qui avait émergé en Europe en 2016 et était devenu temporairement le génotype principal de norovirus en France.
- **les autres génotypes (22 souches) dont quelques recombinants (4 souches) associés aux génotypes GII.3 et GII.6** ont circulé sur la période avec des fréquences similaires.
- **les NoV GI ont été impliqués dans les épidémies avec une fréquence de 8,0% soit 7 souches** représentant 4 génotypes différents de GI.1, GI.3, GI.6 et GI.9 (sur les 9 appartenant au génogroupe I). **Le virus de Norwalk (GI.1) représentait 28,6% de l'ensemble des souches GI détectées** suivi du génotype GI.6 avec 28,6% des souches GI.

Les autres virus détectés en 2021 (26 souches) :

- **rotavirus : 7 souches ont été caractérisées dans 5 épidémies** (dont 2 n'étaient pas typable). Les génotypes retrouvés étaient G2P[4], G1P[8], G9P[8] et G12P[8].
- **sapovirus : 4 souches ont été caractérisées dans 4 épidémies** (toutes non typables).
- **astrovirus : 2 souches de type 1 dans 2 épidémies.**
- **adénovirus : 9 souches dont 6 types C, 1 type D** et 2 non typables dans 9 épidémies.
- **entérovirus : 1 souche non typable (Ct>37).**
- **coronavirus : 3 souches de SARS-CoV-2 dans 3 épidémies.**

Tableau 4 : Tableau récapitulatif des souches de norovirus caractérisées de 2016 à 2021.

		2016			2017			2018			2019			2020			2021		
Norovirus		GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%	GI	GII	%
Génogroupe I (GI)	GI non typable	1		0,3%	5		2,9%	4		2,5%	4		2,2%	1		1,1%	1		1,1%
	GI.1	5		1,7%	1		0,6%	12		7,5%	22		12,2%	7		7,8%	2		2,3%
	GI.2	2		0,7%	3		1,8%	5		3,1%	3		1,7%	6		6,7%			
	GI.3	5		1,7%	5		2,9%	1		0,6%	10		5,5%	2		2,2%	1		1,1%
	GI.3P[13]										2		1,1%						
	GI.4	4		1,3%	2		1,2%	8		5,0%	2		1,1%	1		1,1%			
	GI.5	4		1,3%				4		2,5%	2		1,1%						
	GI.5[P4]							1		0,6%									
	GI.6	1		0,3%	1		0,6%	4		2,5%	2		1,1%	2		2,2%	2		2,3%
	GI.6P[11]				1		0,6%	2		1,3%				1		1,1%			
	GI.7				1		0,6%	6		3,8%	1		0,6%						
GI.8																			
GI.9																	1		1,1%
Génogroupe II (GII)	GII non typable		14	4,7%		13	7,6%		4	2,5%		6	3,3%		6	6,7%		6	6,9%
	GII.1		3	1,0%														1	1,1%
	GII.2		9	3,0%		6	3,5%		3	1,9%		2	1,1%						
	GII.2[P16]		9	3,0%		12	7,1%		16	10,0%		1	0,6%		1	1,1%		19	21,8%
	GII.3		5	1,7%								2	1,1%					2	2,3%
	GII.3[P12]								1	0,6%								2	2,3%
	GII.3[P16]								1	0,6%		2	1,1%						
	GII.3[P21]		1	0,3%															
	GII.3[P30]								2	1,3%		5	2,8%					1	1,1%
	GII.4 Bristol		1	0,3%		1	0,6%												
	GII.4 Yerseke					1	0,6%												
	GII.4 Den Haag											1	0,6%						
	GII.4 New Orleans								1	0,6%		1	0,6%						
	GII.4 Sydney [P4 Hunter]								3	1,9%					3	3,3%			
	GII.4 Sydney [P4 New Orleans]		31	10,4%		24	14,1%		1	0,6%		2	1,1%		7	7,8%			
	GII.4 Sydney		37	12,5%		13	7,6%		1	0,6%		5	2,8%		3	3,3%		7	8,0%
	GII.4 Bristol[P16]								1	0,6%									
	GII.4 Sydney[P16]		14	4,7%		52	20,6%		51	31,9%		67	37,0%		16	17,8%		25	28,7%
	GII.4 Sydney[P21]								4	2,5%									
	GII.4 Sydney[P31]		4	1,3%		3	1,8%		10	6,3%		6	3,3%		2	2,2%		8	9,2%
	GII.5[P22]											1	0,6%						
	GII.6		5	1,7%		2	1,2%		1	0,6%		4	2,2%		2	2,2%			
	GII.6[P7]								1	0,6%		11	6,1%		2	2,2%		1	1,1%
	GII.7		1	0,3%		2	1,2%					2	1,1%					1	1,1%
	GII.7[P6]														2	2,2%			
	GII.8											4	2,2%		2	2,2%		1	1,1%
	GII.10											1	0,6%		1	1,1%			
	GII.12																		
	GII.13		1	0,3%					2	1,3%									
	GII.13[P16]											1	0,6%		1	1,1%			
GII.13[P21]		1	0,3%																
GII.14		1	0,3%																
GII.15								2	1,3%										
GII.16		1	0,3%					1	0,6%										
GII.17		133	44,8%		22	12,9%		7	4,4%		8	4,4%		20	22,2%		6	6,9%	
GII.20											1	0,6%							
GII.21		1	0,3%																
GII.22		2	0,7%																
GIV.1																			
total		22	274	296	19	151	170	47	113	160	48	133	181	20	68	88	7	80	87
%		7,4	92,6		11,2	88,8		29,4	70,6		26,5	73,5		22,7	77,3		8,0	92,0	

3/ Conclusions sur les virus entériques caractérisés

Comme à chaque saison, les norovirus sont présents dans la majorité (83,7%) des épidémies de cas groupés de gastro-entérites et représentent la majorité (77,0%) des virus isolés des selles analysées. Il s'agit essentiellement de norovirus du génogroupe II (92,0% des norovirus détectés et 70,8% des virus détectés).

Jusqu'ici les variants du génotype GII.4 étaient prédominants et se succédaient selon un cycle de 2 à 3 années. Depuis 2017, les variants recombinants prédominent, en particulier le GII.4 SydneyP[16] qui a émergé en 2016 en France et qui représente 28,7% des souches de norovirus caractérisées. A noter, le génotype GII.4 SydneyP[31] a vu sa circulation augmenter en 2021 avec 9,2% des épidémies de cas groupés. Le génotype GII.2[P16] qui a émergé en 2016 a été en 2021 le deuxième génotype responsable d'épidémies de cas groupés avec 21,8% des cas.

Le génotype GII.17 Kawasaki-308 qui avait émergé au cours de l'hiver 2015-2016 avec presque 45% des souches de norovirus caractérisées reste un des génotypes majeurs de norovirus responsable d'épidémies bien qu'il ait été moins fréquemment responsable de cas groupés en 2021 avec 6,9%.

Au cours de l'année 2021, les norovirus GI ont été à nouveau très peu fréquemment impliqués dans les épidémies avec une fréquence de 8,0% contre 22,2% en 2020, 29,4% en 2019 (la moyenne étant de 18,3% au cours des 8 dernières années).

Il reste cependant nécessaire de garder à l'esprit que le nombre d'épidémies a été de nouveau réduit cette année compte-tenu du contexte sanitaire, de l'utilisation des masques et de gel hydroalcoolique systématique.

2.5.2 Bilan virologique avant transplantation de microbiote fécal

Depuis 2020, l'ANSM a restreint le recours à la transplantation de microbiote fécal (TMF) dans le contexte sanitaire COVID. **En 2021, nous avons analysés 18 échantillons de selles de divers CHU (APHP, Clermont-Ferrand, Nantes, Saint-Etienne et Rouen) dans le cadre de TMF à visée thérapeutique. Seul 1 don a été disqualifié suite à la détection d'entérovirus.**

Nous participons depuis 2014 à divers programmes de recherche sur les traitements à l'aide de la TMF, notamment avec l'équipe du Pr. Harry SOKOL de l'APHP (études REBALANCE/MIRACLE sur les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI)) et de BIOFORTIS (MérieuxNutriSciences) via des accords-cadres. Dans ce cadre, **244 prélèvements de selles ont été analysés en 2021 pour qualification du don**, dont seuls 2 échantillons ont été disqualifiés après détection pour l'un de SARS-CoV-2 et d'adénovirus, et pour l'autre d'un entérovirus.

Notre expérience a été mise à disposition des autres laboratoires afin de favoriser l'accès à cette nouvelle thérapeutique.

2.5.3 Investigations virologiques de cas sporadiques

Au cours de l'année 2020, le CNR a procédé à l'analyse de **1042 prélèvements** de selles issus de sujets immunodéprimés ou de cas de diarrhées sporadiques.

1/ Surveillance de patients immunodéprimés (Figure 1)

Nous avons reçu **331 selles représentant le suivi de 275 patients**. Nous n'avons reçu un seul prélèvement pour 234 patients, 2 prélèvements pour 29 patients, 3 pour 10 patients, 4 pour 2 patients. Au total, **80 (24,2%) selles** chez 68 (20,8%) patients **étaient positives** pour 1 virus (55 patients), 2 virus (12 patients) ou 4 virus (1 patient). Par ordre de fréquence : **47 norovirus (36 patients)**, 12 adénovirus (12 patients), 12 entérovirus (11 patients), 5 sapovirus (5 patients), 8 astrovirus (7 patients), 1 astrovirus MLB/VA (1 patient). À noter 7 SARS-CoV-2 (7 patients) ont été détectés.

Les souches virales caractérisées chez ces sujets immunodéprimés correspondaient à 83 souches dont :

- **norovirus : 47 souches (Tableau 5)**
 - 1 souche de NoV-GI non typable
 - **46 souches de NoV-GII**, soit 97,9% des norovirus détectés **dont 4 variants de souches GII.4 (31,9%)**.

- adénovirus : 12 souches non entériques (types A, C ou D).
- sapovirus : 5 souches dont 1 souches GI.2.
- astrovirus : 8 souches de génotype 1.
- astrovirus MLB/VA : 1 souche de génotype MLB-1.

Tableau 5. Détail des typages des 56 souches de norovirus détectés chez des immunodéprimés en 2021

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI non typables*	1		
Génogroupe II	GII non typables*	11	GII.4 Sydney	3
	GII.2	1	GII.4 Sydney [P4 New Orleans]	3
	GII.2[P16]	8	GII.4 Sydney[P16]	2
	GII.3	3	GII.4 Sydney[P31]	7
	GII.6	1		
	GII.6[P7]	1	GII.14	2
	GII.7	1	GII.17	3

* charge virale trop faible

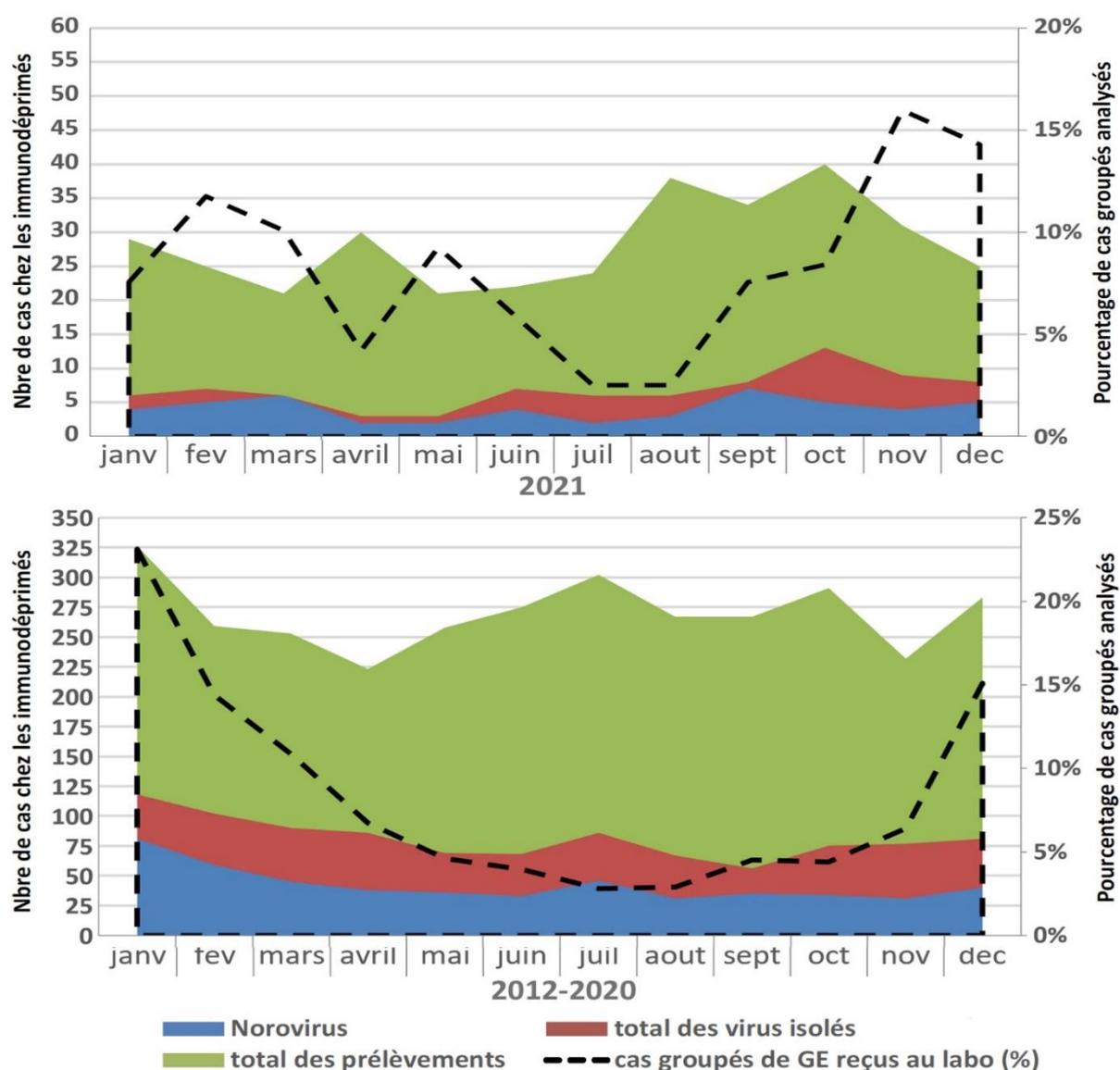


Figure 1 : Répartition saisonnière des virus isolés des selles diarrhéiques des patients immunodéprimés (1 prélèvement/patient) (a) 340 demandes entre janvier 2021 et décembre 2021 ; (b) 3271 demandes entre janvier 2012 et décembre 2020.

2/ Diagnostic de cas sporadiques de diarrhées aiguës (Figure 2)

En 2020, nous avons analysés les selles de 464 patients souffrant de diarrhée aiguë et provenant de CHR, CHU ou LABM de toute la France. La moyenne d'âge était à 19,1 ans et la médiane à 2,4 ans [1 jours ; 100 ans]. En tout 234 (50,4%) patients étaient positifs pour au moins 1 virus entérique dont 11 patients qui présentaient 2 virus dans les selles.

En tout, 243 virus ont été détectés dont :

- **norovirus : 149 souches** (Tableau 6) : 5 souches de NoV-GI et **144 souches de NoV-GII**, soit 96,6% des norovirus détectés **dont 4 variants de souches GII.4 (39,6%)**.
- **rotavirus : 34 souches** dont 24 G3P[8], 5 G9P[8], et 2 G2P[4].
- **adénovirus : 22 souches** dont 5 souches entériques (groupe F ; AdV-40/41) et des souches non entériques des groupes C, B et D.
- **sapovirus : 9 souches** dont 7 GI.1 et 1 GII.3.
- **entérovirus : 13 souches** dont 1 EV-D68 (B3), 6 rhinovirus (A12, A24, B27, B92, C19, C40), 2 Coxsackie (A16 et B3) et 1 échovirus 25.
- **paréchéovirus : 5 souches** dont PEV-1 et PEV-4.
- **astrovirus : 10 souches** hAstV-1.
- **bocavirus : 1 souche**.

Tableau 6. Détail des typages des norovirus détectés dans les cas sporadiques en 2021

	Souches de norovirus	nombre	Souches de norovirus	nombre
GI	GI non typables*	2	GI.6	1
	GI.3	1	GI.6[P11]	1
GII	GII non typables*	18	GII.4 Sydney[P16]	16
	GII.2	2	GII.4 Sydney[P31]	23
	GII.2[P16]	13	GII.6	1
	GII.3	22	GII.6[P7]	3
	GII.3[P12]	15	GII.7	3
	GII.3[P21]	1	GII.8	1
	GII.3[P30]	1	GII.12[P16]	3
	GII.4 Sydney	17	GII.13	2
	GII.4 Sydney[P4 New Orleans]	1	GII.17	2

* charge virale trop faible

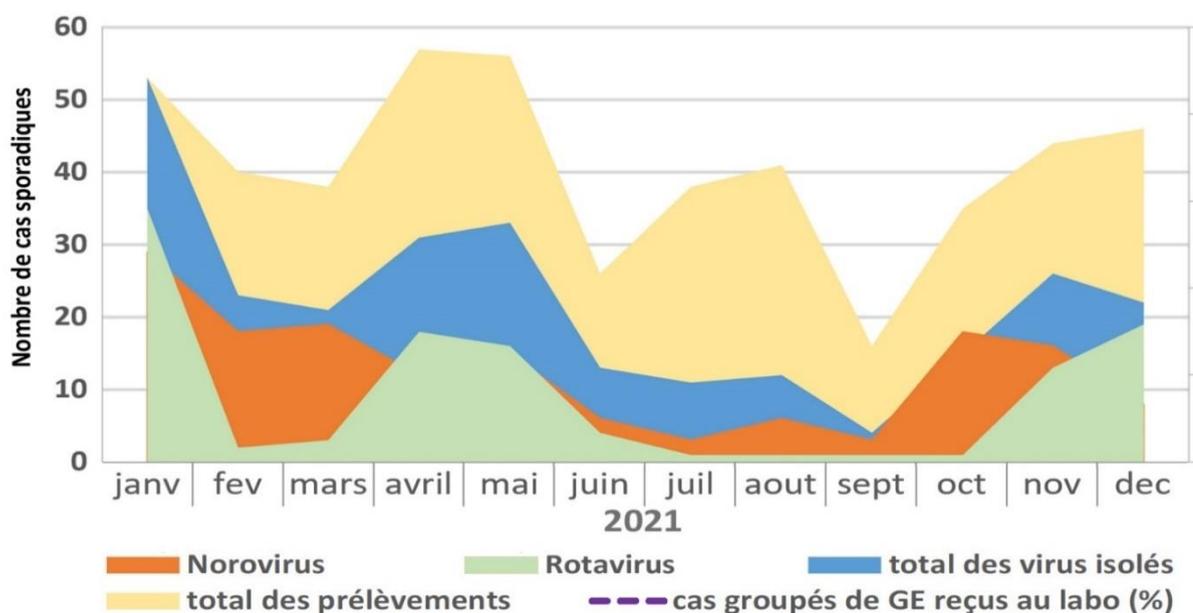


Figure 2 : Répartition saisonnière des virus isolés des selles diarrhéiques des 464 cas isolés analysés entre janvier 2021 et décembre 2021 (1 prélèvement/patient).

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, 2,5, 2,6, 2,8 et 2,8 jours en 2017, 2018, 2019, 2020 et 2021, respectivement, avec des médianes de 2 jours (**Figure 3**).

Il est important de noter que les augmentations d'activité n'impactent que peu le délai de rendu des résultats pour la recherche de norovirus. Enfin, le délai de rendu d'un dossier complet (panel d'analyses allant jusqu'à 10 virus) au cours de l'année 2021 est de 4,1 jours avec une médiane à 4 jours la recherche systématique de SARS-CoV-2 dans toutes les selles reçues.

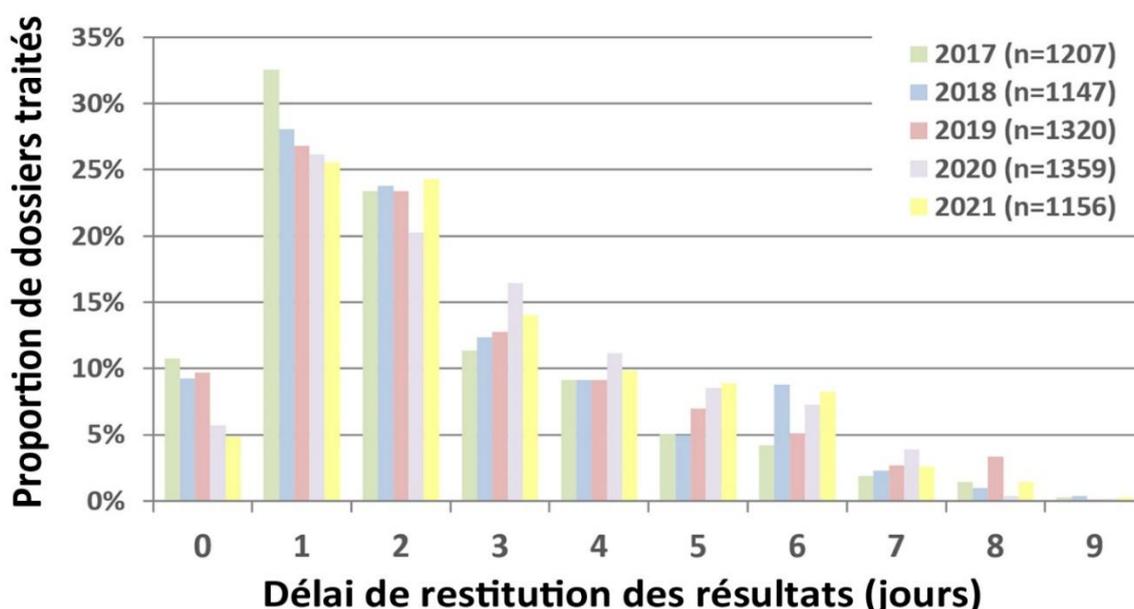


Figure 3 : Délai de restitution des résultats d'analyse de norovirus dans les selles de 2017 à 2021

Un allongement du délai de restitution peut être dû à :

- un rajout de l'analyse en seconde intention,
- un traitement en deux temps,
- une inhibition sur une autre analyse qui nécessite de répéter l'analyse,
- un jour férié qui décale la mise en œuvre des autres analyses
- ou à une analyse d'un autre virus fait tardivement.

2.5.5 Activité de diagnostic de SARS-CoV-2 dans les selles

Fort de son expertise et son expérience dans la détection des virus dans les matrices fécales, le CNRvge a mis au point une technique de détection de coronavirus SARS-CoV-2 dans toutes les selles qui lui étaient adressées (*le statut virologique pour SARS-CoV-2 n'étant pas connu*). Un dossier de validation de méthode a été formalisée selon les recommandations de l'ANSM et le CNRvge participe à la détection de SARS-CoV-2 pour la qualification des selles de donneurs TMF dans les études thérapeutiques.

Sur un total de 1155 selles investiguées entre janvier et décembre 2021, seules 23 (2,0%) selles étaient positives pour SARS-CoV-2 chez des patients dont la moyenne d'âge était de 51,7 ans [9 mois ; 86 ans] (médiane = 64 ans ; 14 femmes pour 9 hommes) : 8 immunodéprimés, 4 cas de diarrhées sporadiques, 3 cas d'épidémies groupées, 8 hospitalisés (réanimation, médecine interne, maladies infectieuses, dermatologie). (**Figure 4**)

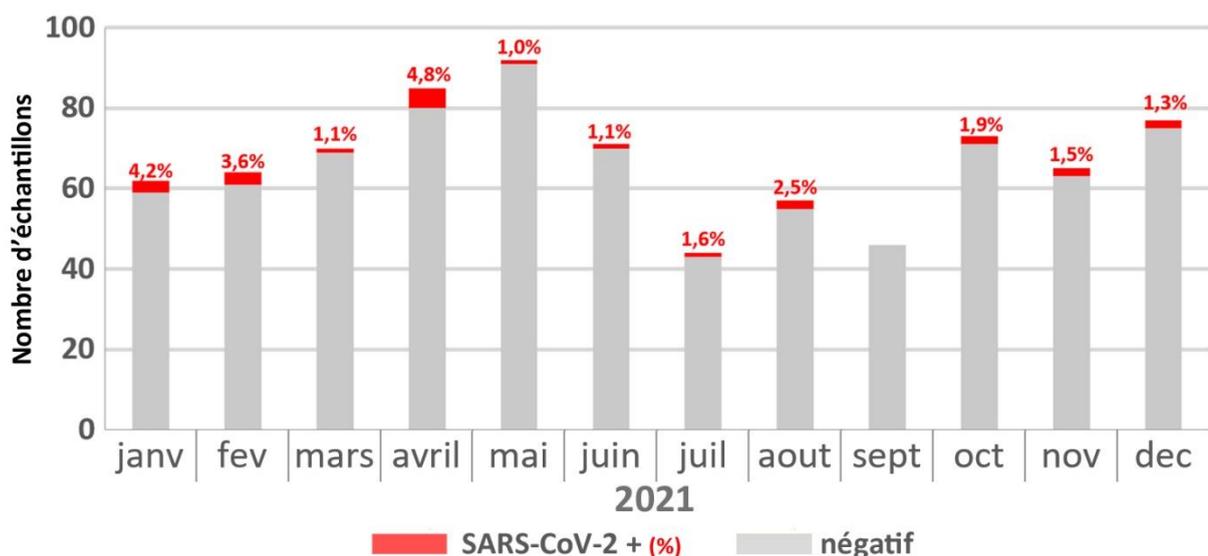


Figure 4 : Répartition saisonnière et statut des échantillons testés pour SARS-CoV-2 dans 1155 selles entre janvier 2021 et décembre 2021 (1 prélèvement/patient).

2.6 ACTIVITÉS DE SÉQUENÇAGE

Le CNRvge a accès à une plate-forme de séquençage haut-débit comportant actuellement deux séquenceurs Illumina® (MySeq® et NextSeq® 550) hébergés sur la Plate-forme de Biologie Hospitalo-Universitaire (PBHU) du CHU de Dijon. Le CNR est en cours d'acquisition, avec la Fédération de Microbiologie et l'aide de la Direction du CHU de Dijon, d'un séquenceur Illumina® NextSeq® 1000. L'assistant ingénieur du CNRvge a été formé à la bio-informatique pour le traitement des données et bénéficie du support d'un ingénieur bio-informaticien de la plate-forme de génétique du CHU de Dijon. Les données sont 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 ribosomiaux 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 seront prochainement disponibles pour les analyses pan-virales dans les selles.

3. ACTIVITÉS DE SURVEILLANCE

Éléments clefs de l'activité de surveillance du CNRVge en 2021 :

- *surveillance du réseau national rotavirus : analyses de 364 prélèvements de selles : prépondérance du génotype G9P[8] (43,4%), ascension des G2P[4] (23,1%) et reflux des souches G3eP[8] « equine-like » (14,3%) et G12P[8] (2,3%).*
- *surveillance des épidémies :*
 - *analyses de 119 épidémies : survenue essentiellement de novembre à mars*
 - *75 (63,1% des épidémies sont survenues dans les EHPAD ou dans des hôpitaux*
 - *transmission le plus fréquemment de personne-à-personne (43,7%) mais près d'un tiers des épidémies ont une transmission d'origine inconnue*

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 2018 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 (Figure 5)

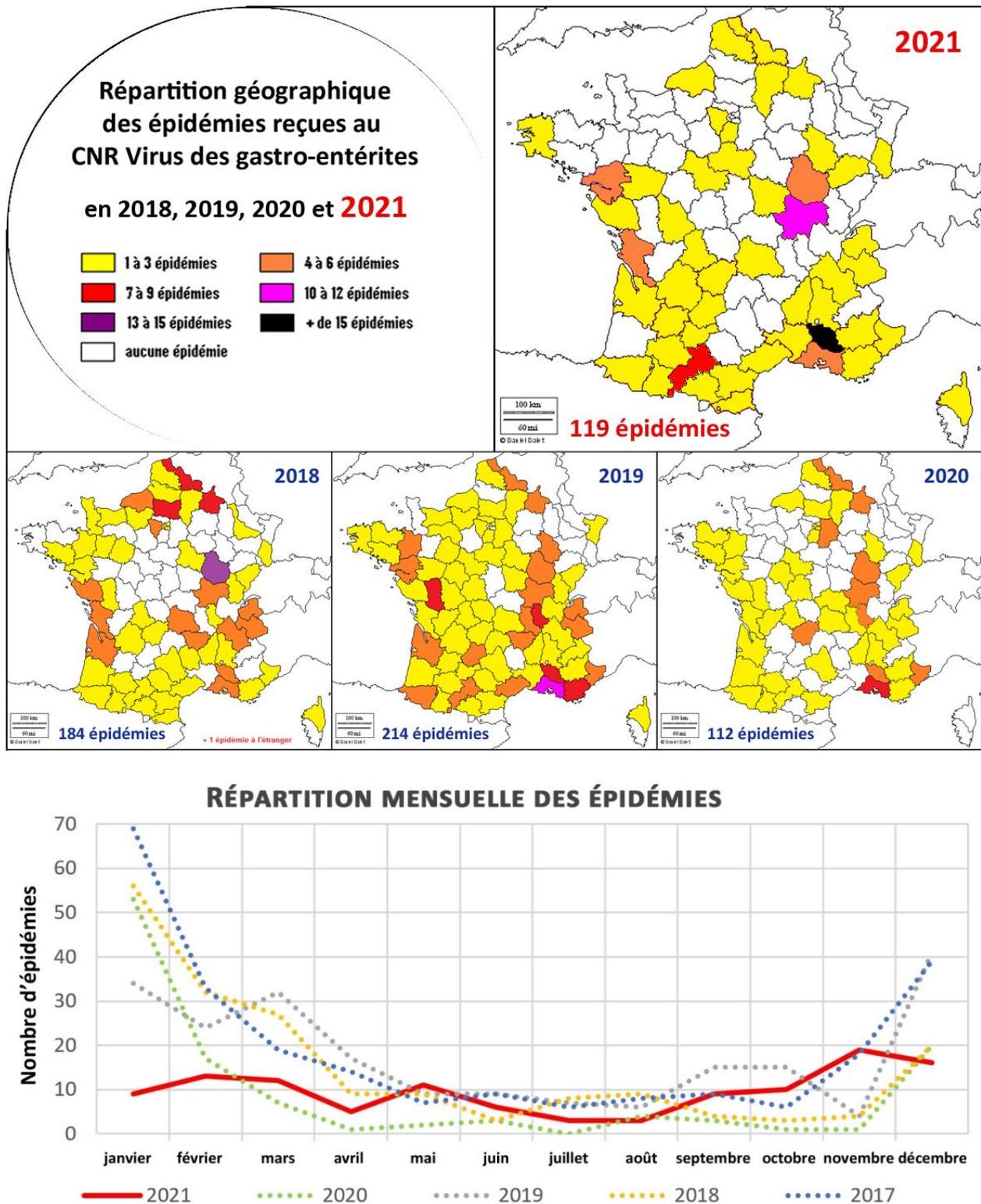


Figure 5 : Épidémies de cas groupés. (a) Répartition géographique des épidémies reçues. Bilan de l'activité du CNR en 2018, 2019, 2020 et 2021. À noter que tous les départements nous ont envoyé des prélèvements au moins une fois depuis 2012 à l'exception de l'Aube (10) et l'Eure-et-Loire (28). (b) Répartition mensuelles des épidémies reçues. Bilan de l'activité du CNR en 2017, 2018, 2019, 2020 et 2021.

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). Depuis 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 6).

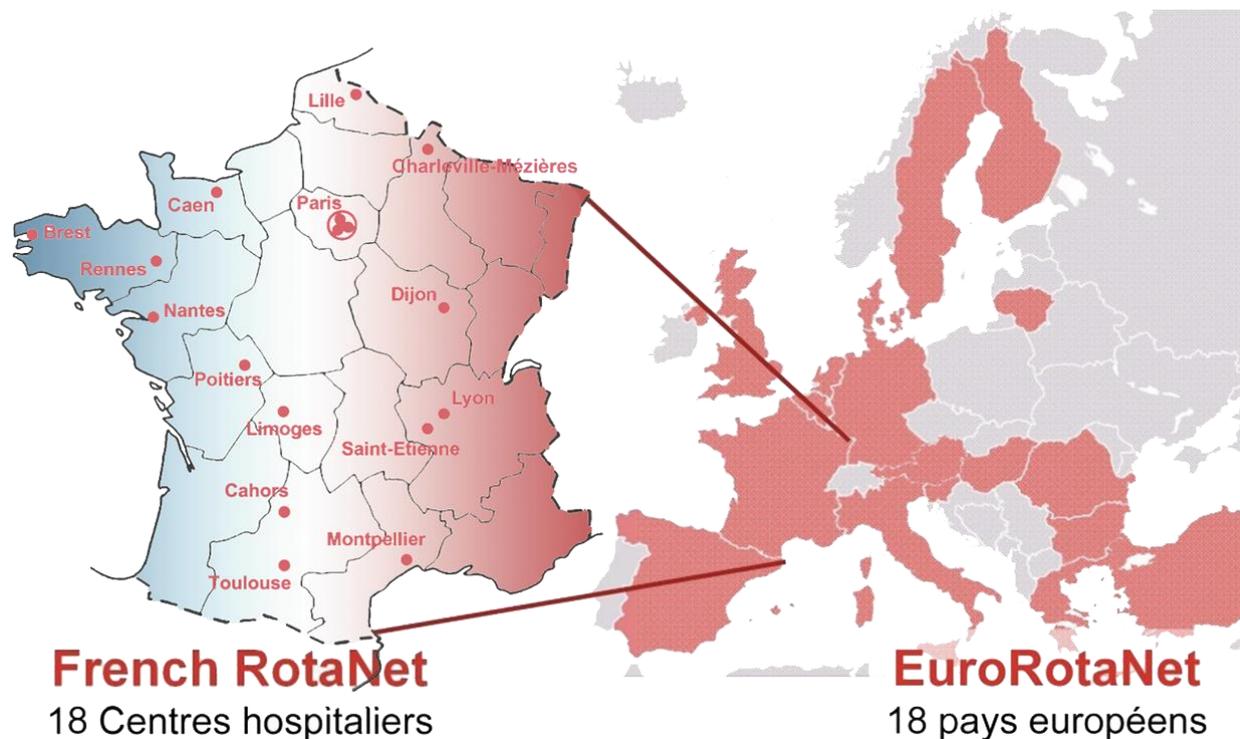


Figure 6 : Répartition des centres participant au réseau national rotavirus en 2020.

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 7). 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 2021, 59,7% des épidémies analysées au CNR sont survenues entre novembre et mars (70,2% de 2012 à 2020) et 72,3% entre octobre et avril (81,1% de 2012 et 2020). Cette année 2021 a été perturbée par la poursuite de l'épidémie de COVID et les restrictions de déplacement ou de regroupement de personnes. Néanmoins, cette forte saisonnalité automno-hivernale concerne le plus souvent les épidémies survenant en établissements de soins et non pas celles survenant en collectivités ou dans les restaurants qui ont lieu toute l'année. Cette observation est comparable aux différences de saisonnalité entre les épidémies transmises de personne-à-personne et celles d'origine alimentaire ou hydriques.

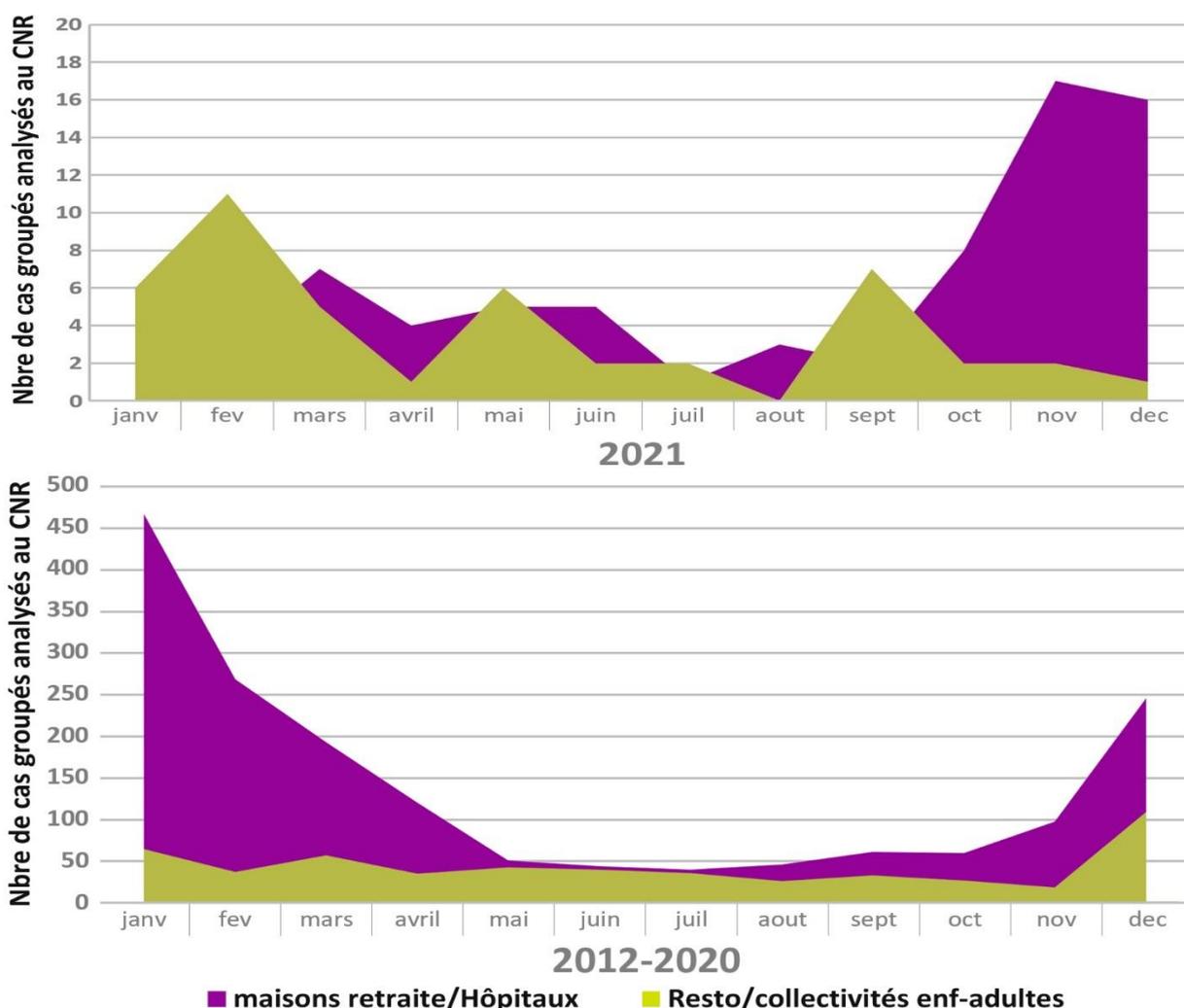


Figure 7 : Répartition temporelle des cas groupés pris en charge par le CNR en fonction de l'origine de l'épidémie. (a) bilan de l'activité du CNR en 2021 et (b) bilan de l'activité de 2012 à 2020.

2/ Sites et modes de transmission

Malgré le contexte sanitaire particulier depuis 2020, les modes de transmission observés en 2021 sont globalement similaires à l'ensemble de la période 2012-2020 (Tableau 7).

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

sites/transmissions		pers-à-pers	inconnu	aliments	hydrique	Total
2021	EHPAD	30 (25,2%)	17 (14,3%)	8 (8,0%)	1 (0,8%)	56 (47,1%)
	hôpitaux	6 (5,0%)	8 (6,7%)	5 (0,9%)	0 -	19 (16,0%)
	réception	1 (0,8%)	1 (0,8%)	8 (10,8%)	0 -	10 (8,4%)
	centre enfants	15 (12,6%)	10 (8,4%)	7 -	1 (0,8%)	33 (27,7%)
	centre adultes	0 -	1 (0,8%)	0 (0,9%)	0 -	1 (0,8%)
	Total	52 (43,7%)	37 (31,1%)	28 (20,5%)	2 (1,7%)	119
2012-2020	EHPAD	958 (44,0%)	438 (20,1%)	97 (4,5%)	10 (0,5%)	1503 (69,0%)
	hôpitaux	122 (5,6%)	79 (3,6%)	21 (1,0%)	0 -	222 (10,2%)
	réception	10 (0,5%)	8 (0,4%)	223 (10,2%)	0 -	241 (11,1%)
	centres enfants	43 (2,1%)	20 (0,9%)	56 (2,6%)	7 (0,3%)	126 (5,8%)
	centres adultes	20 (0,9%)	21 (1,0%)	44 (2,0%)	1 (<0,1%)	86 (3,9%)
	Total	1153 (52,8%)	566 (26,1%)	441 (20,2%)	18 (0,8%)	2178

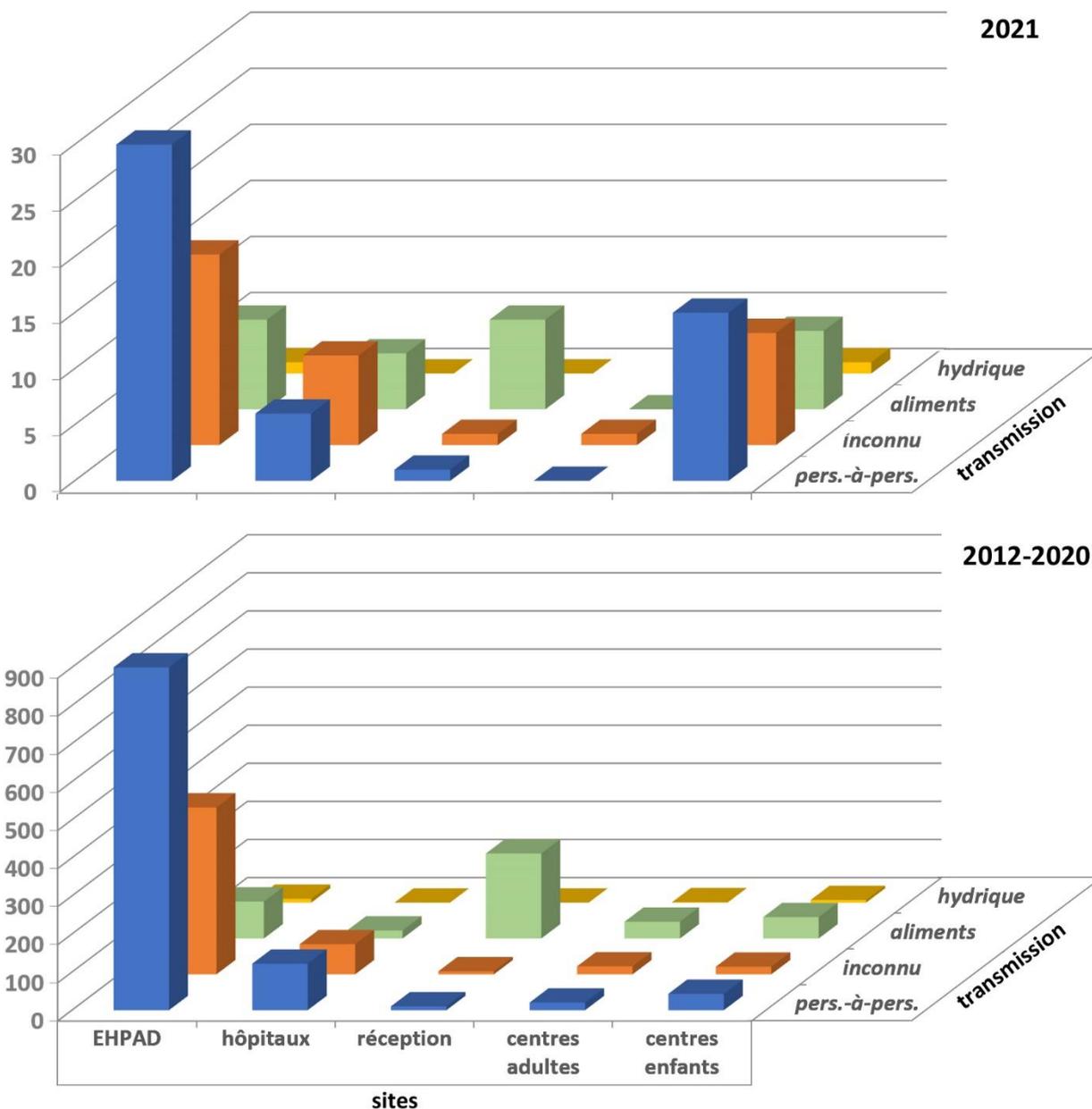


Figure 8 : Relation entre type d'établissement et le mode de transmission.
 (a) bilan de l'activité du CNR en 2021 et (b) bilan de l'activité de 2012 à 2020.

– **Site ou établissement :**

En 2021, près de la moitié des 119 épidémies sont survenues dans des EHPAD avec 56 épidémies (47,1%), ce qui est inférieur à ce qui est observé depuis 2012. En parallèle, une augmentation du nombre de cas est observée dans les centres pour enfants (33 ; 27,7%) et les hôpitaux (19 ; 16,0%). Cette situation peut s'expliquer par le renforcement de l'hygiène en EHPAD et le relâchement, au cours de l'année 2021, des contraintes sanitaires demandées aux enfants depuis mars 2020.

– **Mode de transmission :**

En 2021, le mode de transmission de **personne-à-personne, le plus fréquent, est incriminé dans 52 épidémies soit 43,7% des cas.** Cependant, le mode de transmission restait inconnu ou non renseigné pour près d'un tiers des épidémies (37 ; 31,1%). Une origine alimentaire a été à l'origine de 28 épidémies (23,5%) où 9 épidémies (32,1% ; 7,5% de l'ensemble) étaient dues à des fruits de mer/poissons. Globalement, ces résultats sont superposables à ceux constatés au cours de la période 2012-2020.

– Relation site et mode de transmission :

En 2021, la majorité des épidémies est advenue dans des EHPAD ou des services hospitaliers mais avec une fréquence plus faible qu'au cours de la période 2012-2020 (69,3% vs. 79,2%). Le principal mode de propagation des virus entériques dans ces établissements était une transmission de personne-à-personne (48% en 2021 vs. 62,6% de 2012 à 2020). Cependant, les causes inconnues restent encore fréquentes (33,3% en 2021 vs. 30,0% de 2012 à 2020). L'origine alimentaire y est toutefois retrouvée dans quelques épidémies (17,3% en 2021 vs. 6,8% de 2012 à 2020). Comme attendu, une origine alimentaire est principalement trouvée dans les épidémies survenant lors d'une réception (80,0% en 2021 vs. 92,5% de 2012 à 2020).

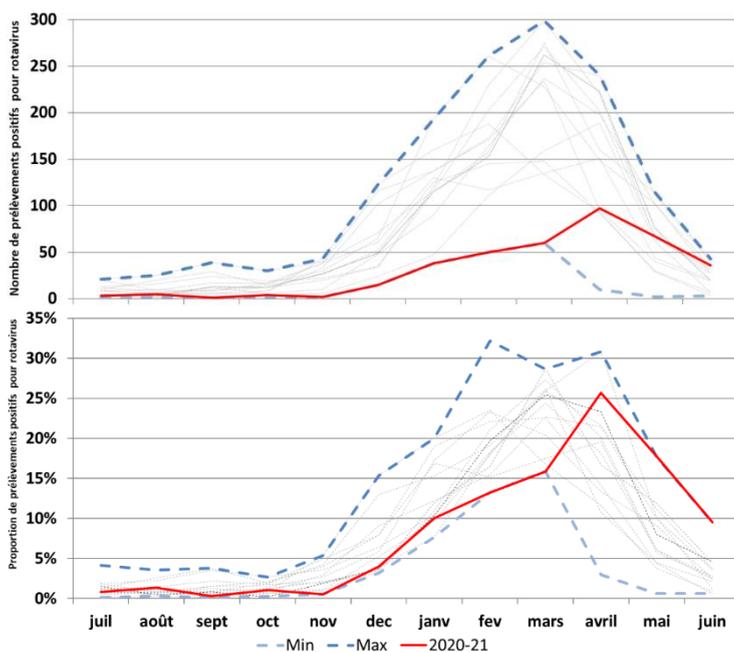
3.2.2 Caractéristiques virologiques des épidémies de gastro-entérites à rotavirus en France : bilan de la surveillance de la saison 2020-2021

Dix-huit centres participent à cette étude depuis 2006 et **7 centres ont pu envoyer des prélèvements pour la saison 2020-2021** : Caen, Dijon, Lyon, Montpellier, Paris, Poitiers, Rennes et, Rouen.

Au total, nous avons reçu et analysé **11.798 prélèvements de rotavirus entre 2006 et 2021**. **Pour la saison 2020-21, seuls 364 prélèvements ont été reçus**, le contexte sanitaire ayant fortement bouleversé l'épidémiologie des infections à rotavirus tout comme le fonctionnement des laboratoires de virologie français, accaparés par le diagnostic SARS-CoV-2.

1/ Distribution saisonnière des épidémies à rotavirus

Les infections à rotavirus sont saisonnières et surviennent durant les mois d'hiver. Au niveau européen, nos études avec le 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 d'infections de la saison 2020-21 est très émoussé avec une faible circulation virale en début de saison jusqu'en janvier puis une augmentation progressive pour atteindre un maximum en avril.** La survenue de la pandémie de SARS-CoV-2 a été à l'origine d'une pause dans l'épidémie de rotavirus pendant l'année 2020, notamment en raison de l'utilisation de gestes barrières, de solutions hydroalcooliques et du confinement. L'assouplissement des règles d'hygiène combiné à une probable diminution de l'immunité collective vis-à-vis de nombreux agents infectieux, dont rotavirus, pourraient être à l'origine d'un regain épidémique progressif. Un rebond épidémique pourrait ainsi survenir la saison suivante.



Figures 9a et 9b : Distribution temporelle des infections à rotavirus pour la saison 2020-21 comparée aux maximums et minimums des saisons de 2006 à 2021.

Globalement, il n'y a pas de différence d'une année à l'autre puisque le pic des infections a lieu en mars pour 9 saisons sur 13 de 2006 à 2019, les autres ayant eu lieu en février pour les saisons 2007-08 et 2016-17, et en avril pour 2006-07, 2018-19 et 2020-21. Les mois les plus importants sont février-mars-avril pour 9 saisons (2006-07, 2009-10, de 2011 à 2016, 2017-18, 2020-21) et janvier à mars pour les 5 autres (2007-08, 2008-09, 2010-11, 2016-17 et 2018-19). La saison 2019-20 aurait pu s'inscrire dans ce schéma sans la pandémie de coronavirus car l'amorce du pic épidémique était similaire.

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

Saison 2020-2021 (Figure 10)

En tout 364 prélèvements ont été caractérisés au cours de la saison 2020-21. En comparaison avec l'étude globale, les résultats importants de cette dernière saison sont :

- le génotype G9P[8] est en net regain avec une fréquence de 43,4% au cours de cette saison démontrant de nouveau qu'il s'agit d'un génotype majeur en France. Ce génotype représentait au cours de la précédente saison seulement 12,0% des souches circulantes de rotavirus. Ces souches diffèrent peu des souches détectées continuellement depuis la saison 2004-2005 qui a vu ce génotype émerger en France.
- le génotype G2P[4] fait une nette percée au cours de cette saison avec 23,1% des souches circulant en France, son plus haut depuis 20 ans.
- le génotype G3P[8] est en nette régression après l'émergence d'une souche dite « *equine-like* » au cours de la saison 2017-18. Au cours de cette nouvelle saison, ce génotype ne représentait plus que 14,3% des souches génotypées contre près de la moitié lors de la saison précédente. Ces nouvelles souches recombinantes humain-équidé allient un segment VP7 de type G3 d'origine équine à une constellation de gènes d'origine humaine dont un segment VP4 de type P[8] (soit un profil DS1-like : G3-P[8]-I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1).
- les autres génotypes importants sont :
 - G1P[8] (11,7%) reste de nouveau en retrait cette saison mais demeure néanmoins le premier génotype toutes saisons confondues.
 - G12P[8] (2,3%) marque un pas et retourne à son faible niveau de fréquence depuis son émergence au cours de la saison 2011-12.
- à noter l'absence à nouveau de la circulation du génotype G4P[8].

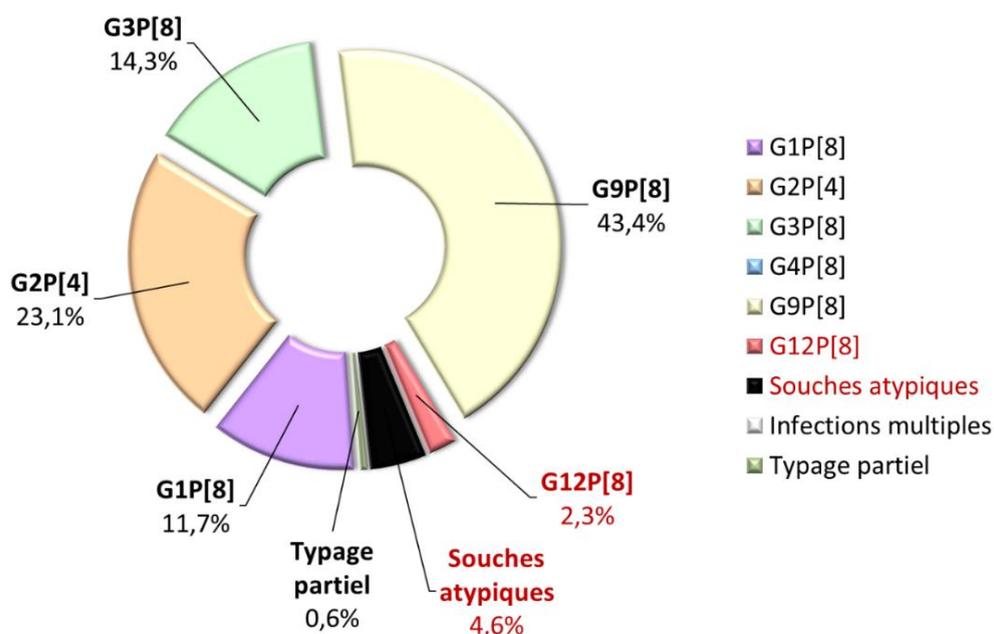


Figure 10 : Distribution des combinaisons de génotypiques G et P des rotavirus détectés en France durant la saison 2020-2021 (364 prélèvements)

La persistance d'un faible nombre de souches non ou partiellement typables (0,6%) est liée à la très bonne sensibilité 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 mais dont les charges virales sont généralement très faibles et donc non typables.

Bilan 2006-2021 (Figure 11)

Le recueil des prélèvements sur l'ensemble des saisons 2006-2007 à 2020-2021 est de **11688 souches de rotavirus** totalement ou partiellement caractérisées (Tableau 1). Les quatre principales combinaisons de génotypes G/P (>1%) ont été durant ces quinze années : **G1P[8] (44,8%) suivie de G9P[8] (29,3%), cumulant à elles seules 74,1% des souches détectées, puis G3P[8] (10,4%) et G2P[4] (6,1%)**. Les autres combinaisons d'importance significative étaient **G4P[8] (2,2%) et G12P[8] (1,9%)**.

Ainsi, les six combinaisons génotypiques désormais classiques (G1P[8], G2P[4], G3P[8], G4P[8], G9P[8] et G12P[8]) représentaient 94,7% des souches caractérisées. Les **génotypes ou combinaisons atypiques** (incluant notamment quelques associations de génotypes G et P classiques) représentent **1,8 %** et les infections mixtes 1,7%.

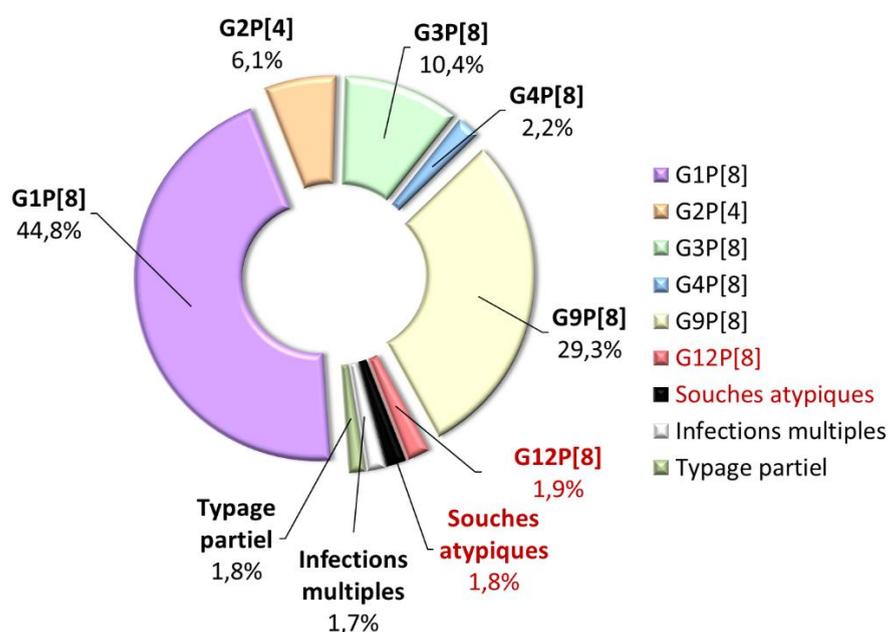


Figure 11 : Distribution des combinaisons de génotypiques G et P des rotavirus détectés en France durant l'ensemble de la surveillance 2006-2021 (11688 souches)

3/ Analyse de la répartition des génotypes G ou P

L'analyse séparée des **génotypes G** montre une répartition des souches semblable à celle observée pour les combinaisons G/P. Les génotypes G inhabituels détectés en France en 2020-2021 ont été des souches **G8** (4 souches, 1,1%), dont une souche d'origine bovine, et **G6** (2 souches, 0,5%). Aucun génotype G5, G6 ou G10 (souches d'origine bovine) n'a été caractérisé durant la saison 2020-2021

Les faits marquants de cette saison 2020-2021 est :

- **forte recirculation des rotavirus G9** avec une fréquence de 44,2% (161 souches),
- **décroissance franche des rotavirus G3** avec une fréquence de 14,8% (54 souches),
- **nette progression des rotavirus G2** avec 23,4% de détection (85 souches). Ce génotype a atteint son plus haut taux de circulation depuis deux décennies de surveillance.

Les **génotypes P** sont peu diversifiés et très largement dominés par le génotype **P[8]** avec globalement 92,3% entre 2006-2021 et 74,9% en 2020-21, alors que le génotype **P[4]** représente globalement 6,7% entre 2006-2021 et 23,8% cette dernière saison. Ce résultat concernant le génotype P[4] est à considérer dans le suivi des effets de la vaccination même si les dernières données montrent que les variations sont essentiellement dues à une fluctuation naturelle saisonnière.

Tableau 8 : Distribution et prévalence par année des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2020 et durant la saison 2020-2021.

	Nombre de souches de rotavirus génotypées		
	2006-2020 <i>n</i> =11434	2020-2021 <i>n</i> =364	2006-2021 <i>n</i> =11798
Génotypes G^a			
G1	5245 (45,9)	49 (13,5)	5294 (46,6)
G2	704 (6,2)	85 (23,4)	789 (6,3)
G3	1253 (11,0)	54 (14,8)	1307 (11,1)
G4	281 (2,5)	1 (0,3)	282 (2,5)
G6	23 (0,2)	2 (0,5)	25 (0,2)
G8	31 (0,3)	4 (1,1)	35 (0,3)
G9	3480 (30,4)	161 (44,2)	3641 (30,9)
G10	2 (<0,1)	0 -	2 (<0,1)
G12	241 (2,1)	8 (2,2)	249 (2,1)
Infections mixtes (types G)			
G1 + G2	20 (0,2)	0 -	20 (0,2)
G1 + G3	22 (0,2)	0 -	22 (0,2)
G1 + G4	10 (0,1)	0 -	10 (0,1)
G1 + G9	69 (0,6)	0 -	69 (0,6)
G2 + G3	1 (<0,1)	0 -	1 (<0,1)
G2 + G4	1 (<0,1)	0 -	1 (<0,1)
G2 + G9	5 (<0,1)	0 -	5 (<0,1)
G3 + G4	2 (<0,1)	0 -	2 (<0,1)
G3 + G8	1 (<0,1)	0 -	1 (<0,1)
G3 + G9	28 (0,2)	0 -	28 (0,2)
G3 + G12	6 (0,1)	0 -	6 (0,1)
G4 + G9	9 (0,1)	0 -	9 (0,1)
Génotypes P^a			
P[3]	5 (<0,1)	0 -	5 (<0,1)
P[4]	740 (6,6)	86 (23,8)	826 (6,1)
P[5]	1 (<0,1)	0 -	1 (<0,1)
P[6]	73 (0,6)	5 (1,4)	78 (0,7)
P[8]	10349 (92,1)	271 (74,9)	10620 (92,8)
P[9]	27 (0,2)	0 -	27 (0,2)
P[14]	15 (0,1)	1 (0,3)	16 (0,1)
Infections mixtes (types P)			
P[4] + P[8]	27 (0,2)	0 -	27 (0,3)

^a Inklus les infections multiples

Entre 2006 et 2021, les génotypes atypiques en France étaient représentés par **P[3], P[5], P[6], P[9] et P[14]** ce qui représentait 127 (1,1%) souches. Durant la saison 2020-21 nous avons détecté les **génotype P[6] (5 souches) et P[14] (1 souches) soit 1,7% du total des souches caractérisées.**

La constance et l'hégémonie de la prévalence du génotype P[8] entre 2006 et 2021 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.

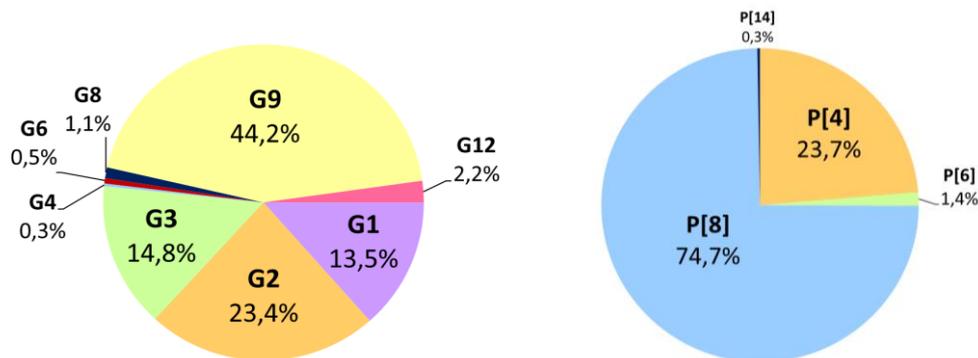


Figure 12. Distribution des génotypes G et P détectés en France pour la saison 2020-21

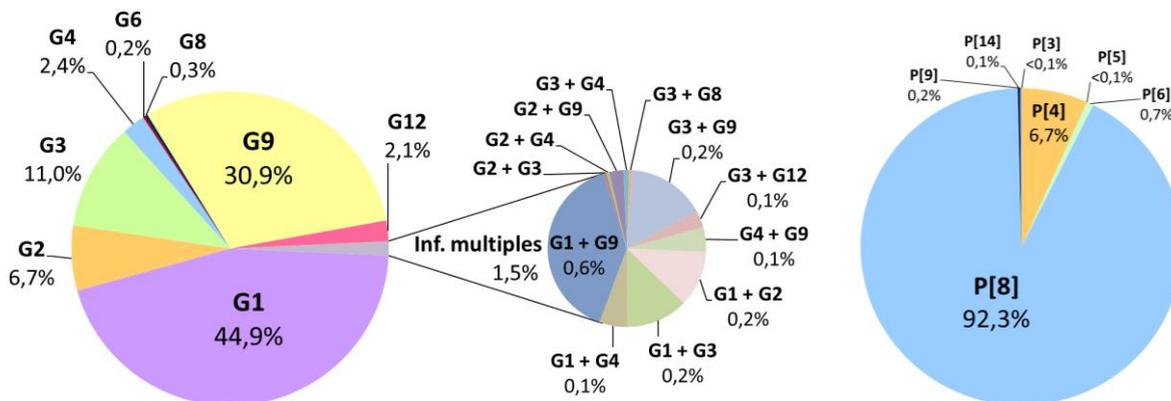


Figure 13. Distribution des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2021

4/ Variations temporelles des combinaisons de génotypes G/P

Variations des génotypes G/P entre 2006-2021 (Figure 12)

Évolution des génotypes G/P « classiques »

L'évolution des génotypes G/P durant cette période de surveillance est marquée par de grandes variations saisonnières.

- le génotype **G1P[8]** : stable depuis plus de 10 ans, il a vu sa fréquence chuter avec la réémergence des G9P[8] puis des G3P[8] (entre 53,0% et 73,1% entre 2005 et 2015 ; entre 9,0% et 16,8% en 2015 et 2019 ; et seulement 7,5% en 2019-20). Ce phénomène a déjà été observé en 2004-05 mais il n'avait duré qu'une seule saison. Les résultats des génotypages des prochaines saisons seront à regarder de près avec soit une réémergence des G1P[8] au détriment des G9P[8], G3P[8] voire G12P[8], soit avec des accroissement de circulation de ces derniers.
- le génotypes **G2P[4]** évoluent de façon cyclique selon les saisons, oscillant entre 1,6% et 17,2% en fréquence. Au cours de la dernière saison 2020-21, on notera néanmoins un plus haut depuis 2006 avec 23,2% des souches génotypées.
- le génotype **G3P[8]** : jusqu'ici sa fréquence restait relativement faible avec quelques pics de détection supérieur à 20% au cours des saisons 2003-04 et 2011-12. Les saisons 2017-18 et 2018-19 indiquaient une probable réémergence de ce génotype qui s'est confirmée au cours de la saison 2019-20. Cette réémergence due à une souche particulière dite *equine-like* sera à surveiller au cours des prochains saisons même si la saison 2020-21 montre un net recul de sa circulation (14,3%).
- le génotypes **G4P[8]** circule à bas niveau depuis nombreuses saisons avec un maximum à 7,3%. Les souches G4P[8] ne sont plus détectées depuis 3 saisons.

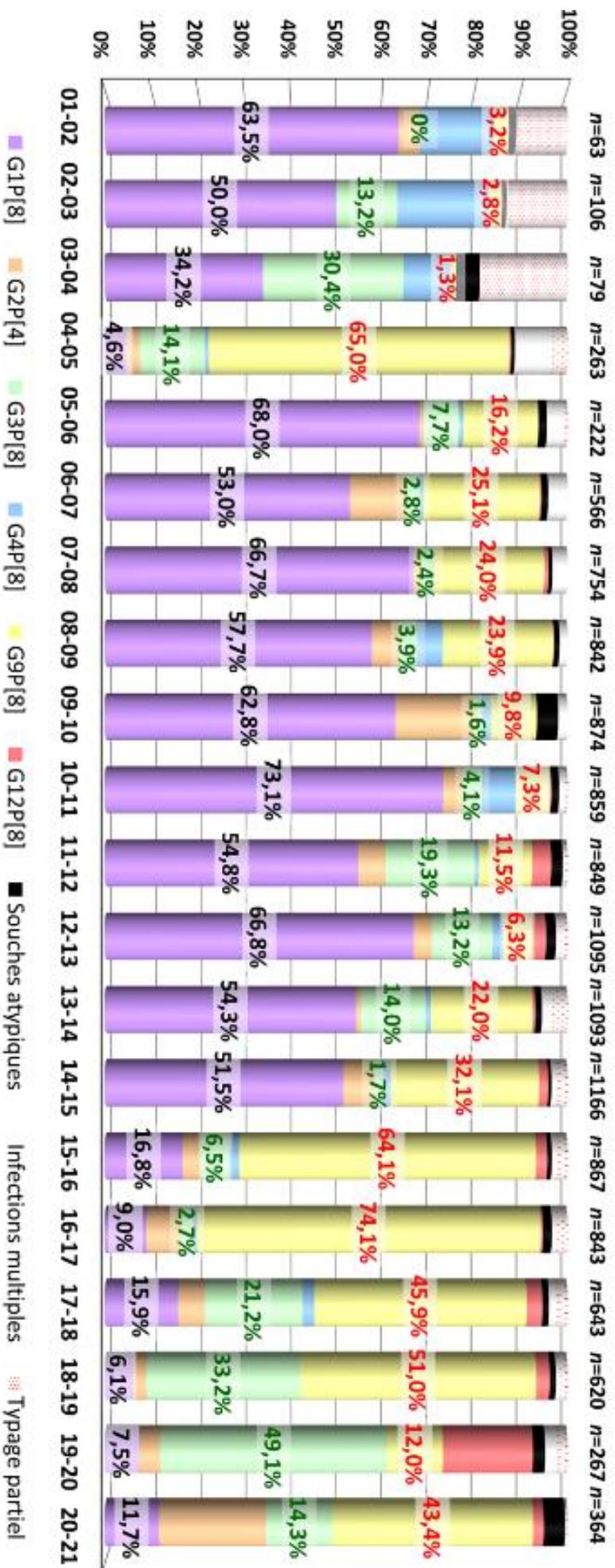


Figure 14. Évolution des combinaisons de génotypes G/P de rotavirus en France entre 2001 et 2021
(Noter que la période 2001 à 2006 est une étude limitée.)

- **le génotype G9P[8]** : après sa brutale émergence en 2004-05 (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 2013-14 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) et son maintien à des fréquences élevées au cours des saisons 2017-18 et 2018-19 (47,0% et 49,1%) laissent des interrogations quant à sa circulation et son évolution d'autant que cette forte prévalence des G9P[8] semble concerner plus particulièrement la France. Après une saison 2019-20 où sa fréquence a fortement chuté (12,0%), G9P[8] est de nouveau la souche la plus circulante (43,3%) au cours de la saison 2020-21.
- **le génotype G12P[8]** : son émergence récente (4,2% en 2011-12 et 3,0% en 2012-13) laissait penser qu'il deviendrait l'un des six génotypes importants en France. Après quelques saisons creuses (0,6% à 2,8% de détection), ce génotype a été détecté à une fréquence particulièrement élevée de 19,5% (52 souches) en 2019-20 confirmant la persistance et l'accélération de la circulation des rotavirus G12 en France. Cependant, cette percée a été de courte durée puisqu'il n'est détecté plus que dans 2,3% des cas. Cela reste néanmoins un génotype à surveiller.

Évolution des génotypes ou combinaisons atypiques

- **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 137 souches (1,2%) dont 9 (2,4%) en 2020-21.** Parmi ces génotypes inhabituels, le génotype P[6] est le plus important (79 souches au total). Certaines de ces souches peuvent être d'origine animale, notamment bovine et caprine. Il s'agissait pour la dernière saison de souches G8P[8] (3) et G8P[14] (1). Ces souches G8P[8], détectées régulièrement depuis quelques saisons, sont à surveiller car elles pourraient émerger dans les prochaines saisons à l'instar des G9P[8] (2004-05) et G12P[8] (2011-12). Cette combinaison génotypique montre l'adaptation des souches G8 à l'homme.
- **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 2021 et 2,7% des souches (10) au cours de la saison 2020-21.

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 2021, 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 commencent plus tôt, dès décembre, suivi par la province de février à avril.

Les résultats significatifs concernant la répartition des génotypes des rotavirus depuis 2001 sont :

- la **prédominance du génotype G1** à l'exception de la saison 2004-05 et depuis la saison 2015-16.
- **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 réémergé depuis la saison 2015-2016 et a circulé parfois avec une forte prévalence au cours des saisons suivantes.
 - **le génotype G12**, depuis la saison 2011-2012, a été globalement moins « brutale » que celle du génotype G9, représentant en France entre 2 et 4% des souches avec des différences significatives selon les centres. Ce génotype circule de manière régionale en France mais a connu une brève augmentation de sa circulation (19,9%) au cours de la saison 2019-20 avant de retomber (2,3%) au cours de la dernière saison.
 - **le génotype G3 *equine-like*** a émergé progressivement au cours des dernières saisons jusqu'à devenir prépondérant au cours de la saison 2019-20 avec une fréquence de 50,2% mais a moins circulé au cours de la dernière saison avec seulement 14,3% des souches détectées.
- la **variation cyclique des génotypes G2, G3 et G4**.
- 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. Depuis quelques saisons, des

souches G8P[8] sont régulièrement détectées démontrant une adaptation à l'homme des souches G8 d'origine bovine (usuellement G8P[14]). Ces souches pourraient émerger dans les prochaines saisons. 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 CNRVge 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, Copenhague (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, Pr 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 Étrangères et du Ministère de la Recherche.

Durant l'année 2021 ce réseau a été principalement actif avec la **Tunisie**. Nous accueillons Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (chercheuse universitaire invitée 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. Nous avons étendu cette collaboration au Burkina Faso à partir de 2011 et jusqu'à présent dans le cadre d'un programme « PARRAF ». Au cours de l'année 2021, nous n'avons pas eu l'opportunité d'accueillir un collègue de ce réseau.

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 :

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

- 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 internet : <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 2021 :

- M. le Dr. Georges TARRIS (AHU en anatomo-pathologie) : thèse de doctorat d'université.
- Mme le Dr. Khira SDIRI-LOULIZI (Université Monastir, Tunisie) : travaille d'épidémiologie moléculaire sur les norovirus chez les enfants tunisiens et les virus Aichi dans l'eau.
- Mme Nicolas ABOU-AHMAD (Université de Bourgogne Franche-Comté) : thèse de doctorat d'université.

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 aux groupes de travail de l'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) et à l'ANSES (Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail). Le CNR apporte ponctuellement son expertise auprès d'autres agences nationales telle que l'HAS.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE ET PUBLICATIONS EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITÉ DU CNR DES VIRUS DES GASTRO-ENTÉRITES

6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie

1/ Évaluation de la capacité d'infection des norovirus chez les individus non-sécréteurs

Objectifs : Le phénotype non-sécréteur est conditionné par des mutations homozygotes du gène *FUT2*, conduisant à une expression HBGA diminuée ou abolie à la surface de la muqueuse intestinale et de la salive. Comme les HBGA sont les principaux ligands des norovirus, les mécanismes déterminant la susceptibilité aux norovirus chez les hôtes non-sécréteurs restent flous. Notre objectif est de définir les interactions des norovirus et l'expression des ligands premièrement dans les tissus intestinaux de sujets sains non-sécréteurs et ensuite chez des sujets non-sécréteurs souffrant de MICI.

Résultats : L'analyse des sections duodénales a montré une forte liaison des VLP de GII.3 (souche SW4), GII.17 (souches Kawasaki308 et Kp) lorsqu'une forte expression concomitante de l'antigène Lewis a été observée chez les sujets sains. Les premiers résultats sur tissus pathologiques ont montré que l'attachement des norovirus se faisait toujours par le biais de l'antigène Lewis et concernait non seulement l'intestin grêle mais aussi les zones inflammatoires du colon. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de compétition utilisant des anticorps monoclonaux spécifiques et des lectines. Ainsi, les norovirus pourraient interagir spécifiquement avec les antigènes Lewis au niveau de la lumière duodénale chez les non-sécréteurs en l'absence d'expression des antigènes ABO. Cette interaction spécifique liée à la spécificité et à l'abondance des ligands dans le tube digestif montre les interactions complexes des norovirus avec les entérocytes. D'autres études devraient être menées afin de déterminer la conformation tridimensionnelle des HBGA à la surface des villosités duodénales.

État d'avancement : l'étude est en cours de finalisation. Une publication est en cours d'élaboration et sera publiée dans le courant de l'année 2021-22.

2/ Étude de séroprévalence des infections à bufavirus et tusavirus en France

Objectifs : évaluer la séroprévalence de nouveaux virus entériques de la famille *Parvoviridae* dans la population française en fonction de l'âge. En tout, 844 sérums de sujets âgés de 0 à 100 ans par tranche de 10 ans, seront testés avec des particules virales de synthèse (VLP) de bufavirus (BuV) de génotypes 1 à 3 et de tusavirus (TuV) dans le cadre d'une collaboration avec le Dr. Maria SÖDERLUND-VENERMO de l'université d'Helsinki, Finlande.

Résultats : Nous avons établi que la séroprévalence de bufavirus en Bourgogne s'élevait à 13,2% (IC95% : [11,0% ; 15,7%]), et que celle de tusavirus était de 2,6% (IC95% : [1,7% ; 4,0%]), sans tendance nette à l'augmentation en fonction de l'âge. Ces résultats montrent une circulation plus importante de ces virus dans la population française qu'en Finlande ou aux Etats-Unis, mais bien moindre qu'en Afrique ou en Asie. Les séroprévalences de bufavirus et de tusavirus en Bourgogne sont donc beaucoup plus faibles que celles des autres virus entériques actuellement connus, pour lesquels on observe habituellement une immunisation de la majorité de la population après quelques années de vie. Comparativement à ces virus, la circulation et l'implication de ces deux Protoparvovirus dans les pathologies gastro-intestinales semblent donc de moindre importance, mais nos résultats pourraient justifier l'inclusion de bufavirus et de tusavirus dans les virus à rechercher dans les selles de patients diarrhéiques, à la fois à des fins diagnostiques mais également épidémiologiques. D'autres études seront nécessaires pour déterminer leurs cellules-hôtes, leurs récepteurs cellulaires, leur cycle de réplication ainsi que leur capacité à résister dans le milieu extérieur et aux agents physico-chimiques de traitement des eaux.

État d'avancement : l'étude doit être poursuivie sur un nouveau panel de sérum afin de déterminer l'évolution de la séroprévalence dans le temps.

6.1.2 Évaluation de réactifs de biologie

1/ Trousses de diagnostic de biologie moléculaire rotavirus/norovirus

Nous avons testé en 2020/21 treize kits de RT-qPCR pour le diagnostic des norovirus et/ou des rotavirus dans les selles disponibles en France (Tableau 7).

L'objectif de cette évaluation était de déterminer et comparer dans deux études parallèles les performances diagnostiques de :

- 9 trousses commerciales de détection des norovirus (NoV) dans les selles.
- 8 trousses commerciales de détection des rotavirus du groupe A (RVA) dans les selles.

Remarque : quatre trousses étaient des trousses multiplexes, donc communes aux deux évaluations.

TROUSSSES DE DÉTECTION NOROVIRUS	TROUSSSES DE DÉTECTION ROTAVIRUS
Diagenode	
G-DiaNota™ Norovirus I/II Rotavirus (ref. DDGG10-L100)	
Fast-track	
Diagnostics FTlyo Viral Gastroenteritis (ref. FTlyo-3s-64-L)	
Immundiagnostik	
RT-PCR MutaPLEX® GastroSys 1 (ref. KG198696/KG198632)	
Seegene	
Allplex™ GI-Virus (ref. GI9701X)	
Altona	Altona
RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0 (ref. 052013)	RealStar® Rotavirus RT-PCR Kit 1.0 (ref. 561013)
CerTest Biotec	CerTest Biotec
Viasure Norovirus GI + GII Real time PCR detection kit (ref. VS-NOR112L)	Viasure Rotavirus Real time PCR detection kit (ref. VS-RTV112L)
Primerdesign	Primerdesign
Genesig® Advanced Kit Norovirus Genogroups 1 and 2 (ref. SB-NOROVIR)	Genesig® Advanced Kit Human Rotavirus A (ref. SB-ROTAVIRU)
R-Biopharm	R-Biopharm
RIDA® GENE Norovirus I & II (ref. PG1415)	RIDA® GENE Viral Stool Panel II (ref. PG1325)
Eurobio Ingen	
EurobioPlex Norovirus (ref. EBX-025)	

Tableau 7. Détail des trousses commerciales évaluées pour la détection des norovirus et des rotavirus.

NB : Les trousses évaluées ont été sélectionnées parmi celles disponibles sur le marché français. Seuls les fabricants ou distributeurs de trousses qui acceptaient de participer à cette étude de façon volontaire, de fournir gracieusement au CNR virus des gastro-entérites les trousses de détection nécessaires à cette évaluation et qui acceptaient que le CNR virus des gastro-entérites puissent communiquer librement les résultats de cette évaluation, ont été retenus.

Les essais ont été réalisés sur des échantillons de selles humaines issus de la collection du CNR virus des gastro-entérites (conservées à -40°C), sélectionnés afin de représenter les souches virales les plus importantes sur le plan épidémiologique et répartis comme suit :

- 50 selles positives en NoV (dont 3 co-infections avec du RVA et 1 co-infection NoV GI, NoV GII et RVA) incluses dans l'évaluation des trousses de détection des NoV : 25 souches de génogroupe I (5 GI.1, 5 GI.2, 5 GI.4, 1 GI.6, 4 GI.6[P11] et 5 GI.7) et 26 souches de génogroupe II (1 GII.3, 5 GII.4, 5 GII.6[P7], 4 GII.2[P16], 5 GII.4[P16], 5 GII.17 et 1 non typable).

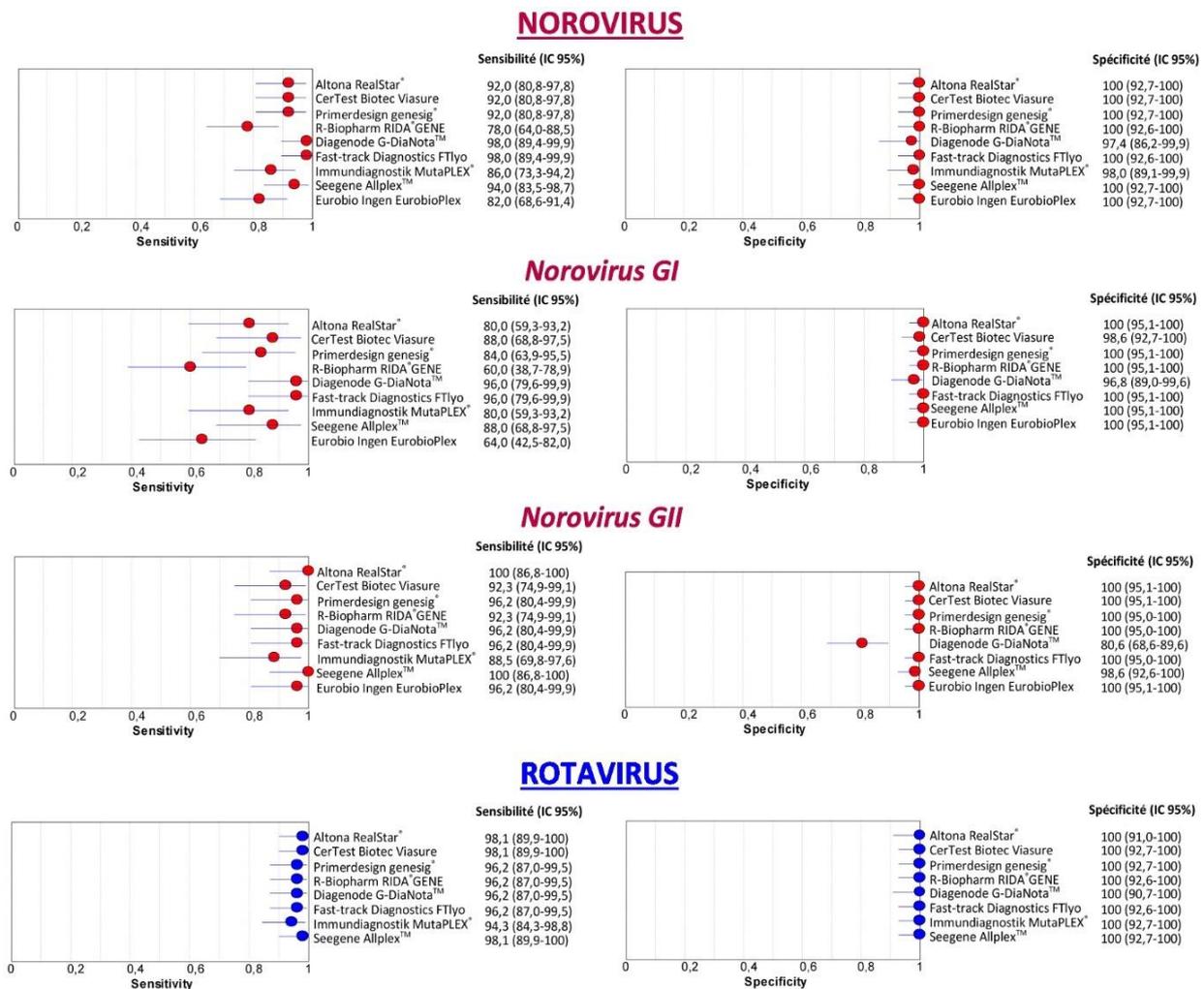
- 53 selles positives en RVA (dont 4 échantillons co-infectés avec du NoV) incluses dans l'évaluation des trousse de détection des RVA : 15 souches G1P[8], 10 G2P[4], 5 G3P[8], 5 G4P[8], 11 G9P[8], 5 G12P[8] et 2 souches non typables (G-UDP-UD).
- 49 selles négatives en NoV et RVA, incluses en parallèle dans les deux évaluations.

Au cours de l'évaluation, la présence ou l'absence d'ARN de norovirus et de rotavirus du groupe A a été vérifiée par les méthodes de référence utilisées en routine au CNR (RT-PCR en temps réel adaptées de la littérature par le CNR) :

- pour tous les échantillons positifs (norovirus et /ou rotavirus) de la collection du CNR,
- pour tout échantillon négatif de la collection du CNR, lorsque au moins l'un des tests de RT-PCR évalué donnait un résultat positif.

La sensibilité, la spécificité, les rapports de vraisemblance positif et négatif (LR+ et LR-) ainsi que le diagnostic odds ratio (DOR) ont été calculés avec leurs intervalles de confiance à 95% (IC 95%) en utilisant le logiciel Meta-DiSc (**Figure 7**).

Figure 7. Sensibilités et spécificités obtenues pour les tests RT-qPCR norovirus et rotavirus évalués en parallèle



Concernant la détection des NoV, les neuf troussees évaluées preésentait une sensibilité moyenne (78,0% pour le kit R-Biopharm, 82,0% pour le kit Eurobio Ingen et 86,0% pour le kit Immundiagnostik), bonne (92,0% pour les kits Altona, CerTest Biotec, PrimerDesign et 94,0% pour le kit Seegene) voire excellente (98,0% pour les kits Diagenode et Fast-Track Diagnostics) (**Figure 7**). Ces différences de sensibilité n'étaient toutefois pas statistiquement significatives, sauf entre le kit R-Biopharm (78,0% ; IC 95% : 64,0-88,5) vs. les kits Diagenode et Fast-Track Diagnostics (98,0% ; IC 95% : 89,4-99,9). Les spécificités des neuf troussees étaient excellentes, comprises entre 97,4 et 100 % (Figure 3). Des LR+ élevés (37,2-95,1), des LR- faibles (0.021-0.228) et des DOR élevés (294,9-3201) étaient observés (**Tableau 8**).

Tableau 8. Performances des troussees de détection norovirus

TROUSSES	VIRUS	NOMBRE TOTAL D'ÉCHANTILLONS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS TESTÉS AVEC LA TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE		RAPPORT DE VRAISEMBLANCE POSITIF		RAPPORT DE VRAISEMBLANCE NÉGATIF		DIAGNOSTIC ODDS RATIO	
			POSITIF	NÉGATIF	LR+	(IC 95%)	LR-	(IC 95%)	DOR	(IC 95%)
Altona RealStar® Norovirus RT-PCR Kit 2.0	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	91.2	(5.8-1439.5)	0.089	(0.037-0.215)	1023.0	(53.6-19526.7)
	GI	99	25	74 ^b	118.3	(7.4-1886.9)	0.213	(0.101-0.447)	555.4	(29.5-10463.7)
	GII	99	26	73 ^c	145.3	(9.2-2301.8)	0.019	(0.001-0.291)	7791.0	(150.8-402617.0)
CerTest Biotec Viasure Norovirus GI + GII Real Time PCR Detection kit	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	91.2	(5.8-1439.5)	0.089	(0.037-0.215)	1023.0	(53.6-19526.7)
	GI	99	25	74 ^b	65.1	(9.2-458.7)	0.122	(0.042-0.352)	535.3	(53.0-5408.5)
	GII	99	26	73 ^c	134.3	(8.5-2132.6)	0.093	(0.029-0.304)	1440.6	(66.8-31052.1)
Primerdesign Genesig® Advanced Kit Norovirus Genogroups 1 and 2	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	91.2	(5.8-1439.5)	0.089	(0.037-0.215)	1023.0	(53.6-19526.7)
	GI	99	25	74 ^b	124.0	(7.8-1975.8)	0.174	(0.075-0.404)	711.9	(36.9-13750.2)
	GII	99	26	73 ^c	137.9	(8.7-2187.0)	0.056	(0.012-0.265)	2465.0	(97.3-62456.1)
R-Biopharm RIDA®GENE Norovirus I & II	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	75.9	(4.8-1201.2)	0.228	(0.137-0.379)	333.2	(19.0-5831.8)
	GI	99	25	74 ^b	88.2	(5.5-1422.9)	0.407	(0.255-0.649)	217.0	(12.1-3902.4)
	GII	99	26	73 ^c	132.5	(8.3-2103.5)	0.093	(0.029-0.304)	1421.0	(65.9-30633.2)
Diagenode G-DiaNota™ Norovirus I/II Rotavirus	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	37.2	(5.4-257.7)	0.021	(0.003-0.143)	1813.0	(109.8-29948.4)
	GI	99	25	74 ^b	30.2	(7.7-118.5)	0.041	(0.006-0.282)	732.0	(63.4-8452.9)
	GII	99	26	73 ^c	5.0	(3.0-8.3)	0.048	(0.007-0.327)	104.2	(12.8-847.0)
Fast-Track Diagnostics FTIyo Viral Gastroenteritis	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	95.1	(6.0-1499.9)	0.030	(0.006-0.144)	3201.0	(127.3-80518.3)
	GI	99	25	74 ^b	139.5	(8.8-2212.5)	0.058	(0.012-0.275)	2401.0	(94.7-60885.6)
	GII	99	26	73 ^c	137.9	(8.7-2187.0)	0.056	(0.012-0.265)	2465.0	(97.3-62456.1)
Immundiagnostik MutaPLEX® GastroSys 1	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	42.1	(6.0-294.2)	0.143	(0.072-0.284)	294.9	(34.9-2494.4)
	GI	NA ^e	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	GII	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Seegene Allplex™ GI-Virus	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	93.1	(5.9-1470.0)	0.069	(0.025-0.191)	1343.6	(67.6-26713.0)
	GI	99	25	74 ^b	129.8	(8.2-2064.8)	0.136	(0.051-0.359)	957.9	(47.7-19248.1)
	GII	99	26	73 ^c	48.4	(9.9-236.2)	0.019	(0.001-0.295)	2561.7	(101.2-64848.3)
Eurobio Ingen EurobioPlex Norovirus GI/GII	NoV GI+GII	99	50	49 ^a	81.4	(5.1-1287.0)	0.188	(0.106-0.334)	432.5	(24.4-7655.0)
	GI	99	25	74 ^b	95.2	(5.9-1531.2)	0.368	(0.222-0.611)	258.8	(14.3-4672.3)
	GII	99	26	73 ^c	139.8	(8.8-2217.2)	0.056	(0.012-0.265)	2499.0	(98.6-63310.5)

a. Les échantillons négatifs en norovirus par la technique de référence et présentant un résultat ininterprétable avec la trousse testée, du fait de la présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR, sont exclus de l'analyse pour R-Biopharm (n=1), Diagenode (n=11) et Fast-track Diagnostics (n=1).

b. 49 échantillons norovirus génogroupe I négatifs et 25 échantillons norovirus génogroupe II positifs inclus. Les échantillons négatifs en norovirus génogroupe I par la technique de référence et présentant un résultat ininterprétable avec la trousse testée, du fait de la présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR, sont exclus de l'analyse pour R-Biopharm (n=1), Diagenode (n=11) et Fast-track Diagnostics (n=1).

c. 49 échantillons norovirus génogroupe II négatifs et 24 échantillons norovirus génogroupe I positifs inclus. Les échantillons négatifs en norovirus génogroupe II par la technique de référence et présentant un résultat ininterprétable avec la trousse testée, du fait de la présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR, sont exclus de l'analyse pour Primerdesign (n=1), R-Biopharm (n=1), Diagenode (n=11) et Fast-track Diagnostics (n=1).

NA : Non applicable (pas de différenciation des norovirus génogroupe I et des norovirus génogroupe II).

Concernant la détection des RVA, les huit troussees évaluées preésentait une sensibilité élevée (94,3-98,1%) et une excellente spécificité (100%) (**Figure 7**). Des LR+ élevés (74,4-97,2), des LR- faibles (0.028-0.065) et des DOR très élevés (1428,4-3465) étaient observés (**Tableau 9**). Ces données indiquaient une association forte entre les résultats des tests RT-PCR évalués et la présence de rotavirus, les tests évalués étaient donc hautement discriminants et adaptés au diagnostic des infections à rotavirus. Les IC 95% de l'ensemble des indicateurs de performance diagnostique se chevauchaient, la performance diagnostique pour la détection des rotavirus était donc similaire pour les huit troussees évaluées.

Tableau 9. Performances de trousse de détection rotavirus

TROUSSES	VIRUS	NOMBRE TOTAL D'ÉCHANTILLONS	NOMBRE D'ÉCHANTILLONS TESTÉS AVEC LA TECHNIQUE DE RÉFÉRENCE		RAPPORT DE VRAISEMBLANCE POSITIF		RAPPORT DE VRAISEMBLANCE NÉGATIF		DIAGNOSTIC ODDS RATIO	
			POSITIF	NÉGATIF	LR+	(IC 95%)	LR-	(IC 95%)	DOR	(IC 95%)
Altona RealStar® Rotavirus RT-PCR Kit 1.0	RVA	102	53	49 ^a	77.8	(4.9-1222.5)	0.028	(0.006-0.136)	2765.0	(109.7-69698.0)
CerTest Biotec Viasure Rotavirus Real Time PCR Detection Kit	RVA	102	53	49 ^a	97.2	(6.2-1533.5)	0.028	(0.006-0.136)	3465.0	(137.9-87077.5)
Primerdesign Genesig® Advanced Kit Human Rotavirus A	RVA	102	53	49 ^a	95.4	(6.0-1504.7)	0.047	(0.014-0.157)	2039.4	(95.5-43553.4)
R-Biopharm RIDA®GENE Viral Stool Panel II	RVA	102	53	49 ^a	93.5	(5.9-1474.1)	0.047	(0.014-0.157)	1998.2	(93.5-42684.7)
Diagenode G-DiaNota™ Norovirus I/II Rotavirus	RVA	102	53	49 ^a	74.4	(4.7-1169.0)	0.047	(0.014-0.157)	1586.2	(74.0-33997.7)
Fast-Track Diagnostics FTIyo Viral Gastroenteritis	RVA	102	53	49 ^a	93.5	(5.9-1474.1)	0.047	(0.014-0.157)	1998.2	(93.5-42684.7)
Immundiagnostik MutaPLEX® GastroSys 1	RVA	102	53	49 ^a	93.5	(5.9-1475.8)	0.065	(0.024-0.180)	1428.4	(71.9-28377.3)
Seegene Allplex™ GI-Virus	RVA	102	53	49 ^a	97.2	(6.2-1533.5)	0.028	(0.006-0.136)	3465.0	(137.9-87077.5)

a. Les échantillons négatifs en rotavirus par la technique de référence et présentant un résultat ininterprétable avec la trousse testée, du fait de la présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR, sont exclus de l'analyse pour Altona (n=10), R-Biopharm (n=1), Diagenode (n=11) et Fast-track Diagnostics (n=1).

Il apparaît que ces performances diagnostiques étaient génogroupe-dépendantes :

- pour le génogroupe I, les sensibilités des trousse R-Biopharm et Eurobio Ingen étaient médiocres (60,0 et 64,0% respectivement) et nettement moins élevées que celles des autres trousse (80,0%-88,0%) et notamment des trousse Diagenode et Fast-Track Diagnostics qui présentaient la meilleure sensibilité (96,0%). Cependant, seule la différence de sensibilité entre le kit R-Biopharm (60,0% ; IC 95% : 38,7-78,9) et les kits Diagenode et Fast-Track Diagnostics (96,0% ; IC 95% 79,6-99,9) était statistiquement significative. Les spécificités étaient quant à elles toutes excellentes (entre 96,8 et 100%).
- concernant le génogroupe II, les sensibilités des trousse étaient élevées et similaires, comprises entre 88,5 pour Immundiagnostik et 100% pour Altona et Seegene. Les trousse présentaient toutes d'excellentes spécificités comprises entre 98,6 et 100%, sauf la trousse Diagenode qui présentait une spécificité médiocre (80,6%), statistiquement différente des autres trousse (pas de chevauchement des IC 95%). De fait, le LR+ de la trousse Diagenode était plus faible (5) que celui des autres trousse (48,4-145,3).

En conclusion, les huit trousse de détection des RVA sont toutes bien adaptées au diagnostic de ces virus dans les selles.

Les trousse Altona, CerTest Biotec, PrimerDesign, Fast-Track Diagnostics, Immundiagnostik, et Seegene sont adaptées au diagnostic des norovirus dans les selles. La sensibilité pour la détection des norovirus génogroupe I de la trousse Eurobio Ingen et surtout de la trousse R-Biopharm, ainsi que la spécificité vis-à-vis des norovirus du génogroupe II de la trousse Diagenode doivent être améliorées avant que ces trousse puissent être utilisées pour le diagnostic routinier des norovirus.

6.1.3 Études épidémiologiques (abstracts)

1/ Dynamics of norovirus genotype change and early characterization of variants in children with diarrhea in central Tunisia, 2001-2012

Abstract: Human noroviruses (HuNoVs), especially GII.4 strains, are a major cause of gastroenteritis epidemics in both children and adults. Stool samples were collected from 113 Tunisian children with acute gastroenteritis in 2001 and 2002 and were retrospectively tested for HuNoVs. Fifteen (13.2%) of the 113 samples were positive for HuNoVs, all of which were genogroup II strains, and the GII.4-2004/Hunter variant was predominant (67%). We reconstituted the temporal circulation of HuNoV strains in central Tunisia between 2003 and 2012 using HuNoV isolates reported in our previous studies.

A comparative analysis showed a dynamic change in the molecular profile of the HuNoV strains over a 12-year period. We found that GII.4-2004/Hunter strains were circulating as early as June 2002 and that GIX.1[*GI.15*] HuNoVs were already circulating four years before this genotype was first reported in Japan in 2006. Our data suggest that epidemic strains of HuNoV circulate for several years in the pediatric population before becoming predominant. This study suggests that children from low-income countries with poor sanitation may play a significant role in the molecular evolution of noroviruses and the global emergence of new epidemic strains.

2/ Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus 1 from Urban Wastewater in Senegal.

Abstract: Aichi virus 1 (AiV-1) has been proposed as a causative agent of human gastroenteritis. In this study, raw, decanted, and treated wastewater samples from a wastewater treatment plant in an urban area of Dakar, Senegal, were collected. AiV-1 was detected in raw (70%, 14/20), decanted (68.4%, 13/19), and treated (59.3%, 16/27) samples, revealing a noticeable resistance of AiV-1 to chlorine-based treatment. Phylogenetic analysis revealed that all sequences clustered within genotype B. Our study presents the first report on the detection of AiV-1 in the environment of Dakar and constitutes indirect evidence of virus circulation in the population.

6.1.4 Études fondamentales et essais cliniques (abstracts)

1/ Attachment to the enterocytes is related to genetic drift for newly emerged GII.17 human norovirus

Abstract: For the last 30 years, molecular surveys have shown that human norovirus (HuNoV), predominantly the GII.4 genotype, is one of the main causative agents of gastroenteritis. However, epidemiological surveys have revealed the worldwide emergence of GII.17 HuNoVs. Genetic analysis confirmed that GII.17 strains are distributed into three variants (i.e., Kawasaki 308, Kawasaki 323, and CS-E1). Here, virus-like particles (VLPs) were baculovirus-expressed from these variants to study putative interactions with HBGA. Qualitative analysis of the HBGA binding profile of each variant showed that the most recent and predominant GII.17 variant, Kawasaki 308, possesses a larger binding spectrum. The retrospective study of GII.17 strains documented before the emergence of the dominant Kawasaki 308 variant showed that the emergence of a new GII.17 variant could be related to an increased binding capacity toward HBGA. The use of duodenal histological sections confirmed that recognition of enterocytes involved HBGA for the three GII.17 variants. Finally, we observed that the relative affinity of recent GII.17 VLPs for HBGA remains lower than that of the GII.4-2012 variant. These observations suggest a model whereby a combination of virological factors, such as polymerase fidelity and increased affinity for HBGA, and immunological factors was responsible for the incomplete and non-persistent replacement of GII.4 by new GII.17 variants.

2/ Specific Norovirus Interaction with Lewis x and Lewis a on Human Intestinal Inflammatory Mucosa during Refractory Inflammatory Bowel Disease

Abstract: Inflammatory bowel disease (IBD), which includes Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), is related to immunological and microbial factors, with the possible implication of enteric viruses. We characterized the interaction between human noroviruses (HuNoVs) and blood group antigens in refractory CD and UC using HuNoV virus-like particles (VLPs) and histological tissues. Immunohistochemistry was conducted on inflammatory tissue samples from the small intestine, colon, and rectum in 15 CD and 9 UC patients. Analysis of the regenerative mucosa of the colon and rectum revealed strong expression of sialylated Lewis a (sLea) and Lewis x (sLex) antigens and HuNoV VLP binding in the absence of ABO antigen expression in both UC and CD. Competition experiments using sialidase, lectins, and monoclonal antibodies demonstrated that HuNoV attachment mostly involved Lea and, to a lesser extent, Lex moieties on regenerative mucosa in both UC and CD. Further studies will be required to understand the implications of specific HuNoV binding to regenerative mucosa in refractory IBD.

Importance Inflammatory bowel diseases (IBD), including Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC), are progressive diseases affecting millions of people each year. Flare-ups during IBD result in

severe mucosal alterations of the small intestine (in CD) and in the colon and rectum (in CD and UC). Immunohistochemical analysis of CD and UC samples showed strong expression of known tumoral markers sialyl Lewis a (CA19.9) and sialyl Lewis x (CD15s) antigens on colonic and rectal regenerative mucosa, concurrent with strong human norovirus (HuNov) VLP GII.4 affinity. Sialidase treatment and competition experiments using histo-blood group antigen (HBGA)-specific monoclonal antibodies and lectins clearly demonstrated the implication of the Lewis a moiety and, to a lesser extent, the Lewis x moiety in HuNov recognition in regenerative mucosa of CD and UC tissues. Further studies are required to explore the possible implications of enteric viruses in the impairment of epithelial repair and dysregulation of inflammatory pathways during severe IBD.

3/ Enteric Viruses and Inflammatory Bowel Disease

Abstract: Inflammatory bowel diseases (IBD), including ulcerative colitis (UC) and Crohn's disease (CD), is a multifactorial disease in which dietary, genetic, immunological, and microbial factors are at play. The role of enteric viruses in IBD remains only partially explored. To date, epidemiological studies have not fully described the role of enteric viruses in inflammatory flare-ups, especially that of human noroviruses and rotaviruses, which are the main causative agents of viral gastroenteritis. Genome-wide association studies have demonstrated the association between IBD, polymorphisms of the FUT2 and FUT3 genes (which drive the synthesis of histo-blood group antigens), and ligands for norovirus and rotavirus in the intestine. The role of autophagy in defensin-deficient Paneth cells and the perturbations of cytokine secretion in T-helper 1 and T-helper 17 inflammatory pathways following enteric virus infections have been demonstrated as well. Enteric virus interactions with commensal bacteria could play a significant role in the modulation of enteric virus infections in IBD. Based on the currently incomplete knowledge of the complex phenomena underlying IBD pathogenesis, future studies using multi-sampling and data integration combined with new techniques such as human intestinal enteroids could help to decipher the role of enteric viruses in IBD.

4/ Free Chlorine and Peroxynitrite Alter the Capsid Structure of Human Norovirus GII.4 and Its Capacity to Bind Histo-Blood Group Antigens

Abstract: Human noroviruses (HuNoVs) are one of the leading causes of acute gastroenteritis worldwide. HuNoVs are frequently detected in water and foodstuffs. Free chlorine and peroxynitrite (ONOO-) are two oxidants commonly encountered by HuNoVs in humans or in the environment during their natural life cycle. In this study, we defined the effects of these two oxidants on GII.4 HuNoVs and GII.4 virus-like particles (VLPs). The impact on the capsid structure, the major capsid protein VP1 and the ability of the viral capsid to bind to histo-blood group antigens (HBGAs) following oxidative treatments were analyzed. HBGAs are attachment factors that promote HuNoV infection in human hosts. Overall, our results indicate that free chlorine acts on regions involved in the stabilization of VP1 dimers in VLPs and affects their ability to bind to HBGAs. These effects were confirmed in purified HuNoVs. Some VP1 cross-links also take place after free chlorine treatment, albeit to a lesser extent. Not only ONOO- mainly produced VP1 cross-links but can also dissociate VLPs depending on the concentration applied. Nevertheless, ONOO- has less effect on HuNoV particles.

5/ Variability in molecular characteristics of Hepatitis E virus quasispecies could modify viral surface properties and transmission

Abstract: Hepatitis E virus (HEV) usually causes self-limited liver diseases but can also result in severe cases. Genotypes 1 (G1) and 2 circulate in developing countries are human-restricted and waterborne, while zoonotic G3 and G4 circulating in industrialized countries preferentially infect human through consumption of contaminated meat. Our aims were to identify amino acid patterns in HEV variants that could be involved in pathogenicity or in transmission modes, related to their impact on antigenicity and viral surface hydrophobicity. HEV sequences from human (n = 37) and environmental origins (wild boar [n = 3], pig slaughterhouse effluent [n = 6] and urban wastewater [n = 2]) were collected for the characterization of quasispecies using ultra-deep sequencing (ORF2/ORF3 overlap). Predictive and functional assays were carried out to investigate viral particle antigenicity and hydrophobicity. Most quasispecies showed a major variant while a mixture was observed in urban wastewater and in one

chronically infected patient. Amino acid signatures were identified, as a rabbit-linked HEV pattern in two infected patients, or the S68L (ORF2) / H81C (ORF3) residue mostly identified in wild boars. By comparison with environmental strains, molecular patterns less likely represented in humans were identified. Patterns impacting viral hydrophobicity and/or antigenicity were also observed, and the higher hydrophobicity of HEV naked particles compared with the enveloped forms was demonstrated. HEV variants isolated from human and environment present molecular patterns that could impact their surface properties as well as their transmission. These molecular patterns may concern only one minor variant of a quasispecies and could emerge under selective pressure.

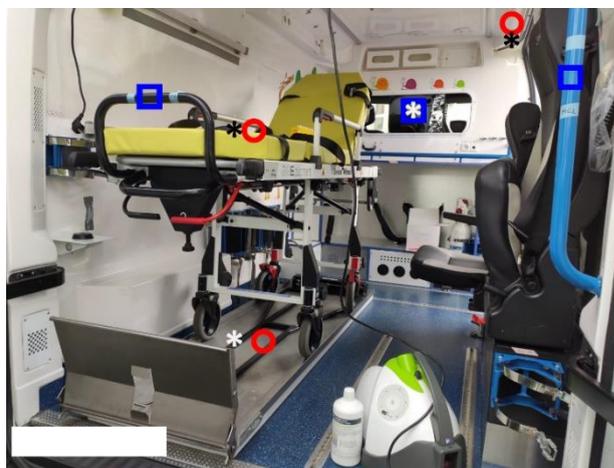
6/ Utilisation d'un nébuliseur de peroxyde d'hydrogène pour la désinfection virale des ambulances et des salles d'attente des hôpitaux (projet Hygée2020)

Objectifs : La désinfection des établissements hospitaliers et des ambulances est un enjeu important pour le confinement du COVID-19. Le peroxyde d'hydrogène a fourni des résultats prometteurs dans les analyses de laboratoire. Nous évaluons l'efficacité d'un nébuliseur de peroxyde d'hydrogène pour la destruction du bactériophage de substitution MS2 et du norovirus murin (MNV) dans une salle d'attente et la cabine entièrement équipée d'une ambulance dans des conditions d'utilisation s'approchant le plus possible de la réalité.

Résumé : Nous avons observé une réduction moyenne du titre de 3 log₁₀ pour les deux virus, ce qui représente la destruction de plus de 10⁶ et 10⁹ particules infectieuses de MNV et MS2 par cm², respectivement. Le potentiel d'exposition virale est élevé pour les agents de santé lors de la désinfection d'espaces confinés et encombrés, de sorte que l'utilisation d'un brouillard de peroxyde d'hydrogène pourrait offrir une solution abordable et efficace pour minimiser le risque de contaminations virales accidentelles. Les espaces confinés et encombrés comme les cabines d'ambulance sont difficiles à désinfecter. Aussi, la technologie du brouillard de peroxyde d'hydrogène apparaît une bonne alternative aux méthodes classiques de désinfection en milieu hospitalier, en particulier pour la désinfection dans les hôpitaux surpeuplés de patient porteurs de SARS-CoV-2.

Ce projet fait partie de la liste des 37 projets « AAP COVID19 » retenus et financés par l'Agence de l'innovation de défense (AID) pour le Ministère des Armées en 2020.

Ci-contre : intérieur de la cabine d'une ambulance d'urgence pédiatrique avec nébuliseur situé dans le coin inférieur droit. Les substituts viraux ont été placés sur l'étagère supérieure, sous et sous la civière (cercle rouge). Le carré bleu indique le balayage pour la détection du génome du SARS-CoV-2. Les astérisques blancs et noirs indiquent les emplacements des bandelettes de test. Certains points désignés pour les bandelettes de test et le balayage ne sont pas visibles sur l'image.



6.2 LISTE DES PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS DU CNR (2021)

6.2.1 Publications internationales

1. **M Estienney**, G Tarris, A Rouleau, S Ayouni, P Daval-Frérôt, LS Aho-Glélé, L Martin, W Boireau, J le Pendu, **A de Rougemont**, **G Belliot**. Attachment to the enterocytes is related to genetic drift for newly emerged GII.17 human norovirus. *Frontiers Microbiol*, 2022.
2. **M Estienney**, P Daval-Frérôt, LS Aho-Glélé, L Piroth, P Stabile, JY Gerbet, R Rouleau, **A de Rougemont**, **G Belliot**. Use of an hydrogen peroxide nebulizer for viral disinfection of emergency ambulance and medical waiting room. *Food Environ Viro*, 2022.
3. K Sdiri-Loulizi, A Khachou, S Ayouni, H Khelifi, D Elhani, **K Ambert-Balay**, A Rhim, J Kaplon, N Sakly, M Aouni, **A de Rougemont**. Dynamics of norovirus genotype change and early characterization of

variants in Tunisian children with diarrhea over a 12-year period. *Archiv Virol*, 2022; 167(1):99-107.

4. C Hartard, H Fenaux, A Gentilhomme, JM Murray, E Akand, E Laugel, S Berger, A Maul, **A de Rougemont**, T Remen, M Bensenane, JP Bronowicki, C Gantzer, I Bertrand, E Schvoerer. Variability in molecular characteristics of Hepatitis E Virus quasi species could modify viral surface properties and transmission. *J Viral Hep*, 2021; 28(7):1078-1090.
5. M Chassaing, G Bastin, M Robin, D Majou, **G Belliot**, **A de Rougemont**, N Boudaud, C Gantzer*. Free chlorine and peroxyxynitrite alter the capsid structure of human norovirus GII.4 and its capacity to bind histo-blood group antigens. *Front Microbiol*, 2021; 12:662764.
6. G Tarris, **A de Rougemont**, M Charkaoui, C Michiels, L Martin, **G Belliot***. Enteric viruses and Inflammatory Bowel Disease. *Viruses*, 2021; 13(1):104.
7. G Tarris, **A de Rougemont**, **MA Estienney**, M Charkaoui, T Mouillot, B Bonnotte, C Michiels, L Martin*, **G Belliot***. Specific Norovirus Interaction with Lewis x and Lewis a on Human Intestinal Inflammatory Mucosa during Refractory Inflammatory Bowel Disease. *mSphere*, 2021; 6(1):e01185-20.
8. O Kebe, MD Fernandez-Garcia, A Fall, H Dia, **M Bidalot**, **K Ambert-Balay**, K Ndiaye. Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus 1 from Urban Wastewater in Senegal. *Intervirology*, 2021;64(2):96-101.

6.2.2 Publications nationales et chapitres d'ouvrages

1. A Huguenin, **A de Rougemont**, T Guillard. Approches syndromiques multiplex pour la prise en charge des diarrhées infectieuses. *La Lettre de l'Infectiologue*, 2021; XXXVII(6).

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, PCAV (« 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 alimentarium* 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 (conchyliculteur) et le Pôle de compétitivité

AQUIMER (Boulogne sur mer).

7.2.3 Collaboration avec l'INRA

Depuis plusieurs années, le CNRVge collabore avec les équipes de l'INRA :

- du Pr. Pierre RENAULT à Avignon sur le devenir des virus des gastro-entérites dans l'environnement et de déterminer comment la transmission alimentaire des gastroentérites virales aiguës est façonnée par les pratiques alimentaires, d'hygiène et de santé et par le devenir du virus dans l'environnement. Ce projet, en partenariat avec un consortium de 12 laboratoires, vise à améliorer l'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA) liés aux infections virales dues à la consommation de légumes-feuilles crus et à l'origine de gastroentérites aiguës, en intégrant toutes les étapes de la production à la consommation des légumes-feuilles.
- du Pr. Harry SOKOL (APHP) à Jouy-en-Josas (équipe MICALIS) sur la transplantation de microbiote fécal (TMF) et le microbiote fécal dans le cadre des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), en particuliers la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Cette collaboration porte actuellement sur deux études TMF (REBALANCE et MIRACLE) portées par l'équipe INRA ainsi que sur l'étude Microbiote portée par l'UMR PAM de Dijon.

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-Franche Comté par le financement d'une thèse de Doctorat d'Université dont le laboratoire a la responsabilité et s'intitulant « Conception de nouvelles pseudo-particules virales hybrides silice-protéine à usage agroalimentaire ».

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 trousse de diagnostic immunochromatographique (ICT) 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 globalement encore pas satisfaisante.

Diagnostic de rotavirus

Contrairement au diagnostic des norovirus, les méthodes d'immunochromatographie sont très satisfaisantes en termes de sensibilité. Nous poursuivons cette veille et développerons des évaluations des trousse de diagnostic par biologie moléculaire.

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. Par ailleurs, des évaluations de leur sensibilité semblent nécessaires pour mieux appréhender ces nouveaux outils.

8.1.2 Développement de techniques

Transferts technologiques et développement du NGS

Fort de nos collaborations, nous avons entrepris depuis quelques années une démarche de développement du **séquençage haut débit** (NGS) pour la détection des virus entériques ARN dans les selles à l'aide de la technologie Illumina. Le CNRVge a acquis une compétence partielle de bio-informatique pour l'analyse des données et peut s'appuyer sur l'expertise de bio-informaticiens de l'INSERM 1231 avec qui nous partageons des locaux. Diverses approches vont être mises en place avec i) une recherche mensuelle/bimestrielle pan-viral ARN dans les selles de patients immunodéprimés, ii) une approche « *whole-sequencing* » des souches d'intérêt, en particulier des norovirus.

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. Le laboratoire possède les plasmides nécessaires (hEV, HuNoV GI/GII, VHA, VHE, RVA, BoV, SaIV, CosV, AiV, hAstV).

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 GEA post-vaccinales. Elle sera généralisée à un plus grand nombre d'échantillons et servira d'étalon pour évaluer les performances de la NGS sur les rotavirus.

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

D'autres virus, plus exotiques, peuvent être impliqués dans les GEA : deux nouveaux genres de *Piriconaviridae* : les cosavirus et les salivirus, et deux nouveaux *Protoparvoviridae*, le bufavirus qui comporte 3 génotypes et le tusavirus. 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. La mise en production de ces techniques est en cours.

Détermination du caractère infectieux des norovirus

Le CNRVge poursuivra le développement de la technique d'amplification des norovirus sur larves de 2-3j

de poisson-zèbres (*Danio rerio*) permettant de déterminer le caractère infectieux des norovirus présents sur ou dans des matrices diverses, dont alimentaires. Une chaîne d'approvisionnement en alevins a été mise en place avec la société AZELEAD basé à Montpellier, en respectant la réglementation en vigueur sur la manipulation de ces animaux. Le CNRvge est maintenant équipé du matériel nécessaire à l'injection du fretin de poisson zèbre et du personnel a été formé à ces techniques. Les premiers résultats sont prometteurs en particulier pour les NoV GII.17, les recherches sont en cours pour les GII.4.

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 dérivées des norovirus humains (*virus like particle* ou 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 dont le bon fonctionnement est assuré par le Pôle de Biologie et les frigoristes du CHU.

Mise à disposition des collections

Les souches virales 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 avec les 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**.

Comme évoqué plus haut, nous travaillons également sur les trousse de diagnostic dit « syndromique ». Nous avons déjà évalué cette technologie (réactif Biofire® de BioMérieux®) sachant

que d'autres réactifs sont ou seront prochainement sur le marché. Outre l'évaluation des performances de ces réactifs, il nous conviendra d'en définir leur utilisation. En effet, le coût élevé de ces tests, oblige les biologistes à en définir les indications et les conditions d'usage. Outre les caractéristiques virologiques des échantillons, nos panels d'évaluation tiendront compte des caractéristiques cliniques et épidémiologiques (patients immunodéprimés, enfants, personnes âgées en institution, etc..). Cette évaluation devrait aboutir à l'écriture d'une procédure à usage interne définissant le bon usage de ces systèmes.

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. Nous avons également une forte demande de transfert de savoir-faire pour des virus substituts des norovirus humains comme le norovirus murin (MNV) et le bactériophage MS2. Ces demandes concernent essentiellement des laboratoires d'analyses environnementales ou agroalimentaires

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 par le passé un contrôle externe des tests rapides par immunochromatographie des rotavirus, l'ANSM s'étant chargée ensuite de la distribution de ces réactifs biologiques aux laboratoires participant à l'évaluation de leur technique. Dans le futur, à la demande de l'agence, nous serions en mesure de préparer à nouveau ce type de contrôle externe pour les rotavirus et pour les norovirus. S'agissant des norovirus, 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

1/ Études épidémiologiques

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.

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. Cette étude est effectuée avec le support technique de l'équipe du Pr SOKOL et de la plateforme MOCALIS de l'INRA de Jouy-en-Josas.

2/ Études fondamentales

Évaluation des systèmes de culture des norovirus : Un des freins à l'étude des norovirus a été pendant longtemps l'absence de système de culture du virus. Le diagnostic moléculaire de ces virus a permis de

grand progrès en recherche mais aussi de développer un diagnostic efficace. En revanche, les troupes disponibles ne permettent pas d'évaluer le pouvoir infectieux de ces virus. Très récemment, deux systèmes de culture des norovirus humains ont été proposés dont les entéroïdes humains pour l'étude de la réplication. Le CNR travaille actuellement à l'évaluation et la faisabilité de ces deux techniques pour évaluer le potentiel infectieux des norovirus en complément avec les technologies que nous avons pu développer avec les VLP.

Expression des HBGA et réponse Th1/Th17 au cours de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) : Ces travaux s'inscrivent dans une orientation plus générale de l'étude des virus entériques dans le cadre des pathologies lourdes. Des travaux sont en cours dans le cadre d'une thèse de doctorat d'université sur l'implication des HBGA sur l'infection des norovirus chez des patients souffrant de rectocolite hémorragique ou de Crohn. 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.

Mécanisme d'infection des norovirus humains du poisson-zèbre : les travaux sur le sujet se poursuivent au laboratoire. Ils ont pour but de déterminer quel HBGA est impliqué dans l'attachement des norovirus humains à l'intestin embryonnaire de la larve. Ces travaux visent également à améliorer la culture des norovirus humains par l'étude des sels biliaires et de lignées de poisson-zèbre OGM déficientes pour la réponse immunitaire.

3/ Études environnementales et agro-alimentaires en collaboration

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.

Persistence des norovirus murins dans l'alimentation des rongeurs : le savoir-faire reconnu du CNRvge sur le modèle MNV va permettre le démarrage d'une étude portant sur la survie du MNV dans les céréales destinées à l'alimentation des rongeurs en laboratoire. Ces travaux, commençant en septembre 2021, se feront en collaboration avec une entreprise française, leader sur le marché.

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 de l'Afrique Sub-Saharienne et du Maghreb** 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 2020. 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 sécurisé des résultats qui permettra de réduire les délais de rendus et d'échange avec nos partenaires. Ce serveur ne pourra pas être mis en place avant le changement du SGL du laboratoire en 2021.

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 et aux Ministères. Sous certaines conditions, nos conseils peuvent être dispensés aux entreprises privées. Le directeur du CNRvge fait partie du comité permanent de sécurité virale de l'ANSM où il apporte son expertise sur les virus entériques notamment dans le cadre des transplantations de microbiote fécal (TMF).

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. Le CNRvge propose à la rentrée 2019 un module d'enseignement « virologie » de 20h dans la formation initiale des ingénieurs agro-alimentaires d'AgroSup Dijon ainsi que 6h dans un M2R international. Certains membres du CNRvge interviennent également dans la formation universitaire. L'enseignement porte en particulier sur le risque virologique associé aux virus des gastro-entérites dans le cadre de licence professionnelle, de Master et de la formation Ingénieur de l'école AgroSup Dijon.