



Centre National de Référence des virus entériques

Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon

**Bilan d'activité 2008
Programme 2009-2010**

Responsable : Professeur Pierre POTHIER

Mars 2009

Centre National de Référence des virus entériques

Laboratoire de Virologie du CHU de Dijon

Site web :

<http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-reference-des-virus-enteriques>

Bilan d'activité 2008 Programme 2009-2010

Responsable : Professeur Pierre POTHIER

Collaborateurs :

Docteur Katia BALAY

Docteur Gaël BELLIOU

Docteur Davide AGNELLO

Docteur Alexis DE ROUGEMONT

Mademoiselle Marie ESTIENNEY

Madame Caroline FONTANA

Monsieur Jérôme KAPLON

Mademoiselle Amandine LAVAUX

Madame Ingrid MARENDA

Mademoiselle Clémence MOREY

Mademoiselle Delphine PLESSE

Mars 2009

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION ET PRINCIPAUX RESULTATS	1
1.1. ETAT DE LA QUESTION ET ENJEUX DE SANTE PUBLIQUE	1
1.2. GASTROENTERITES HIVERNALES INFANTILES	1
1.3. LES « CAS GROUPES » DE GASTROENTERITES	2
1.4. EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES PAYS EMERGENTS.....	2
2. DESCRIPTION DES MOYENS AFFECTES AU CNR VIRUS ENTERIQUES	4
2.1. RESSOURCES HUMAINES	4
2.2. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS	5
2.3. DEMARCHE QUALITE DU CNR (GBEA, accréditation, CRB).....	6
3. ACTIVITE D'EXPERTISE	7
3.1. CAPACITE TECHNIQUE DU CNR.....	7
3.1.1. Liste des techniques de référence disponibles	7
3.1.2. Collection de souches, d'antigènes ou d'anticorps de référence.....	8
3.1.3. Trousses de diagnostic évaluées et recommandées par le CNR.....	9
3.1.4. Evaluation des désinfectants et antiseptiques vis-à-vis du norovirus murin	9
3.2. ACTIVITE D'EXPERTISE EN 2008	10
3.2.1. Investigation virologique d'épidémies ou de cas sporadiques.....	10
3.2.2. Principales souches virales caractérisées dans ces épidémies:.....	10
3.2.3. Caractéristiques des 149 gastroentérites collectives	10
3.2.4. Conclusion des activités d'expertise	11
4. ACTIVITE DE SURVEILLANCE	12
4.1. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES ROTAVIRUS EN MILIEU PEDIATRIQUE	12
4.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	12
4.1.2. Principaux résultats	13
4.2. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES.....	19
4.2.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	19
4.2.2. Caractéristiques des épidémies.....	20
4.2.2.1. <i>Nature et évolution des épidémies</i>	20
4.2.2.2. <i>Virus en cause</i>	22
4.3. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE EUROPEENS.....	25
4.3.1. Réseaux européens* « EVENT », « DIVINE » et « EuroRotanet »	25
4.3.2. Collaborations « Egypte-Tunisie-Maroc »	25
4.4. ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	26
4.4.1. Etude épidémiologique des rotavirus dans les crèches de Lyon.	26
4.4.2. Evaluation des désinfectants et antiseptiques sur le norovirus murin.	26
4.4.3. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique.....	26
5. ALERTE (voir également annexes A)	27
5.1. PROCEDURES D'ALERTE DE L'INVS ET DES AUTRES PARTENAIRES	27
5.1.1. <i>Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR</i> :	27
5.1.2. <i>Annonce d'une épidémie par un email de l'InVS</i> :	27
5.1.3. <i>Annonce d'une épidémie par l'IFREMER ou l'AFSSA</i> :	27
5.1.4. <i>Arrivée de prélèvements sans annonce préalable</i> :	27
5.2. TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA.....	27
5.2.1. Procédures de traitement des prélèvements.....	27
5.2.2. Premières informations.....	27
5.2.3. Protocole d'envoi d'échantillons de selles pour investigation.....	27
5.2.4. Formulaire 1 à 3	27
6. ACTIVITE D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL	28
6.1. PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITE D'EXPERTISE	28
6.2. ACTIVITE DE CONSEIL :	28

6.3. ENCADREMENT DE STAGIAIRES :	28
7. TRAVAUX DE RECHERCHE DECOULANT DE L'ACTIVITE DU CNR	29
7.1. EVALUATION ET MISE AU POINT DE REACTIFS DE DIAGNOSTIC	29
7.1.1. Rotavirus :	29
7.1.2. Norovirus :	29
7.2. EVALUATION DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANTS.....	29
7.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	29
7.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus	29
7.3.2. Epidémiologie moléculaire des virus dans les pays méditerranéens	30
7.3.2.1. Etudes épidémiologiques en Tunisie	30
7.3.2.2. Etudes épidémiologiques en Egypte.....	30
7.4. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE AUX INFECTIONS A ROTAVIRUS.....	30
8. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET CONTRATS.....	31
8.1. PUBLICATIONS.....	31
8.1.1. Publications internationales	31
8.1.2. Publications en langue française	32
8.1.3. Publications didactiques	32
8.1.4. Communications internationales.....	33
8.1.5. Communications nationales	33
8.1.6. Conférences sur invitation	33
8.1.7. Articles soumis à publication	33
8.2. CONTRAT DE RECHERCHE EN RELATION AVEC LES ACTIVITES DU CNR	34
8.3. COLLABORATIONS.....	34
9. PROGRAMME D'ACTIVITE DES ANNEES 2009 ET 2010	36
9.1. MISE AU POINT DE REACTIFS	36
9.1.1. Rotavirus	36
9.1.2. Norovirus.....	36
9.2. CONTAMINATION VIRALE DES MATRICES ALIMENTAIRES	36
9.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES	36
9.3.1. Epidémies de gastroentérites en Etablissements Hébergeant des Personnes Âgées	36
9.3.2. Epidémiologie moléculaire des rotavirus en milieu pédiatrique.....	37
9.3.3. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique	37
9.3.4. Epidémiologie virus des gastroentérites dans le pourtour méditerranéen.	37
9.3.5. Epidémiologie virus des gastroentérites chez les bovins.	38
9.4. ETUDES FONDAMENTALES	38
9.4.1. Etudes des interactions entre norovirus et récepteurs glycanes	38
9.4.2. Etude de la réponse immune aux infections à rotavirus.....	39
10. ANNEXES : FORMULAIRES	40
10.1. ANNEXE A1 :	40
10.2. ANNEXE A2 : premières informations	45
10.3. ANNEXE A3 : Protocoles d'envoi d'échantillons de selles	46
10.4. ANNEXE A4 : Formulaire 1.	47
10.5. ANNEXE A5 : Formulaire 2	48
10.6. ANNEXE A6 : Formulaire 3	49
11. ANNEXES : PUBLICATIONS.....	50

1. INTRODUCTION ET PRINCIPAUX RESULTATS

1.1. ETAT DE LA QUESTION ET ENJEUX DE SANTE PUBLIQUE

Les gastroentérites représentent un problème de santé publique mondial avec une morbidité et mortalité importante. Dans les pays moins avancés sur le plan médical et de l'hygiène les gastroentérites virales sont la cause d'une très forte mortalité avec environ 500 000 décès par an. En France, comme dans les autres pays industrialisés, elles sont la cause d'une importante morbidité ayant des répercussions financières sur les budgets de santé et économiques par les coûts indirects induits.

Ainsi, le problème des gastroentérites virales n'est pas monolithique. Il se pose différemment selon le niveau socioéconomique et d'hygiène du pays et, même pour des pays industrialisés comme la France, il se présente mais se présente sous **deux aspects posant des problèmes de santé publique totalement différents**. Il s'agit d'une part des gastroentérites « endémiques » survenant chaque hiver, touchant principalement les jeunes enfants et largement dues aux rotavirus et d'autre part des épidémies de gastroentérites dans des collectivités, la plupart étant dues aux norovirus.

Le CNR des virus entériques a défini ses actions pour les années 2008 et suivantes autour de trois objectifs principaux de surveillance répondant aux problèmes de santé publique posés par les gastroentérites :

- Les gastroentérites hivernales infantiles avec le souci de répondre aux questions posées par l'introduction de deux nouveaux vaccins.
- Les gastroentérites épidémiques survenant en collectivités en axant plus particulièrement nos efforts sur les gastroentérites survenant en Etablissements Hébergeant des Personnes Agées (EHPAD).
- L'épidémiologie des virus entériques dans les pays en développement, notamment ceux du pourtour méditerranéen et des pays francophones d'Afrique. L'objectif étant d'y déceler des virus émergents susceptibles d'être responsables d'épidémies en France (qu'il s'agisse de nouveaux virus comme le virus Aichi ou de norovirus variants ...).

1.2. GASTROENTERITES HIVERNALES INFANTILES

Les gastroentérites hivernales touchent principalement les enfants. Le principal agent étiologique en est le rotavirus. Contre ces virus, un premier vaccin avait été commercialisé aux USA en 1998, mais il avait été rapidement retiré du marché après la constatation d'une augmentation du nombre d'invaginations intestinales aiguës après son introduction sur le marché.

Deux vaccins sont disponibles en France depuis 2006. L'un est monovalent (RotaRix[®], GlaxoSmithKline) et provient d'une souche humaine atténuée de génotype G1P[8] (ou sérotype G1P1A). Le second est pentavalent (RotaTeq[®], Sanofi Pasteur MSD) ; il est composé de virus bovins recombinants exprimant les protéines de surface de rotavirus humains VP7 de génotype G1, G2, G3, G4 et VP4 de génotype P[8] (ou sérotype P1A). Les essais cliniques puis leur large utilisation ont montré leur innocuité et leur efficacité pour la protection des diarrhées sévères.

Mais si les résultats d'efficacité sont très encourageants vis-à-vis des souches les plus répandues en Europe et aux USA, notamment la souche G1P[8] largement représentée dans les populations étudiées, leur efficacité vis-à-vis des souches plus rares ou

inhabituelles, non incluses dans le vaccin, est à démontrer sur le long terme. La moindre efficacité du vaccin monovalent (G1P;[8]) sur la souche G2;P[4] pourrait le faire craindre.

Le CNR des virus entériques réalise un suivi épidémiologique depuis l'hiver 2004/2005, **les principaux résultats obtenus de 2004 à 2008 ont montré :**

- L'émergence en 2004/2005 des souches de **génotype G9;P[8]** et, depuis cette date, leur installation comme principale souche circulante au même niveau que le génotype G1;P[8] avec cependant **des fluctuations importantes dans le temps et selon les régions.**
- La circulation de souches de génotypes ou de combinaisons inhabituels, certaines de ces **souches pouvant être d'origine animale ou résulter de réassortiments entre souches humaines et animales.** Ces souches représentent environ 2% de l'ensemble des souches circulantes il s'agit principalement des génotypes G8 et G12.

1.3. LES « CAS GROUPES » DE GASTROENTERITES

Les cas groupés de gastroentérites virales touchent toutes les tranches d'âge de la population. Classiquement d'origine alimentaire ou hydrique, il s'avère que la majorité de ces épidémies sont transmises de personne à personne et touchent plus particulièrement les personnes âgées en établissement.

Le CNR des virus entériques en collaboration avec l'InVS, les CIRE et les DDASS réalise les investigations virologiques s'intégrant dans la prise en charge épidémiologique globale de ces épidémies.

Les principaux résultats obtenus en 2008, confrontés à ceux des autres laboratoires du réseau européen, montrent :

- **La très grande fréquence de ces épidémies chez les personnes âgées en EHPA** qui est très probablement la cause d'une surmortalité, non encore chiffrée.
- Outre le mode de transmission de personne à personne, ces épidémies se distinguent par le virus en cause, un norovirus du génogroupe II et du génotype 4 (GGII.4). Ces norovirus GGII.4 possèdent une étonnante capacité évolutive marquée par **l'apparition de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies.** Ce fut le cas en 2002 (*Lopman et al, 2004*), puis en 2004. En 2006 nous avons identifié 2 nouveaux variants (dénommés 2006a et 2006b) circulant conjointement, en 2007 le variant 2006b est devenu prédominant. Un nouveau variant est apparu en 2008 qui est resté minoritaire et n'a pas supplanté la souche précédente. Comprendre les mécanismes de cette évolutivité sera un de nos objectifs pour les années à venir.

Parallèlement à cette activité de surveillance des épidémies, le CNR a mis au point une méthode d'évaluation des désinfectants et antiseptiques habituellement utilisés dans les établissements de soins et d'hébergement. Les **solutions hydro alcooliques, largement utilisées, ont une activité virucide sur les norovirus variable selon les produits**, certaines solutions ont une activité virucide insuffisante.

1.4. EPIDEMIOLOGIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES PAYS EMERGENTS

Les infrastructures sanitaires, l'hygiène et la qualité de l'eau sont responsables d'un « risque fécal » accru rendant la problématique des gastroentérites totalement différente de celle que l'on connaît en France.

Le CNR a participé à plusieurs programmes de recherche virologique dans le domaine de la santé et de l'environnement en Tunisie et en Egypte. Ces études ont été étendues au Sénégal.

Les principaux résultats obtenus jusqu'à présent sont :

- La **formation de 2 étudiants**, l'une a soutenue sa thèse en janvier 2009, la seconde devrait la soutenir d'ici la fin de l'année 2009. Nous avons également accueilli une étudiante iranienne et prochainement une étudiante d'Arabie Saoudite.
- Une meilleure connaissance de l'épidémiologie des virus entériques notamment les norovirus et les virus Aichi.
 - o **Les infections à norovirus** ont dans ces pays une **incidence élevée** et une **gravité** égale à celles des infections à rotavirus, contrairement à ce que nous avons observé en France.
 - o Il existe une **diversité des souches de norovirus** et certaines pourraient être potentiellement émergentes en Europe ; L'analyse génétique de souches égyptienne isolées en 2006-2007a permis de caractériser un variant qui pourrait être à l'origine du variant 2008.
 - o **L'incidence des infections à virus Aichi est beaucoup plus élevée** que celle observée en France où ces infections sont rares, pratiquement limitées aux gastroentérites liées à la consommation d'huîtres. Nous avons caractérisé un troisième génotype, dénommé C, qui serait présent principalement en Afrique subsaharienne de l'Ouest.

Les travaux du CNR réalisés en 2008 ont fait l'objet de **15 publications dans des journaux internationaux à comité de lecture, 3 publications dans des journaux nationaux et 4 publications didactiques. Le CNR virus entériques est impliqué dans 2 contrats européens et 2 contrats ANR.**

2. DESCRIPTION DES MOYENS AFFECTES AU CNR VIRUS ENTERIQUES

2.1. RESSOURCES HUMAINES

Responsable du CNR des virus entériques :

POTHIER Pierre, Professeur des Universités-Praticien hospitalier, Chef du service de Virologie Médicale du CHU de DIJON.

Biologistes (total : 3,8 ETP) :

Personnel permanent : total 3,3 équivalent temps plein (ETP)

POTHIER Pierre : Médecin biologiste, virologie médicale, responsable du CNR, coordonnateur des réseaux nationaux, européens et internationaux. Suivi des épidémies. Rotavirus, calicivirus et autres virus entériques.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,5 ETP

BALAY Katia : PhD, Biologiste contractuel. Biologie moléculaire, Microscopie électronique. Calicivirus et autres virus entériques. Suivi des épidémies, banque de données européenne. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,8 ETP.

BELLIOT Gaël : PhD, Biologiste contractuel. Biologie moléculaire. Calicivirus, astrovirus et autres virus entériques. Suivi des épidémies, des réseaux européens et des relations avec le CDC. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

AGNELLO Davide : Pharmacien biologiste, Assistant Hospitalo-Universitaire. Immunologie, biologie moléculaire. Rotavirus, calicivirus. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Personnel temporaire : 0,5 ETP

DE ROUGEMONT Alexis : Médecin biologiste, Assistant Hospitalo-Universitaire. biologie moléculaire. Rotavirus, calicivirus. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,5 ETP.

Techniciens (total : 6 ETP) :

Personnel permanent : total 3ETP

KAPLON Jérôme : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

LAVAUUX Amandine : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

MARENDA Ingrid : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Personnel temporaire : 3 ETP

ESTIENNEY Marie : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

FONTANA Caroline : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

MOREY Clémence : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Secrétariat, agent technique (total : 0,7 ETP)

PLESSE Delphine : Secrétariat, gestion administrative : 0,5 ETP.

Agent technique (personnel hospitalier indifférencié : 0,2 ETP).



Figure 1 : Plan du laboratoire de virologie et place des activités liées au CNR « virus entériques ». Dans la zone biologie moléculaire microbiologie, le CNR dispose de pièces communes avec les autres activités de virologie, il s'agit des pièces de préparation des « mixt », d'extraction et celles des thermocycleurs. En post PCR, les pièces 1a sont dédiées au CNR et les pièces 2 et 3 sont partagées avec les autres activités de virologie.

2.2. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS

a. Les locaux

Le laboratoire de virologie et le CNR des « virus entériques » sont situés au du Plateau Technique de Biologie, 2 rue Angélique Ducoudray, bâtiment regroupant tous les laboratoires du CHU de Dijon et l'EFS Bourgogne-Franche Comté.

La surface totale du laboratoire de virologie est d'environ 500 m² et se localise au 1^{er} étage. La réception des prélèvements, les salles de réunion se situent au rez-de-chaussée.

Les surfaces dédiées au laboratoire de virologie sont représentés en ocre clair sur le plan de la figure 1. Ces pièces sont climatisées et se décomposent ainsi :

- Bureaux spécifiques pour la virologie : 6 bureaux soit 54 m² dont 18 m² spécifiques pour le CNR.
- Virologie classique, culture de cellules, de virus : 3 pièces dont une en surpression, soit 60 m² en grande partie dédiées au CNR.
- Biochimie, immunologie : 2 pièces soit 50 m² pour moitié dédiées au CNR.
- Pièces pour les ultracentrifugeuses, l'immunofluorescence.
- Zone de biologie moléculaire commune pour les services de microbiologie dont l'activité CNR :
 - Pièces Pré PCR : préparation des « mixt », pièces d'extraction.
 - Pièces pour thermocycleurs.
 - Pièces post-PCR dont 2 sont exclusivement dédiées aux activités du CNR.

Autres locaux disponibles :

Laboratoire L3 : 30 m² ; Cytométrie en flux, 1 pièce de préparation et une pièce d'analyse: environ 30 m².

Secrétariat commun.

Laverie commune.

b. Les équipements

Tout l'équipement nécessaire pour la biologie moléculaire :

Amplificateurs classiques et temps réel, électrophorèse, lecteurs de gel, salles pré et post PCR.

Extracteur automatique d'acides nucléiques (BioMérieux et Beckmann).

Ultracentrifugeuses.

Appareils d'immuno-analyse (ELISA).

Immunofluorescence, appareil pour ELISPOT ;

Tout l'équipement pour la culture de cellules et l'isolement de virus:

Hotte à flux laminaire, étuves, incubateurs à CO₂.

Salle propre en surpression de type L2.

Laboratoire de type L3 et son équipement.

Séquenceur (en service commun).

Animalerie (service commun).

Accès au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Dijon (Centre Ferdinand Cabanne).

2.3. DEMARCHE QUALITE DU CNR (GBEA, accréditation, CRB)

Le CNR des virus entériques est associé aux activités d'analyse du laboratoire de virologie et de sérologie du CHU de Dijon et entre donc, dans le cadre de leurs activités communes, dans la démarche de qualité des analyses de biologie moléculaire au sein du laboratoire.

En complément de ces activités de diagnostic, les analyses spécialisées effectuées au sein du CNR des virus entériques sont régies par des procédures et modes opératoires du GBEA qui lui sont propres. Cette activité d'expertise est aussi soumise à un **contrôle de qualité rigoureux et systématique** afin de garantir les résultats rendus par le CNR des virus entériques. Dans ce même souci de qualité, le CNR des virus entériques participe tout au long de l'année à des **contrôles de qualité externes** spécifiques. Ces contrôles de qualité sont organisés par le réseau européen de laboratoires spécialisés que nous avons constitué. Deux types de contrôle de qualité ont été mis en place, l'un concerne la détection et la caractérisation des **calicivirus humains** et est géré par le RIVM aux Pays Bas, l'autre concerne la détection et la caractérisation des **rotavirus** et est géré le Laboratoire spécialisé du Public Health Agency en Grande Bretagne. En 2008, le CNR des virus entériques a participé à un contrôle de qualité pour chacun de ces virus.

Enfin, toujours dans son approche de qualité, le CNR des virus entériques a décidé de s'engager sur la voie de l'accréditation Cofrac ISO/CEI 17025 pour l'horizon 2010

3. ACTIVITE D'EXPERTISE

3.1. CAPACITE TECHNIQUE DU CNR

3.1.1. Liste des techniques de référence disponibles

Nous disposons de toutes les techniques de **biologie moléculaire** permettant le diagnostic et la caractérisation génotypique des norovirus, sapovirus, rotavirus (groupe A et C), adénovirus, astrovirus, Aichi virus, Torovirus et Coronavirus. Ces techniques reposent sur l'amplification par RT-PCR ou PCR suivie d'un « séquençage » de la (ou des) portions génomiques amplifiées. Les analyses phylogénétiques des souches sont réalisées à l'aide de logiciels tels que « CodonAligner » et « Bionumériques » avec une base de données constituée de toutes les souches caractérisées dans le cadre du réseau européen, base de données qui est continuellement mise à jour.

- Nous disposons également des techniques de **RT-PCR en temps réel** pour les rotavirus.
- Nous avons développé des techniques de **quantification virale par PCR en temps réel pour les norovirus murin, les norovirus GGI et GGII ainsi que pour les rotavirus**. Ces techniques de quantification nous sont indispensables pour apprécier la diminution de la « charge virale génomique » après traitement in vitro (essai sur les désinfectants et antiseptiques) ou in vivo chez la souris (essai de protection par immunisation ou autre traitement). Ces techniques de PCR temps réel étaient parfaitement maîtrisées pour la détection des norovirus humains GGII. Pour les norovirus humains GGI, leur optimisation a été réalisée durant l'année 2008. Elles pourront alors être utilisées dans l'analyse des selles humaines soit en première intention pour avoir un résultat plus rapidement, soit comme technique complémentaire lorsque les techniques classiques n'ont pas permis la détection du virus.
- Nous maîtrisons les techniques de **culture du norovirus murin** et nous utilisons ce virus très proche des norovirus humains comme substitut dans l'évaluation des désinfectants et antiseptiques.
- Nous avons adapté les nouvelles souches de **virus Aichi** en culture sur cellules afin d'obtenir des quantités suffisantes pour sa caractérisation. Aujourd'hui, nous avons une collection des différentes souches et un stock d'antigène pour la réalisation de **tests sérologiques Aichi virus** nécessaires aux enquêtes de prévalence que nous conduisons en France et dans les pays du bassin Méditerranéen ou d'Afrique.
- Nous disposons de toutes les techniques immunologiques (ELISA, **Cytomètre en flux, ELISPOT**) pour détecter les antigènes de virus ou réaliser des études sur la réponse immune aux infections entériques.
- Par ailleurs, nous avons accès à un service de **microscopie électronique** par une convention entre le CHU et l'INRA.
- Outre la PCR temps réel pour les norovirus humains GGI et GGII, nous adaptons cette technique à la détection d'autres virus entériques, notamment les **adénovirus**.
- Nous adaptons nos techniques de biologie moléculaire (RT-PCR) à la détection de virus animaux, essentiellement rotavirus et calicivirus bovins, dans le cadre de la détection d'éventuelles transmissions zoonotiques.

3.1.2. Collection de souches, d'antigènes ou d'anticorps de référence

Collection de souches ou prélèvements.

- Notre **collection de souches** est importante en quantité et en diversité. Elle comprend :
 - environ 1000 souches de rotavirus ;
 - environ 1000 souches de norovirus ;Toutes ces souches sont parfaitement caractérisées sur le plan génétique. Elles représentent pratiquement tous les génotypes connus.
- Elle comprend également :
 - Plus de 30 souches de sapovirus avec une diversité de génotypes ;
 - la plus importante collection de souches d'Aichivirus. Nous fournissons plusieurs laboratoires en Europe et dans le reste du monde en réactifs de référence.

Au total, notre collection comprend la plupart des génotypes de norovirus et de rotavirus détecté chez l'homme et une grande variété de souches de sapovirus, d'astrovirus et d'Aichi virus. Cette collection nous permet, entre autre, l'évaluation des nouveaux réactifs ainsi que la fourniture de contrôles externes aux laboratoires français souhaitant développer le diagnostic de ces virus entériques.

L'ensemble des caractéristiques des virus de notre collection est inclus dans une **banque de données européenne** (séquences génomiques, localisation de l'épidémie, origine de la contamination). Outre l'entrée de ces données, notre participation concerne la vérification et la comparaison des séquences génomiques de cette banque de données avec les virus caractérisés dans notre laboratoire.

Collection de gènes clonés et de pseudo particules virales (VLPs).

- La plupart des virus responsables de gastroentérites ne se multiplie pas sur cellules – ou pour certains difficilement - et ne peuvent donc être purifiés et concentrés. Pour les souches d'intérêt qui risqueraient de ne plus être disponibles après épuisement du prélèvement, nous avons développé un programme de **clonage de leur génome** afin de les conserver sous forme de **plasmide**. Nous pouvons ainsi disposer d'une source inépuisable du matériel génétique des souches virales d'intérêt.
- Concernant les norovirus humains, nous avons entrepris un programme d'expression du gène codant la protéine de capsid afin de fabriquer des **pseudo-particules recombinantes de norovirus (VLPs)**. Nous disposons des VLPs de plusieurs souches de norovirus GGII.4 : une souche isolée en 1995 et les nouveaux variants apparus depuis 2004. Par mutagenèse dirigée, nous avons obtenus différents mutants au niveau du site putatif d'attachement.

Collection d'anticorps monoclonaux.

- **Anticorps monoclonaux anti rotavirus** : Nous disposons d'une collection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines VP6 et VP4 du rotavirus. Ces anticorps monoclonaux sont utilisés en diagnostic dans certains réactifs commercialisés.
- En collaboration avec BioMérieux, nous développons un programme de fabrication d'anticorps monoclonaux dirigés contre les norovirus humains à partir des pseudo-particules (VLP) précédemment citées. Nous disposons de 7 anticorps monoclonaux obtenus à partir des génogroupes I et II (GGI et GGII). Ces anticorps seront utilisés (1)

pour l'étude de l'évolutivité des souches de génogroupe II et de génotype 4 (GGII.4) et (2) pour le développement d'un réactif de diagnostic par immuno-chromatographie.

Conditions de mise à disposition des souches.

• **Nos prélèvements sont conservés en aliquotes à -40°C ou -80°C et disponibles gratuitement à tous les laboratoires publics ou privés** qui en feraient la demande. Ainsi, durant l'année 2008 nous avons transmis des souches parfaitement caractérisées à plusieurs laboratoires en et à l'étranger.

3.1.3. Trousses de diagnostic évaluées et recommandées par le CNR

Diagnostic des rotavirus humains.

Durant l'année 2008, nous avons évalué et comparé les différentes trousses de détection des rotavirus par immuno-chromatographie. Les plus récemment évaluées sont celles des sociétés Covalab, Coris Bioconcept et Inverness medical.

Diagnostic des norovirus humains.

Dans le cadre d'une expertise européenne impliquant les laboratoires de notre réseau, nous avons évalué les deux trousses de détection des norovirus par ELISA actuellement commercialisées, les réactifs Rd Biopharm et Oxoid. En 2008, nous avons évalué un réactif de diagnostic par immuno-chromatographie développé par Rd-Biopharm. Nous avons trouvé une sensibilité d'environ 78,9% pour les génotypes GGII.4 mais une très faible sensibilité pour les autres génotypes de norovirus.

3.1.4. Evaluation des désinfectants et antiseptiques vis-à-vis du norovirus murin

Nous avons utilisé le norovirus murin (MNV) comme substitut aux norovirus humains pour évaluer différents antiseptiques et désinfectants et en premier lieu les solutions hydro-alcooliques qui sont largement utilisées dans les établissements de soins. Les résultats ont montré que pour ces produits il existe grande variabilité d'efficacité selon leur marque et leur composition. De plus, l'évaluation de ces produits par la quantification génomique résiduelle n'a aucun intérêt puisque le génome viral reste présent sur les surfaces ou dans les liquides analysés alors qu'il n'y a plus de virus infectieux. Ces résultats ont été publiés et communiqués dans plusieurs congrès ou colloques destinés des cliniciens.

Ce travail a montré notre capacité à évaluer l'efficacité de produits, de traitements ou de procédés divers sur les norovirus humains. La maîtrise de ce savoir faire nous permet de collaborer avec différents laboratoires publics ou privés dans le cadre de contrats ANR (ADHERESIST et SPICECLEAN).

3.2. ACTIVITE D'EXPERTISE EN 2008

3.2.1. Investigation virologique d'épidémies ou de cas sporadiques

- Dans la quasi-totalité des épidémies, l'alerte a été effectuée par l'InVS et les DDASS concernées. Les souches ont été transmises par les laboratoires publics ou privés. L'acheminement a été effectué par voie postale dans la plupart des cas et les frais étaient remboursés au laboratoire expéditeur ou plus rarement – lorsque le nombre de prélèvements le justifiait - par un transporteur agréé ayant une convention avec le CNR (société TSE).
- Durant l'année 2008 nous avons expertisé 149 épidémies se répartissant sur l'ensemble du territoire. Ces épidémies représentent 674 prélèvements dont 592 ont été analysés, 317 étaient positifs pour au moins un des virus entériques.
- Une partie des épidémies provenait d'une étude initiée par le « GROG-géronto » (Dr Philippe Gaspard) sur une cohorte de 97 établissements (EHPA ou EHPAD). Les résultats préliminaire de cette étude seront présentés dans le chapitre 4 « activités de surveillance ».

Epidémies 2008	Virus	Aichi	Adéno	Astro	Noro	Sapo	Rota A	Rota C	Entéro	HAV	Agent inconnu ou non viral
Nbre: 149	Nbre épidémies concernées	2	0	2	117	4	3	0	2	0	27
	Monoinfections			2	110		2		1		
	Infections mixtes	2			7	4	1				

Tableau 1 : Epidémies investiguées et virus recherchés et caractérisés.

3.2.2. Principales souches virales caractérisées dans ces épidémies:

Total des virus recherchés : 3014 /Total des virus caractérisés : 329

- **Norovirus** : 312 souches caractérisées, principalement des norovirus du génogroupe II dont :
 - GGIIb :
 - 13 GGIIb avec capsid e proche de la souche Toronto
 - GGII.4 :
 - 195 GGII.4 variant 2006b (80 épidémies)
 - 36 GGII.4 variant 2006a (13 épidémies)
 - 39 GGII.4 variant 2008 (9 épidémies).

Durant l'année 2007, les variants GGII.4 2006a et b ont circulé en parallèle avec une prédominance du variant 2006b. Dès janvier 2008 est apparu un nouveau variant, dénommé le variant 2008, qui est resté minoritaire et ne peut donc expliquer l'augmentation des épidémies investiguées. .

3.2.3. Caractéristiques des 149 gastroentérites collectives

• **Lieu de l'épidémie**

Dans la plupart des cas (100/149 soit 67,1%) ces épidémies survenaient en **maisons de retraite**. Les autres origines étaient : une école ou une crèche (9 soit 6%), un service hospitalier (13 soit 8,7%), un restaurant, hôtel ou traiteur (7 soit 4,7%), un centre de loisirs (5 soit 3,3%), familiale (4 soit 2,7%).

- **Mode de transmission**

La transmission était de **personne à personne pour 66 épidémies** (soit 44,3%). Une **origine alimentaire a été prouvée pour 24 épidémies** (16,1%). Pour 59 épidémies, le mode de transmission ne nous a pas été communiqué ou était inconnu (39%). Enfin, une épidémie avait une origine hydrique.

- **Virus en cause**

- Dans **117 épidémies (78,5%) un norovirus** était retrouvé seul ou associé avec un ou plusieurs autres virus.
- Dans 110 (73,8%) des 149 épidémies, le seul virus en cause était un **norovirus**.
- Dans deux épidémies on a retrouvé de l'astrovirus dans le prélèvement ou 1 des 3 adressés au CNR.
- Dans une autre de l'entérovirus a été détecté dans le seul prélèvement adressé au CNR.
- Pour 2 épidémies, le seul virus retrouvé était un rotavirus.
- Dans 7 autres épidémies (4,1%) un **norovirus retrouvé était associé** à un ou plusieurs autres virus (Sapovirus(4), Aichivirus (2) ou rotavirus (1)).
- Un **virus Aichi** a été retrouvé dans 2 épidémies : 1 épidémie avait pour origine la consommation d'huîtres et l'autre une contamination de l'eau de distribution. Le virus Aichi était associé aux norovirus.
- Quatre épidémies étaient associées à un **sapovirus** (GGI.2)
- Enfin pour 27 épidémies (18,1%) nous n'avons pas retrouvé de virus.

- **Evolution depuis 2005**

Grâce à l'action de l'InVS et des DDASS il y a aujourd'hui une meilleure investigation virologique des épisodes de gastroentérites collectives. On passe ainsi de **23 épidémies investiguées en 2005 à 70 en 2006, 73 en 2007 et 149 en 2008**. Cette augmentation est également relevée pour les épidémies survenant en maison de retraite : 10 épidémies (43,5%) en 2005 à 100 épidémies (67,1%) en 2008.

3.2.4. Conclusion des activités d'expertise

- Les **norovirus sont la première cause des gastroentérites collectives** investiguées dans notre laboratoire et dans la grande majorité des cas il s'agit de norovirus appartenant au génogroupe II et plus précisément au génotype 4 (**GGII.4**). Souvent cette souche est responsable d'épidémies survenant en **maison de retraite** avec comme mode de contamination la transmission de personne à personne. Une origine alimentaire a pu être identifiée dans 16,1% des épidémies (23/73).

En 2008, nous n'avons à investiguer une épidémie d'origine hydrique, liée à une contamination du réseau de distribution.

On constate une augmentation régulière des investigations virologiques, l'effort de déclaration doit être poursuivi et étendu sur l'ensemble du territoire national et principalement dans les maisons de retraite.

- Le second point devant être souligné est la très **grande capacité évolutive des norovirus GGII.4**. Les variants apparus en 2006 (GGII.4-2006a et 2006b) ont prédominé durant l'année 2007. En 2008, le variant 2006b est devenu majoritaire et est apparu un nouveau variant GGII.2008 qui est toutefois resté très minoritaire. Comprendre les raisons de l'évolutivité des souches GGII.4 est un des objectifs principaux de nos travaux de recherche.

4. ACTIVITE DE SURVEILLANCE

4.1. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES ROTAVIRUS EN MILIEU PEDIATRIQUE

4.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

Nous avons mis en place dès 2001 une procédure de surveillance moléculaire des souches de rotavirus en milieu pédiatrique en prévision de la prochaine disponibilité de vaccins anti-rotavirus. Celle-ci impliquait deux établissements depuis 2001, le CHU de Dijon, le et l'Hôpital Saint Vincent de Paul à Paris.

En 2004, 2005 et 2006 nous avons ajouté le CHU de Limoges et à partir du dernier trimestre 2006, une étude plus large a été commencée incluant 7 CHU de province et 3 établissements de l'Assistance Publique de Paris (figure 2). S'ajouteront pour les années 2008-2009 le CHU de Nice et un groupement de laboratoires privés de la région parisienne (Val de marne) et de la région dijonnaise.

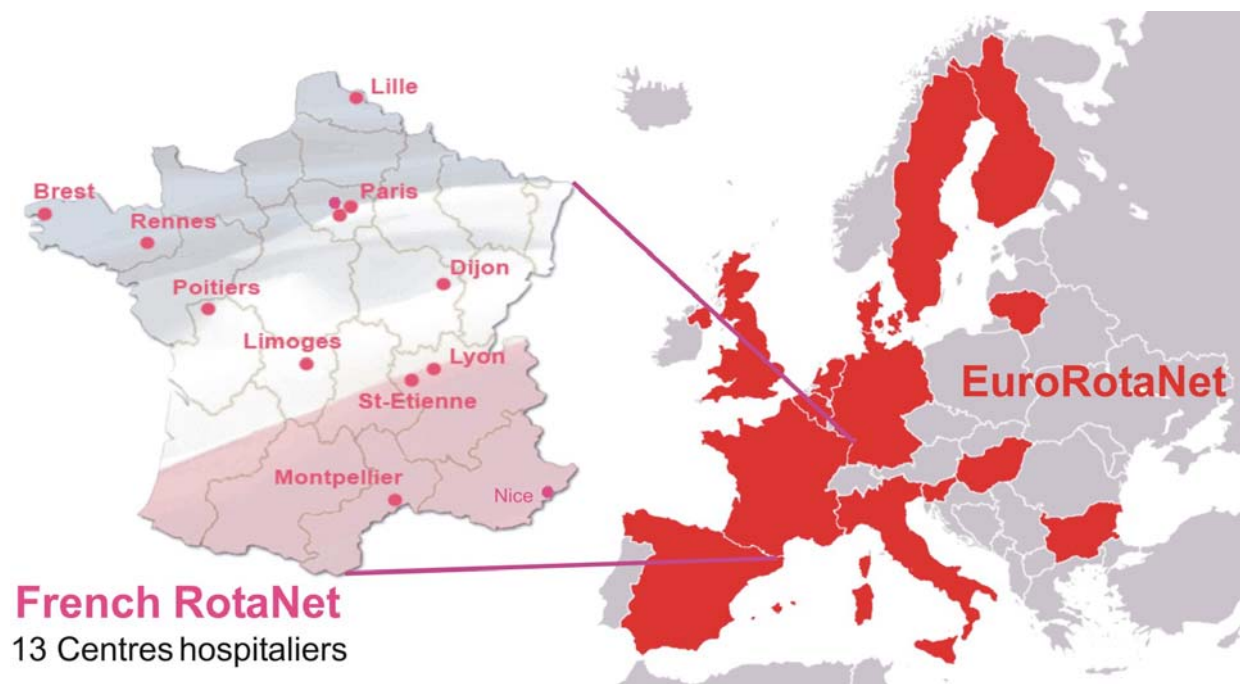


Figure 2 : Répartition des centres participant à l'étude rotavirus en milieu pédiatrique

Services concernés pour le recrutement des enfants :

- Services des urgences pédiatriques
- Services de pédiatrie générale ou de pédiatrie infectieuse.
- Services de néonatalogie
- Consultations

Les services de virologie de chaque centre étant chargés de collecter les prélèvements

Ce réseau national est connecté à un plus large réseau européen – EuroRotanet - calqué sur le réseau déjà mis en place avec le programme « EVENT ».

4.1.2. Principaux résultats

Lors d'une précédente étude réalisée sur 3 sites (Dijon, Limoges et Paris-Saint Vincent de Paul) nous avons montré l'émergence du génotype G9 durant la saison 2004-2005. L'année suivante, le génotype G1 était redevenu prédominant mais on constatait une variation importante de la répartition des génotypes selon les sites et globalement la forte prévalence du génotype G9;P[8].

Nous avons également observé 6 génotypes ou association de génotypes inhabituels : G12;P[6] et G12;P[8], G8;P[6] et G8;P[8]). Pour une de ces souches G8 et une autre souche non typable l'analyse génétique des gènes codant VP6 et NSP4 révèle une origine bovine.

Ainsi, le génotype G9, jusque là peu présent en France, avait émergé et devait désormais être considéré comme un génotype important pour l'avenir. En outre, la présence de souches d'origine animale ou de combinaisons G/P inhabituelles, tout en restant très largement minoritaire, devait faire craindre à terme l'émergence de nouveaux génotypes malgré la vaccination ou sélectionnées par la pression vaccinale.

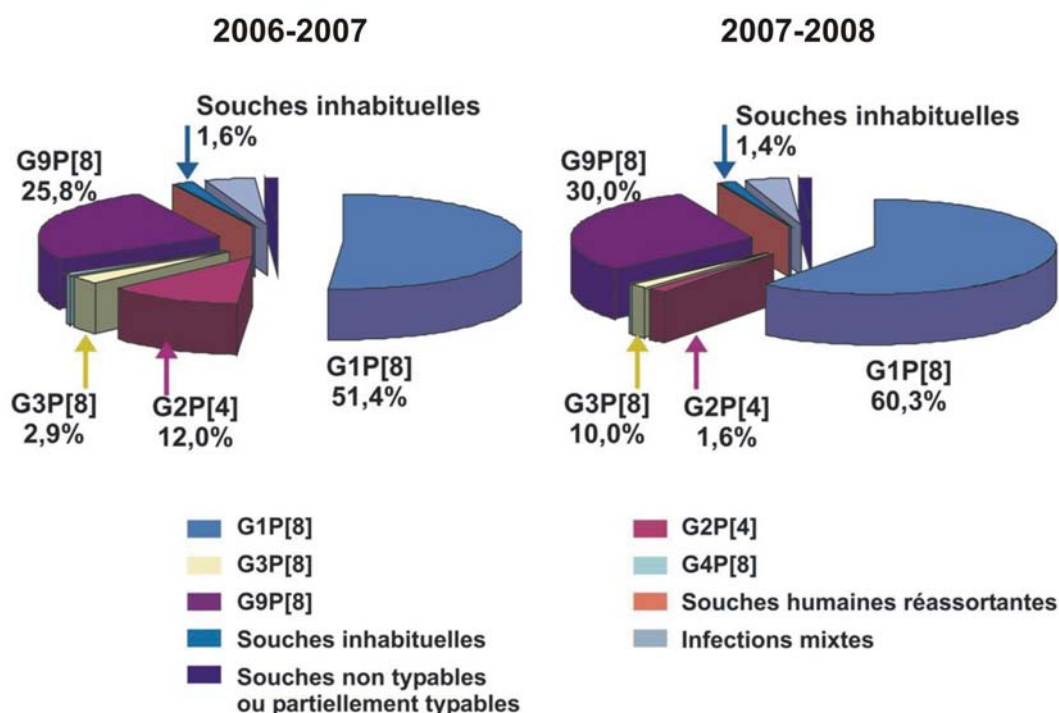
Cette étude préliminaire a été suivie par une étude plus large sur l'ensemble du territoire et intégrée dans une étude européenne par nos partenaires au sein du réseau « EuroRotanet » financé Sanofi Pasteur-MSD.

Les deux premières années (2006 à 2008) de cette étude a impliqué onze CHU répartis sur l'ensemble du territoire (Figure 2) et a analysé 1096 selles positives pour rotavirus provenant d'enfant de moins cinq ans. Les résultats virologiques du CNR sont représentés dans le tableau 2 et la figure 3. Les principales combinaisons de génotypes G/P durant ces deux années **G1;P[8] (56,1%)** suivie de **G9;P[8] (27,9%), G2;P[4] (6,5%)**. Les autres combinaisons classiques ont été relativement rares : G3;P[8] (2,3%) et G4;P[8] (0,5%). Les infections associant plusieurs génotypes (infections mixtes) ont représenté 4,2% soit 46 prélèvements. Globalement sur l'ensemble de la France, le pic des infections à rotavirus semble varier selon les années sans que cela puisse être attribué à la prédominance d'un génotype particulier (figure 4). Cependant, ce schéma global ne reflète pas nécessairement la situation de chacun des centres.

Il existe une **grande variabilité dans le temps** de la répartition des combinaisons génotypiques (figures 5, 6a et 6b). Cependant, l'incidence du génotype G9;P[8] reste élevée depuis son émergence durant la saison 2004-2005 (figure 5 et 6a) et cette variabilité concerne presque exclusivement les génotypes G (figure 6a), les génotypes P sont beaucoup plus stables dans le temps (figure 6b).

Il existe une **grande variabilité géographique** de la répartition des combinaisons génotypiques (figures 7 et 8).

Certaines **souches peu communes voire inhabituelles** ont également été détectée, notamment 4 souches G8;P[6] (que l'on retrouve également chez les bovins) et 1 souche G12;P[8] qui est une souche humaine considérée comme en émergence dans de nombreux pays et qu'il convient de surveiller. L'analyse des segments génomiques codant les protéines externes VP4 et VP7, interne VP6 et non structurale NSP4 montre une origine bovine des génotypes G8 avec des phénomènes de réassortiment (tableau 3) et pour certains génotypes G3, une origine canine ou féline.



En 2004, Figure 3. Distribution des combinaisons génotypiques des rotavirus détectés au cours des saisons 2006-2007 et 2007-2008.

Combinaisons génotypiques	Nombre de souches détectées (%)				Total des souches n=1096	Prévalence moyenne (%)
	2006-2007		2007-2008			
	n=516		n=580			
Souches communes	479	(92,8)	543	(93,5)	1022	93,2
G1P[8]	265	(51,4)	350	(60,3)	615	56,1
G2P[4]	62	(12,0)	9	(1,6)	71	6,5
G3P[8]	15	(2,9)	10	(1,7)	25	2,3
G4P[8]	5	(1,0)	–		5	0,5
G9P[8]	132	(25,8)	174	(30,0)	306	27,9
Souches atypiques	8	(1,6)	8	(1,4)	16	1,5
G2P[6]	1	(0,2)	–		1	0,1
G3P[3]	1	(0,2)	–		1	0,1
G3P[9]	1	(0,2)	–		1	0,1
G6P[9]	–		1*	(0,2)	1*	0,1
G8P[6]	4	(0,8)	1	(0,2)	5	0,5
G12P[6]	–		1*	(0,2)	1*	0,1
G12P[8]	1	(0,2)	7	(1,2)	8	0,8
Autres	29	(5,7)	29	(5,0)	58	5,3
Partiellement typées	6	(1,2)	6	(1,0)	12	1,1
Infections mixtes	23	(4,5)	23	(4,0)	46	4,2

Tableau 2. Distribution et prévalence des combinaisons génotypiques G/P de rotavirus détectés en France entre 2006 et 2008.

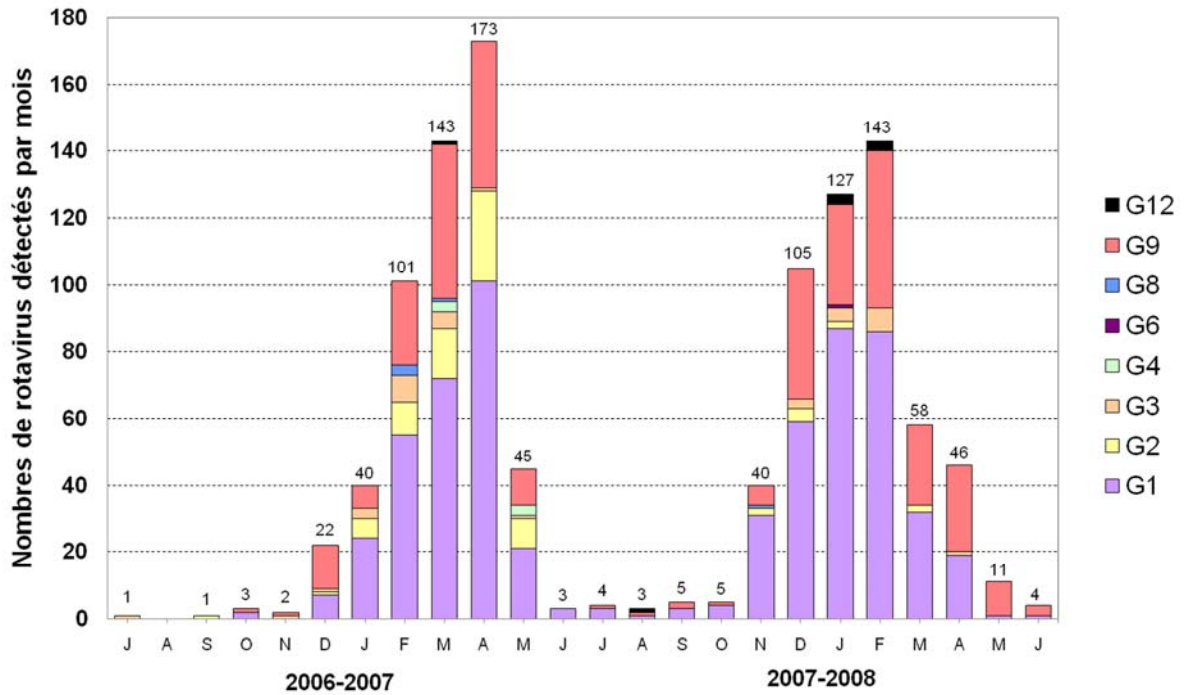


Figure 4. Répartition mensuelle par génotype G des rotavirus détectés entre juillet 2006 et juin 2008. La première saison le pic apparaît en mars-avril alors qu'il est en janvier-février durant la saison 2007-2008. En réalité ces données regroupant les prélèvements de l'ensemble des centres masquent les variations observées selon les centres.

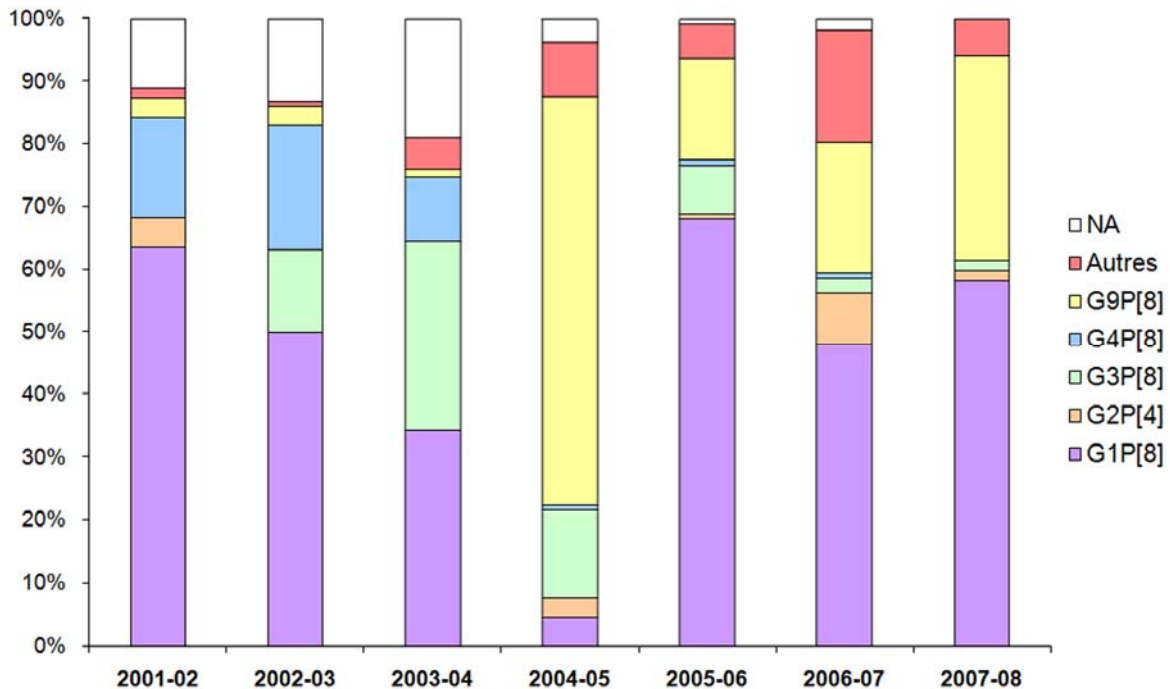


Figure 5. Evolution des combinaisons génotypiques de rotavirus en France entre 2001 et 2008

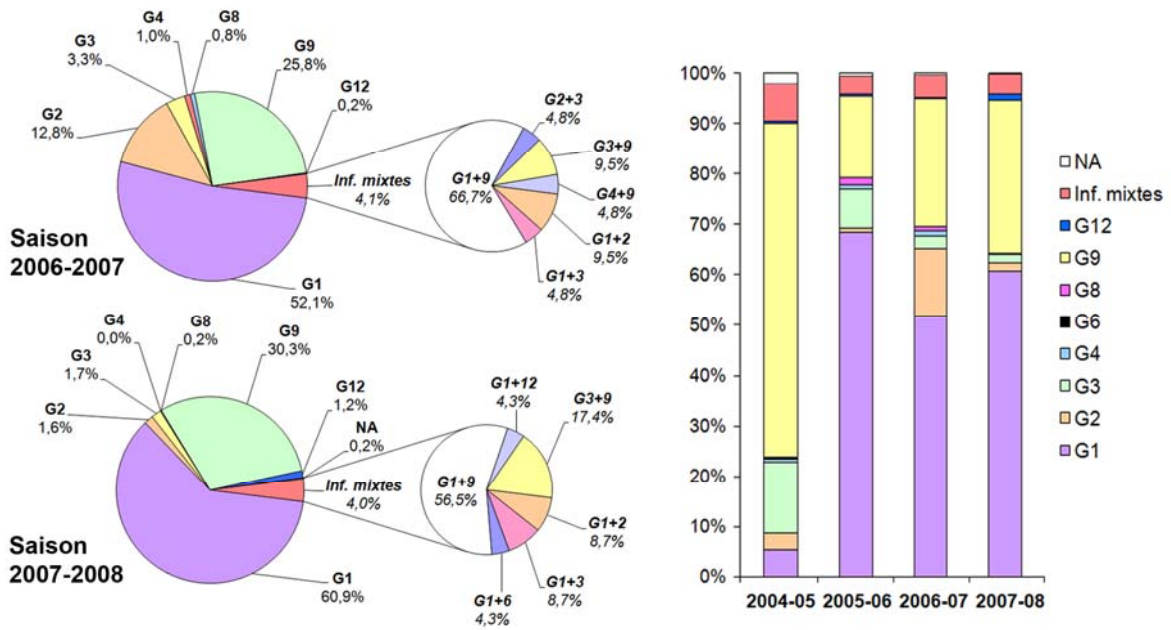


Figure 6a Répartition des génotypes G des rotavirus détectés en France au cours des saisons 2006-2007 et 2007-2008, et leurs évolutions au cours des 4 dernières saisons.

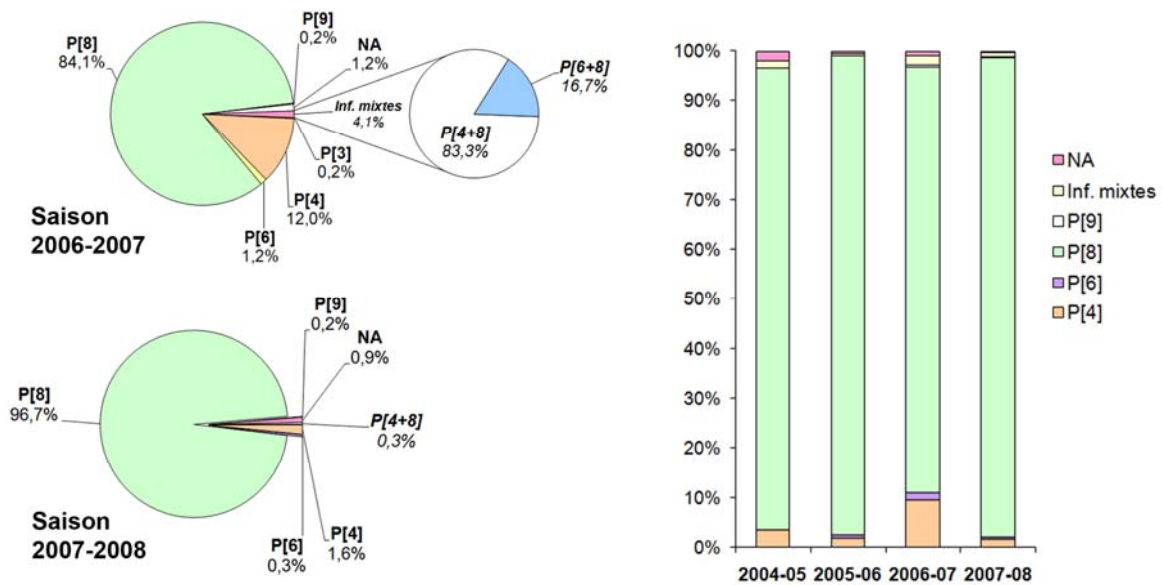


Figure 6b. Répartition des génotypes P de rotavirus en France au cours des saisons 2006-2007 et 2007-2008, et leurs évolutions au cours des 4 dernières saisons. Le génotype P[8] reste très largement prédominant.

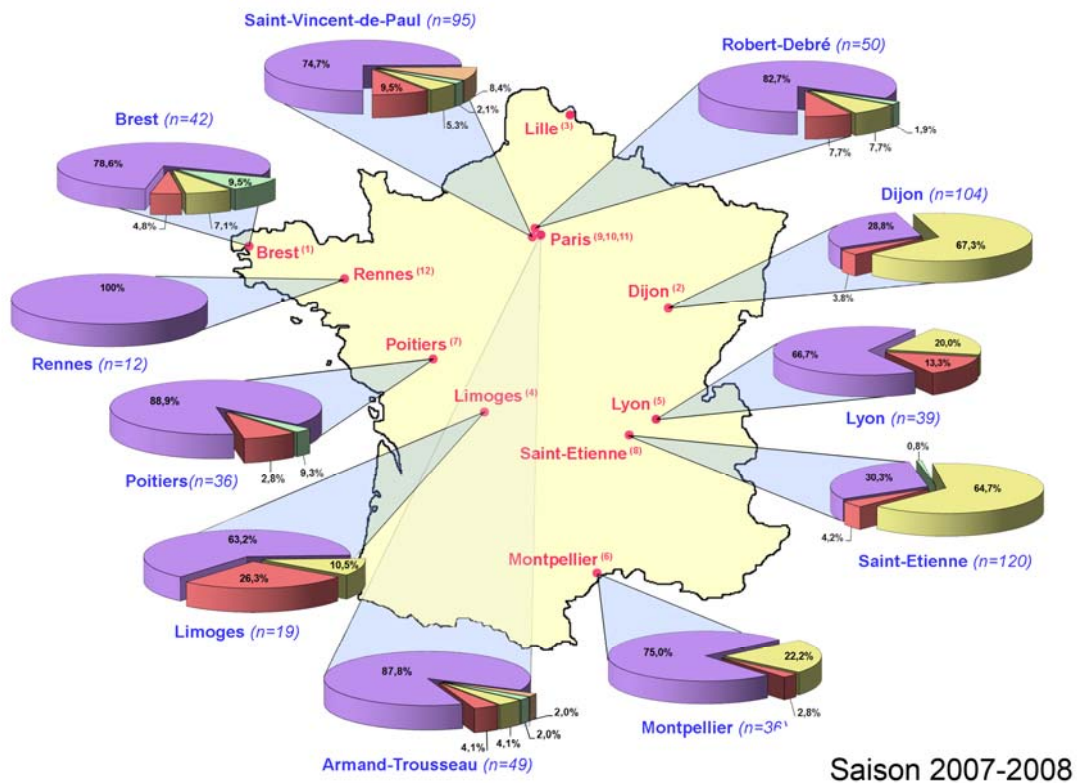
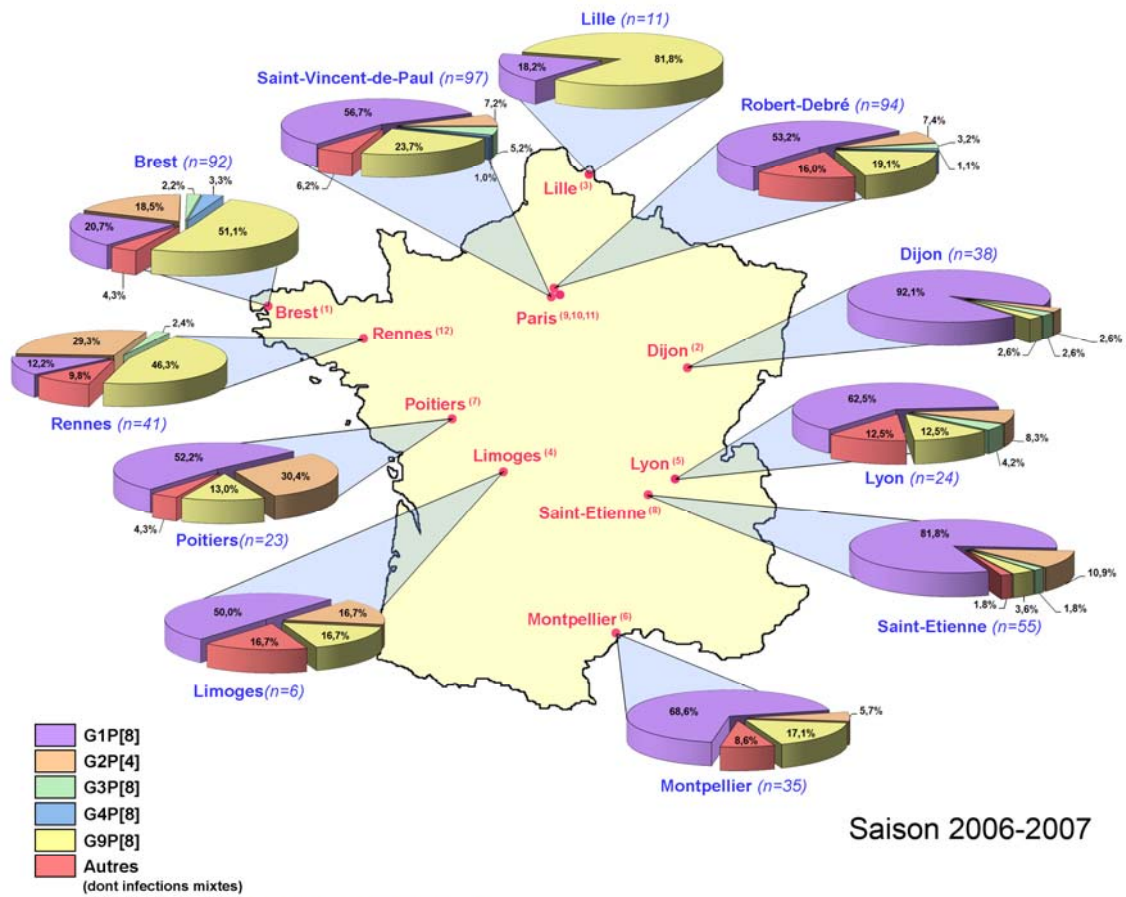


Figure 7. Répartition des combinaisons génotypiques G/P de rotavirus par centre au cours des saisons 2006-2007 et 2007-2008.

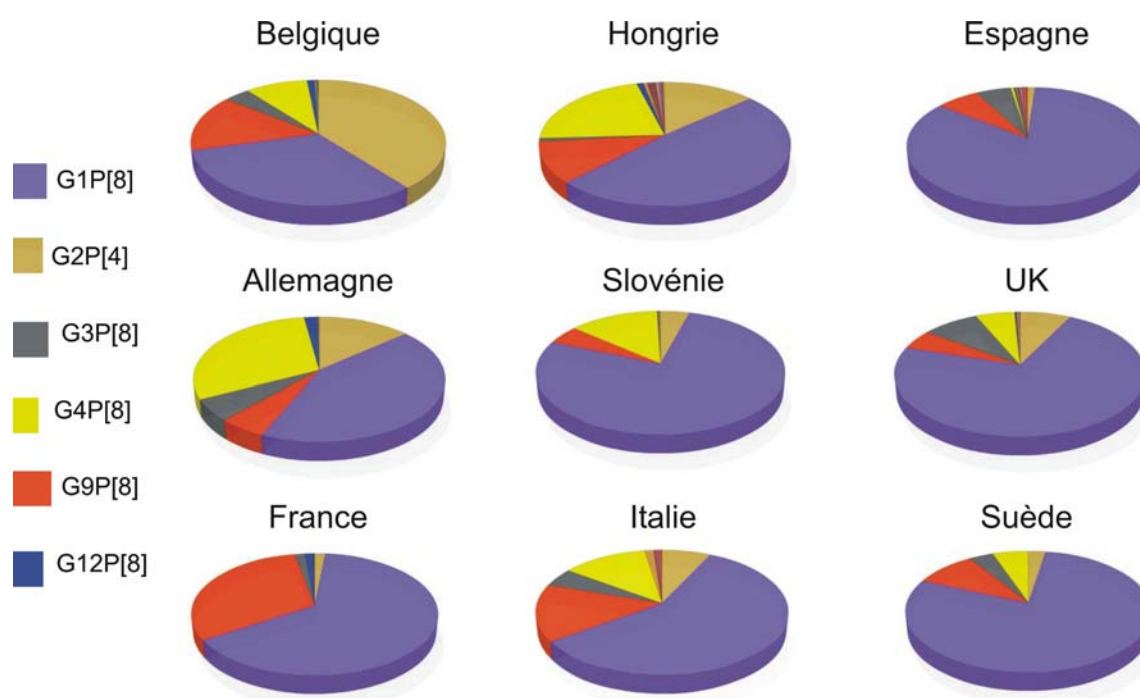


Figure 8 : Comparaison de nos résultats pour la saison 2007-2008 avec ceux d'autres pays du réseau européen du réseau EuroRotaNet.

Souche	Centre	année	VP7		VP4		VP6		NSP4	
			Type G	origine	Type P	origine	type	origine	type	origine
R0700	LIMOGES	2004	6	animale	na		I	animale	na	
R1737	ST ETIENNE	2008	6 (+1)	animale	[9]	hu/an	I	animale	A	animale
R0683	DIJON	2005	8 (+9)	animale	[8]	humaine	I	animale	A	animale
R0793	PARIS	2005	8	animale	[4]	humaine	I	animale	A	animale
R0780	PARIS	2005	8	animale	[4]+[8]	humaine	I	animale	na	
R0792	PARIS	2006	8	animale	[4]	humaine	I	animale	A	animale
R1259	PARIS	2007	8	animale	[6]	hu/an	I	animale	A	animale
R1265	PARIS	2007	8	animale	[6]	hu/an	I	animale	A	animale
R1357	PARIS	2007	8	animale	[6]	hu/an	I	animale	A	animale
R1197	PARIS	2007	8	animale	[6]	hu/an	I	animale	A	animale
R1853	PARIS	2007	8	animale	[6]	hu/an	I	animale	A	animale
R1486	BREST	2007	3	hu/an	[3]	animale	I	animale	C	animale
R1320	MONTPELLIER	2007	3	hu/an	[9]	hu/an	I	animale	A	animale

Tableau 3. Risque d'émergence et barrière d'espèce pour les rotavirus de génotypes G6, G8 (origine bovine) et certains G3 (origine canine ou féline).

4.2. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES

4.2.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

Nos principaux partenaires sont :

- l'**InVS**, les **DDASS** et les **CIRE** et d'autres part les **services hospitaliers**, les **CLIN** ou les **services d'hygiène des établissements de soins**.

Les DDASS 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 l'**InVS** pour la coordination des investigations épidémiologiques et virologiques.

L'**InVS** et les CIRE réalisent les investigations épidémiologiques.

Au total en 2008, les investigations virologiques des épidémies ont concerné 51 départements de Métropole et depuis 2006, **le CNR a collaboré avec 71 départements** de Métropole ou d'Outre Mer.

- Les laboratoires de référence pour les produits de la mer, les aliments et l'eau. dans les aliments
 - **IFREMER** - Centre de Nantes (Dr Soizick LE GUYADER) : laboratoires de référence pour les virus entériques dans les produits de la mer. Ce laboratoire fait partie du même réseau européen que le nôtre (« EVENT/DIVINE ») et nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspecté est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).
 - **AFSSA** – LERQAP, Maisons Alfort (Dr Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour l'eau et les aliments. Nous collaborons étroitement avec ce laboratoire réel pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).
 - **Centre de Référence pour l'Hépatite A**. AP.HP - Paris Paul Brousse (Pr Elisabeth DUSSAIX). Nous collaborons étroitement avec le CNR pour l'hépatite A : nous assurons la détection dans les selles lorsque ce virus est susceptible d'y être retrouvé (épidémie d'origine hydrique par exemple), en cas de positivité le virus ou le prélèvement est adressé au CNR du virus de l'hépatite A pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique. Par ailleurs ce CNR est intégré dans le même réseau européen « EVENT/DIVINE ».
 - **Centre de Référence de l'Hépatite E**, Hôpital du Val de Grâce, Paris (Dr E. Nicand). Nous collaborons étroitement avec le CNR pour l'hépatite E lorsqu'il y a un risque de présence du virus de l'Hépatite E dans un prélèvement. Par ailleurs ce CNR est intégré dans le même réseau européen « EVENT/DIVINE ».
 - **Centre de Référence des entérovirus**, Hospices Civils de Lyon (Pr Bruno LINA). Nous collaborons étroitement avec le CNR des entérovirus : nous assurons la détection dans les selles, en cas de positivité le virus ou le prélèvement est adressé au CNR des entérovirus pour une caractérisation moléculaire et une enquête virologique spécifique.

4.2.2. Caractéristiques des épidémies

4.2.2.1. *Nature et évolution des épidémies*

Les figures 9 et 10 montrent l'évolution des épidémies avec comme caractéristique une augmentation importante du nombre d'épidémies étudiées durant la saison 2008-2009 liée à une meilleure notification et non à une vague épidémique due à un nouveau virus.

En 2008, le nombre des épidémies analysé est de 149 et on peut ainsi en dégager les caractéristiques générales, par exemple, préciser les groupes à risque, les virus en cause, élaborer des hypothèses sur les mécanismes (évolutivité des virus, comportements à risque, etc...). L'amélioration de la couverture du territoire national est constante depuis la création du CNR, principalement depuis 2005-2006. Elle résulte d'une information systématique et rapide de nos partenaires, l'InVS bien sûr mais aussi les DDASS avec lesquelles on maintient des contacts étroit tout au long du traitement d'une épidémie (information sur l'évolution du traitement de l'épidémie avec résultats intermédiaires, rendu rapide des résultats à tous les partenaires impliqués. Durant la saison hivernale 2008-2009 une étude menée conjointement avec le CCLIN Nord –Est et le réseau GROG gériatrie nous a permis une surveillance systématique de 97 établissements pour personnes âgées (EHPA) de l'inter-région Nord-Est.

Les résultats de notre surveillance et ceux, préliminaires, de l'étude du CCLIN Nord-Est montrent que les épidémies survenant en maison de retraite sont très fréquentes. Elles représentaient 67,1% des 149 épidémies investiguées en 2008 (figure 9) avec un mode de transmission de personne à personne (figure 10). L'importance du phénomène est bien mise en évidence par le suivi des 97 établissements de la grande région Nord-Est, 42 de ceux-ci avaient été concernés par au moins une épidémie de gastroentérites (tableau 2).

Les autres environnements concernés sont :

- Les services hospitaliers (8,7%) avec également un mode de transmission de personne à personne.
- Les écoles, les restaurants ou traiteur, les centres de loisirs et les épidémies familiales représentent 25 épidémies (16,8%). Dans ces environnements, le mode de transmission est alimentaire dans 72% des cas, de personne à personne dans 16% et non documenté dans 12% des cas.

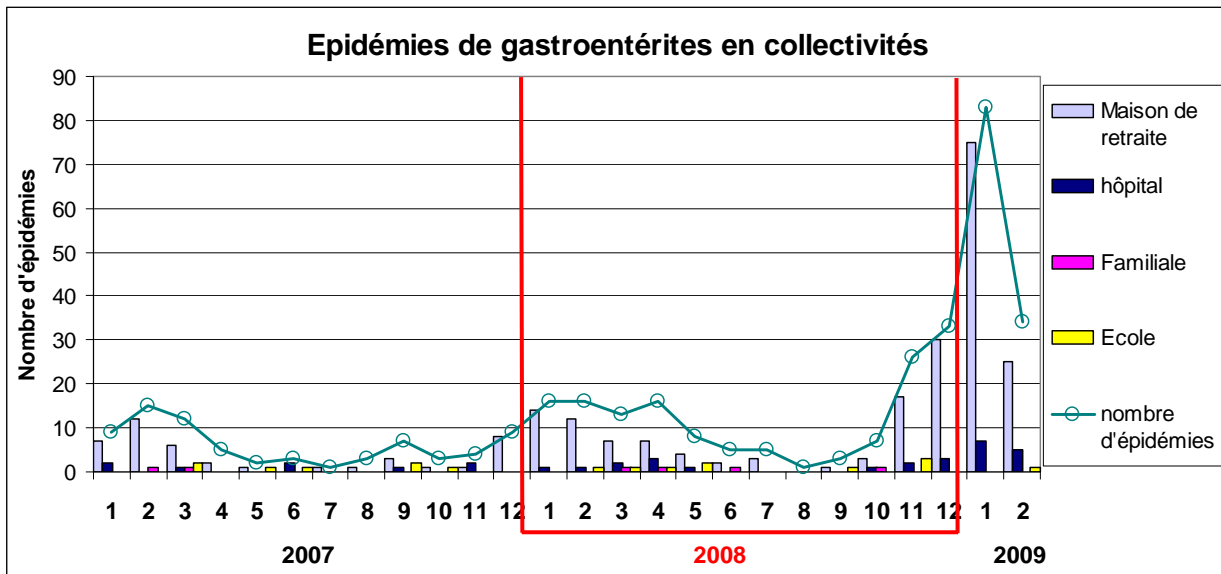


Figure 9 : Evolution des épidémies investiguées selon le site, large prédominance des épidémies en maison de retraite.

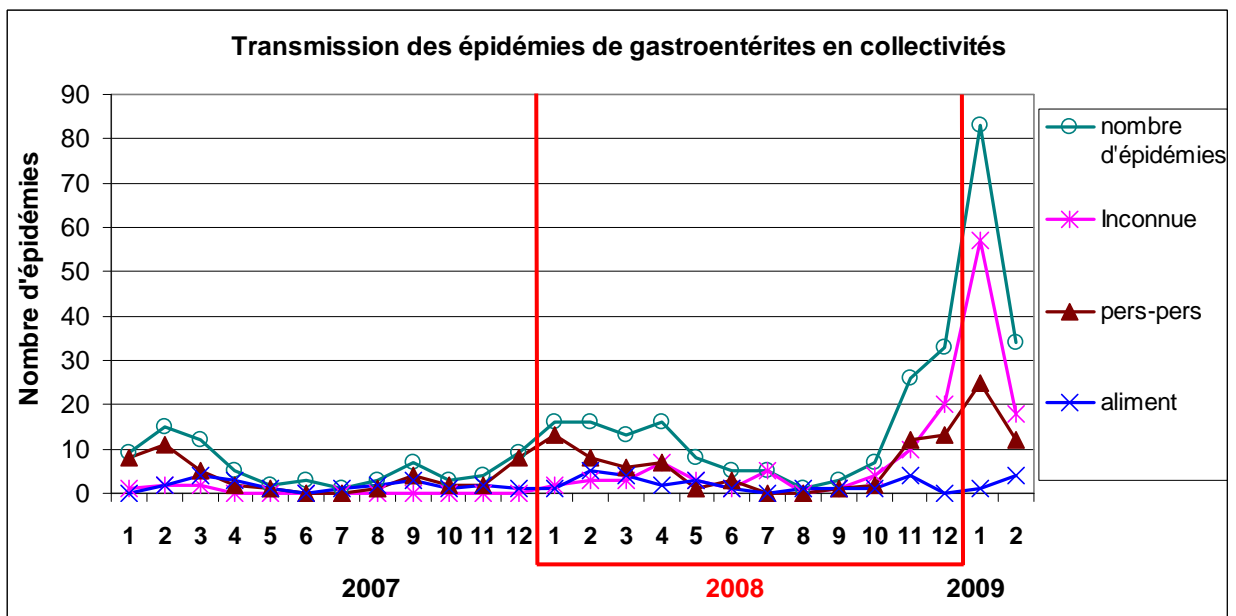


Figure 10 : Répartition des épidémies selon les 2 principaux modes de transmission de personne à personne et alimentaire (inconnue ou non documentée).

Récapitulatif de l'étude « Grog Géronto » (jusqu'à la semaine 10-2009 incluse)						
Régions	Départements	Nb d'EHPA participant	Nb d'EHPA ayant envoyé des prélèvements	Nb d'EHPA ayant connu plusieurs épidémies	Nombre d'épidémies reçues	Nombre d'épidémies positives
Alsace	Bas Rhin (67)	8	3		3	2
	Haut Rhin (68)	13	8	2 EHPA avec 2 épid.	10	9
	sous-total	21	11		13	11
Bourgogne	Côte d'Or (21)	6	3	1 EHPA avec 2 épid.	4	4
	Nièvre (58)	3	1		1	1
	Saône-et-Loire (71)	5	2		2	2
	Yonne (89)	1	0		0	0
	sous-total	15	6		7	7
Champagne-Ardenne	Ardennes (08)	3	1		1	1
	Aube (10)	6	5	1 EHPA avec 3 épid.	7	5
	Marne (51)	10	9		9	8
	Haute-Marne (52)	3	0		0	0
	sous-total	22	15		17	14
Franche-Comté	Doubs (25)	4	0		0	0
	Jura (39)	1	0		0	0
	Haute-Saône (70)	1	0		0	0
	T. de Belfort (90)	1	1		1	0
	sous-total	7	1		1	0
Lorraine	Meurthe-Moselle (54)	9	1		1	0
	Meuse (55)	2	1		1	1
	Moselle (57)	11	3	1 EHPA avec 2 épid. 1 EHPA avec 3 épid.	6	4
	Vosges (88)	10	4		4	4
	sous-total	32	9		12	9
TOTAL		97	42	6	50	41

Tableau 2 : résultats préliminaire de l'étude conjointe du CCLIN Nord –Est et du réseau GROG gériatrie.

4.2.2.2. Virus en cause

Dans la très grande majorité des cas le virus en cause est un **norovirus** (117 épidémies soit 78,5%) et dans 73,8% des cas il était le seul virus détecté (figure 11). Parmi les norovirus, ceux du génogroupe II ; et plus particulièrement le génotype 4 (GGII.4), sont largement prédominants (figure 12). Un **virus Aichi** a été retrouvé dans 2 épidémies dont l'une avait pour origine la consommation d'huîtres et la seconde une contamination de l'eau de distribution. Dans ces deux épidémies, le virus Aichi était associé aux norovirus.

Les norovirus GGII.4 présentent une grande capacité évolutive et ont donné de **nouveaux variants** apparus en 2006 (2006a et 2006b). En 2007 les deux variants ont co-circulé avec une prédominance du variant 2006b au 4^e trimestre, prédominance confirmée en 2008 (figure 13). En 2008 est apparu en France et en Europe un nouveau variant, dénommé 2008, qui est resté minoritaire (9 épidémies contre 80 pour le variant 2006b). Ce variant 2008 serait proche et dérive probablement de souches que nous avons caractérisées en 2006-2007 lors d'une étude en Egypte (Kamel et al, 2009 publication n° 14).

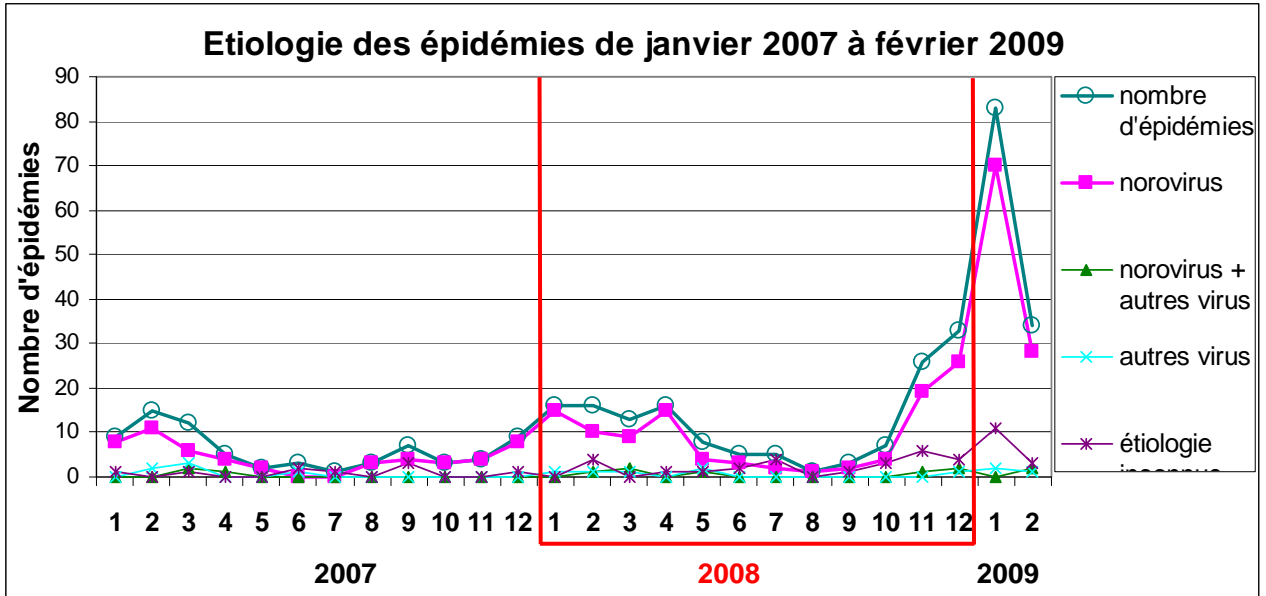


Figure 11 : virus à l'origine de l'épidémie investiguée

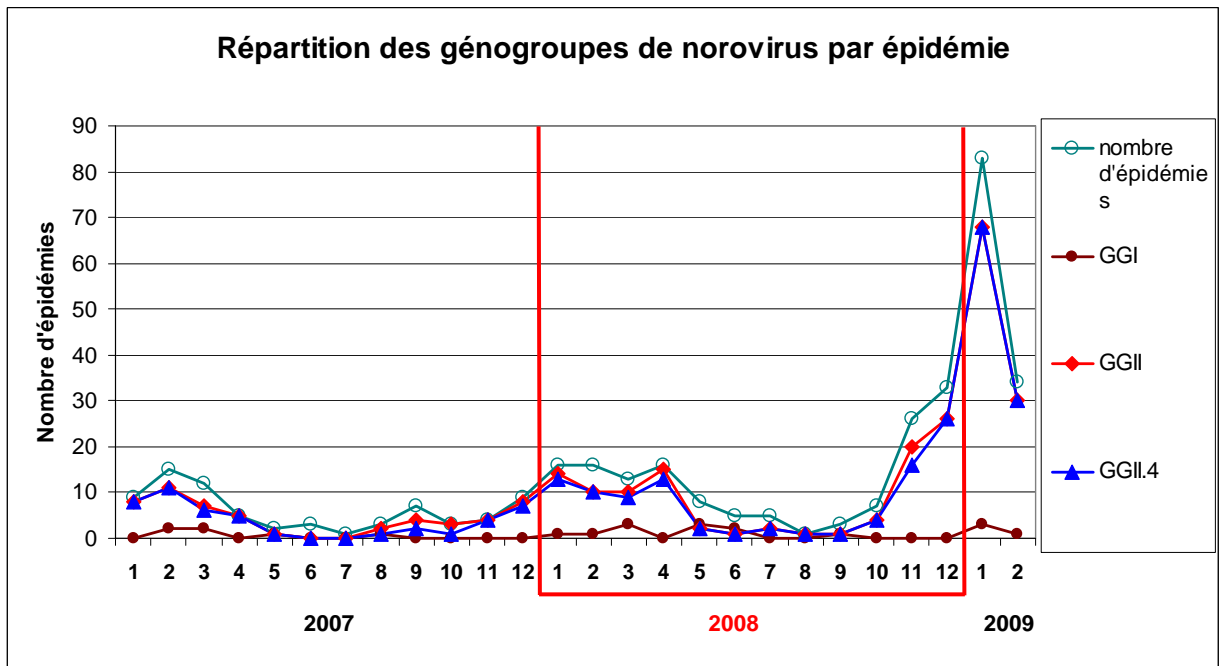


Figure 12 : Importance relative des génogroupe I et II des norovirus au cours des épidémies investiguées durant l'année 2008.

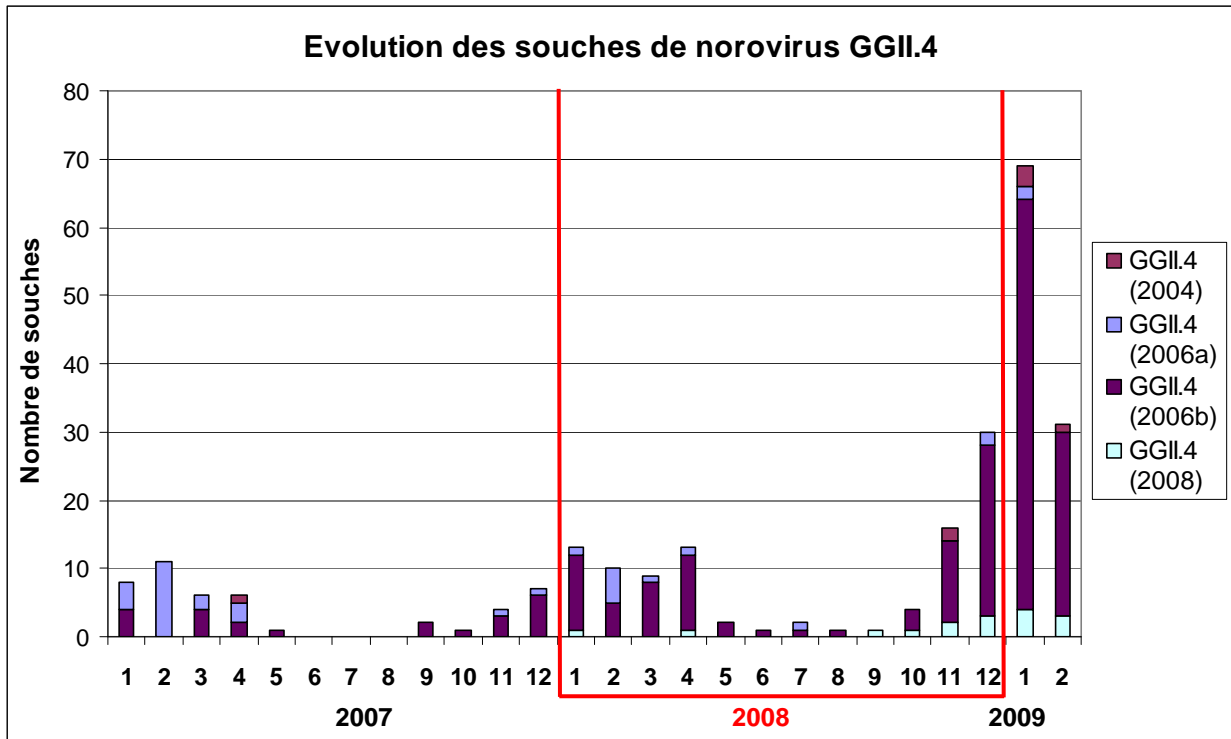


Figure 13 : Importance des différents variant des norovirus de génogroupe II et de génotype 4. Apparition des nouveaux variants GGII.4-2006a, 2006b et 2008.

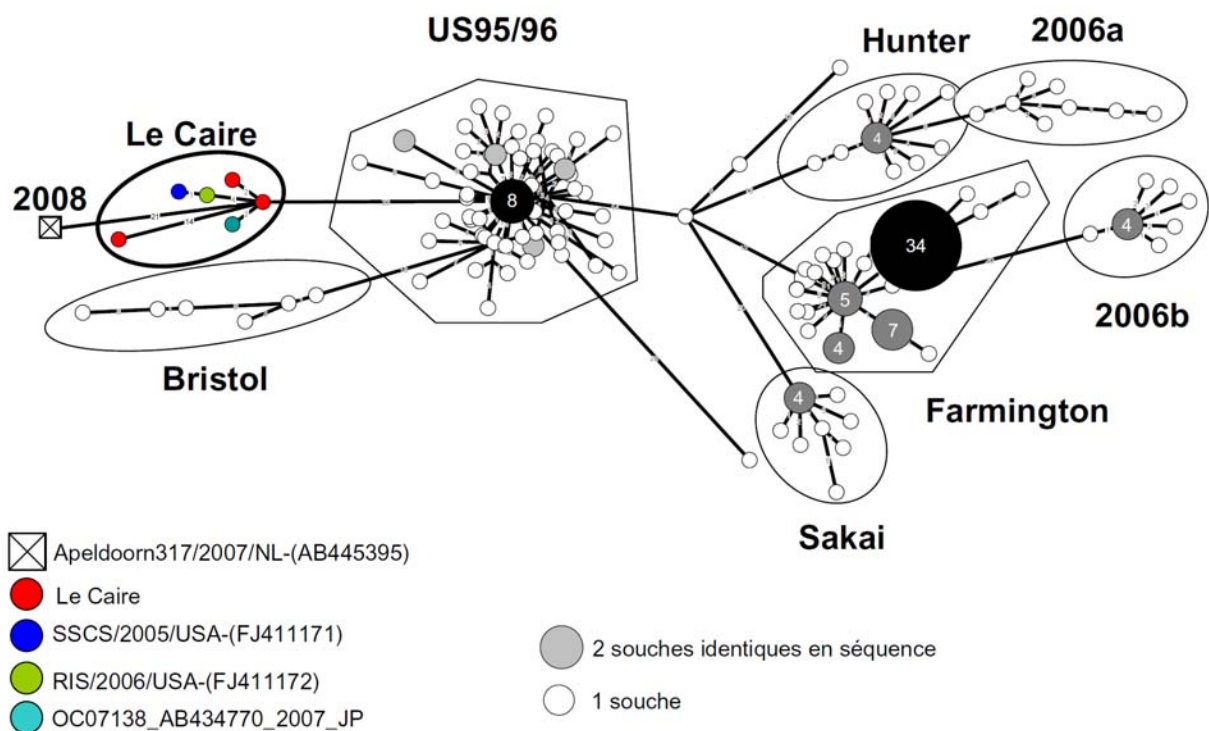


Figure 14 : Analyse phylogénétique des souches GGII.4 dans l'ORF2 sur un « arbre minimum couvrant ». Les variants 2006b dériveraient des souches « Farmington » détectées pour la première fois en 2002 ; les variants 2006a dériveraient des souches « Hunter » détectées en 2004 ; les variants 2008 seraient proches et dériveraient des souches « Le Caire » que nous avons caractérisées lors d'une étude réalisée en Egypte (Kamel et al, 2009 ; publication n°14).

4.3. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE EUROPEENS

4.3.1. Réseaux européens* « EVENT », « DIVINE » et « EuroRotanet »

Ces réseaux européens reçoivent un soutien financier de l'Union Européenne. Le réseau « DIVINE » a pour mission la surveillance et la caractérisation des virus responsables de gastroentérites transmises par les aliments. Le réseau « EuroRotanet » a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus responsables des gastroentérites chez les enfants. Le réseau « EVENT » associe la plus grande partie des laboratoires de virologie impliqués dans les précédents réseaux, il s'est constitué autour d'un projet de recherche ayant pour objectif la compréhension des mécanismes d'évolution des virus entériques. Les contributions de notre laboratoire durant l'année 2008 ont été :

- Mise au point de la détection des virus Aichi et étude de leur importance épidémiologique en France et en Afrique (publications n° 2, 3, 6 et 8).
- Participation à la surveillance des épidémies à l'échelle européenne (publications n° 1, 7, 10 et 12).
- Participation à un réseau de surveillance des rotavirus (publications n° 9, 15, 16 et 17).
- Evaluation des stratégies de diagnostic virologique des gastroentérites à rotavirus (publication 18).
- Participation à un contrôle externe de qualité.
- Transmission de notre base de données afin de réaliser une centralisation européenne permettant de mieux appréhender la diversité génétique des calicivirus.

*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 Institutet, Solna (Dr Swensson 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 Le Guyader S) et CHU de Dijon (Pr Pothier).

4.3.2. Collaborations « Egypte-Tunisie-Maroc »

Ces collaborations ont été réalisées grâce aux programmes soutenus par le Ministère des Affaires Etrangères et le Ministère de la Recherche (programmes CMCU). Elles nous ont permis de former des étudiants aux techniques de diagnostic, de caractérisation moléculaire. Une thèse d'Université (Université de Bourgogne et Université de Monastir, Tunisie) a déjà été soutenue, une seconde le sera d'ici la fin de l'année 2009.

Elles ont également pour objectif une surveillance de l'épidémiologie des virus entériques dans la population et dans l'environnement de ces pays. Cette surveillance dans les pays du pourtour méditerranéen a pour nous un très grand intérêt car l'incidence des infections entériques y est élevée avec pour conséquence le risques d'émergence de nouvelles souches virales (publications n° 11 et 14). Certaines de ces nouvelles souches pourraient être à l'origine d'épidémies en France et en Europe. La souche « Hunter » responsable en Europe d'une épidémie à partir de 2004, circulait déjà début 2003 en Tunisie (publication n°11). De même, les souches caractérisées en Egypte en 2006-2007 sont très proches du variant 2008 observé en Europe.

4.4. ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

4.4.1. Etude épidémiologique des rotavirus dans les crèches de Lyon.

Ce travail, commencé en 2007, a été effectué en collaboration avec le service de Pédiatrie de l'Hôpital Edouard Herriot à Lyon (Pr DI Floret), Laboratoire de virologie de Lyon (Pr B Lina), Laboratoires Sanofi-Pasteur MSD (Dr L Marcelon), Société Biostatem (Dr S Pinchinat).

Principaux résultats et conclusions (Publications n°17 et 18) :

- Le test d'immuno-chromatographie utilisé dans cette étude est fiable lorsqu'il est utilisé en ambulatoire.
- Cette étude a montré l'émergence dans cette population de rotavirus de génotype G9;P[8]. Ce phénomène a aussi été observé dans d'autres pays (Pays-Bas, Espagne, Belgique).

4.4.2. Evaluation des désinfectants et antiseptiques sur le norovirus murin.

Principaux résultats et conclusions (Publication n° 5) :

- Les norovirus murins (MNV) constituent donc un substitut intéressant pour l'étude de la résistance des NoV aux antiseptiques et aux facteurs environnementaux.
- La quantification par RT-PCR en temps réel ne reflète pas nécessairement le caractère infectieux du virus après traitement.
- Les MNV sont plus ou moins résistants selon les produits testés. Notamment les solutions hydroalcooliques ont une efficacité variable selon les deux produits testés. L'anios gel 85NPC permet une chute du titre infectieux de 3 log, ce qui est insuffisant pour être considéré comme efficace et le Purell est efficace après une exposition de 60 minutes.
- L'eau de Javel est le produit le plus efficace sur les norovirus

4.4.3. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique

Le virus Aichi est de découverte relativement récente. Même si sa classification est bien établie au sein de la famille des *Picornaviridae* et du genre *Kobuvirus*, ce virus reste encore méconnu sur le plan virologique. Les études portant sur ce virus sont peu nombreuses et ne permettent pas d'en dégager un rôle pathogène clairement défini.

Principaux résultats et conclusions (Publications n° 2, 3, 6, et 8) :

- L'incidence du virus Aichi est faible et lorsqu'il est retrouvé lors de gastroentérites collectives, sa présence témoigne d'une infection multiple telle que l'on peut observer lors des contaminations hydriques ou par consommation d'huîtres.
- La séroprévalence dans la population française atteint 80/90% à partir de l'âge de 30 ans avec des éléments indiquant de possibles réinfections au cours de la vie (amplitude des titres sérologiques par tranche d'âge).
- L'analyse phylogénétique des souches isolées montre une certaine diversité et une des souches caractérisée est génétiquement différente des souches jusque là connue et doit être classée dans un nouveau génogroupe, le génogroupe C (travail en cours).

5. ALERTE (voir également annexes A)

5.1. PROCEDURES D'ALERTE DE L'INVS ET DES AUTRES PARTENAIRES

5.1.1. Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR :

- ✓ **Faxer** au demandeur **les 4 formulaires** de la pochette « formulaires à faxer » **ou** envoyer par **e-mail** les « formulaires e-mail ».
- ✓ Remplir un **formulaire « premières infos »** (formulaire A) (classeur noir)
Important : indiquer l'**identifiant épidémie** de la manière suivante :
code dépt - 2 premières lettres ville - mois – année
Ex : épidémie à Chalon/Saône en mars 2006 = 71CH0306
puis **garder ce code tout au long de l'épidémie.**

Si ambiguïté sur l'identifiant épidémie, ajouter un numéro d'ordre.

Ex : Charolles, 71CH0306-2

- ✓ **Faxer ce formulaire rempli à Gilles Delmas (InVS), au 01 41 79 67 69**

5.1.2. Annonce d'une épidémie par un email de l'InVS :

- ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques qui auront été fournis par l'InVS.

5.1.3. Annonce d'une épidémie par l'IFREMER ou l'AFSSA :

- ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques.
- ✓ S'assurer de la transmission des informations à l'InVS, sinon les transmettre.

5.1.4. Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :

- ✓ Remplir un **formulaire premières infos** (formulaire A) et le **faxer à l'InVS**

5.2. TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA

5.2.1. Procédures de traitement des prélèvements

- **Annexe A1, paragraphe 10.1**

5.2.2. Premières informations

- **Annexe A2, paragraphe 10.2**

Information de l'InVS par fax (correspondant Gilles DELMAS)

5.2.3. Protocole d'envoi d'échantillons de selles pour investigation virologique d'une épidémie de gastroentérite

- **Annexe A3, paragraphe 10.3**

5.2.4. Formulaires 1 à 3

- **Annexe A4 à A6, paragraphe 10.4 à 10.6**

6. ACTIVITE D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL

6.1. PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITE D'EXPERTISE

Je suis personnellement membre du **Haut Conseil de Santé Public** et à ce titre expert de dossiers dont certains concernent le domaine des gastroentérites dont le dossier de la vaccination contre les rotavirus.

6.2. ACTIVITE DE CONSEIL :

- Aides à d'autres laboratoires (transmission de souches de référence, soutien technique ou autre :
 - Laboratoire d'analyse de Veolia.
 - Laboratoires CEERAM.
 - Groupe Danone.
 - Laboratoire Nestlé.
 - Laboratoire de contrôle Qualité, BioMérieux.
- Conseils téléphoniques destinés à des collègues biologistes, médecins hygiénistes, médecins épidémiologiste (DDASS, CIRE), médecins cliniciens.

6.3. ENCADREMENT DE STAGIAIRES :

Encadrement d'étudiants en Médecine et Pharmacie, de stagiaires de l'IUT.

Encadrement d'une étudiante Tunisienne (Madame Khira Sdiri-Loulizi). La thèse en co-tutelle a été soutenue le 17 janvier 2009).

Encadrement d'une étudiante Egyptienne (Mademoiselle Aziza Kamel). La thèse en préparation devrait être soutenue fin 2009.

Encadrement d'une stagiaire post-doc iranienne (Madame Farzaneh Pourasgary).

7. TRAVAUX DE RECHERCHE DECOULANT DE L'ACTIVITE DU CNR

Les différents travaux de recherche ont été présentés sous forme de publications des journaux internationaux ou nationaux, sous communications orales ou affichées lors de réunions scientifiques nationales ou internationales (voir chapitre 8). Les objectifs de ces travaux ainsi que les principaux résultats sont présentés ci-dessous.

7.1. EVALUATION ET MISE AU POINT DE REACTIFS DE DIAGNOSTIC

7.1.1. Rotavirus :

Nous avons évalué la sensibilité et la spécificité d'une trousse de détection des rotavirus et des adénovirus par immuno-chromatographie en condition ambulatoire (publication n°18).

Nous développons avec la société Covalab un test d'immuno-détection des rotavirus destiné aux pays d'Afrique.

7.1.2. Norovirus :

Nous avons évalué les 2 trousse de diagnostic des norovirus par méthode immunologique (Rd-Biopharm et DAKO) actuellement commercialisées. En 2008 nous avons évalué une trousse de détection de norovirus par immuno-chromatographie (Rd-Biopharm) qui sera prochainement disponible dans les laboratoires d'analyses. Les résultats non encore publiés montrent une excellente spécificité de ce test. Par contre la sensibilité est en moyenne de 66,2% mais varie de 0 à 100% selon les génotypes. Pour le génotype GGII.4 la sensibilité de ce test est de 78,9%.

7.2. EVALUATION DES ANTISEPTIQUES ET DESINFECTANTS

Nous avons utilisé le norovirus murin qui est le seul norovirus pouvant être cultivé. Ainsi, il apparaît comme un substitut plus proche des norovirus humains pour évaluer l'efficacité des désinfectants et des antiseptiques utilisés dans les services de soins. Jusqu'à présent ces évaluations étaient réalisées avec le calicivirus félin, mais ce dernier n'appartient pas au genre norovirus et il est responsable d'infections respiratoires chez le chat. Le norovirus murin apparaît donc comme un substitut plus adapté (publication n°5).

Notre expertise de l'utilisation du norovirus murin (culture et RT-PCR en temps réel) dans de telles évaluations nous a permis de participer aux programmes ANR PNRA (ADHERESIST et SPICECLEAN) pour les années 2008 et 2009.

7.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

7.3.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus

Cette étude a été présentée dans le chapitre 3.1. de ce rapport. La disponibilité des vaccins anti-rotavirus nécessite une surveillance moléculaire des souches de rotavirus afin de pouvoir anticiper des changements génétiques qui pourraient mettre en défaut la vaccination. La surveillance nationale que nous avons mise en place pour au moins 6 années impliquait en 2008 onze centres français et elle est intégrée dans un réseau européen (« EuroRotanet ») où les données, expériences et techniques sont partagées. Ce projet a, pour la partie française, un soutien financier de la société Sanofi-Pasteur MSD et un financement européen pour l'ensemble du réseau. Les résultats ont été

détaillés dans le chapitre 3.1. et ont été présentés à un congrès de pédiatrie (ESPID 2008). Les résultats français et européens sont ou seront publiés en 2008-2009 (publications° 9,15 et 20)

7.3.2. Epidémiologie moléculaire des virus dans les pays méditerranéens

Les objectifs de ces études sont les suivants :

- Aider les laboratoires de ces pays à mieux connaître l'épidémiologie des virus des gastroentérites dans ces pays (hommes, animaux et environnement) afin que ces pays puissent mesurer les risques sanitaires et prendre les mesures pour y faire face.
- Comprendre les cycles épidémiologiques des virus entériques en associant épidémiologie humaine, épidémiologie de l'environnement et recherche de transmission de l'animal à l'homme.
- Améliorer la connaissance de la diversité des souches virales qui circulent dans le pourtour méditerranéen afin d'anticiper les risque d'émergence en France de nouvelles souches à l'origine d'épidémies.

7.3.2.1. Etudes épidémiologiques en Tunisie

Les résultats de l'étude épidémiologique des virus entériques en milieu pédiatrique dans ce pays apportent deux renseignements (publications 3 et 11) :

- Les norovirus sont des agents étiologiques aussi fréquents que les rotavirus dans les gastroentérites en milieu pédiatrique. Pour ces deux virus, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence en termes de sévérité des gastroentérites.
- Les souches de virus responsables de gastroentérites sont les mêmes qu'en Europe, c'est-à-dire que pour les rotavirus nous avons principalement les souches G1-G4 et G9 et pour les norovirus nous avons la prédominance des souches GGII.4. Cependant, le variant « Hunter-2004 » a pu être détecté dès janvier 2003 alors qu'il n'est apparu en Europe qu'en 2004.

7.3.2.2. Etudes épidémiologiques en Egypte

Nous avons entrepris dans ce pays une étude épidémiologique dans la population du Caire et dans l'eau en amont et en aval de trois stations de traitement des eaux. Les résultats montrent une très grande diversité des souches virales avec une co-circulation de ces souches. Nous avons caractérisé génétiquement ces souches et montré que certaines d'entre elles correspondaient à un nouveau variant que nous avons dénommé « Le Caire » (figure 14 page 24).

7.4. ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE AUX INFECTIONS A ROTAVIRUS.

Nous poursuivons l'étude chez la souris des mécanismes de la réponse immunitaire après immunisation par des protéines ou des pseudo-particules virales par voie nasale, digestive ou intra rectale.

Notre objectif étant de comprendre les mécanismes de la réponse immune protectrice:

- Nous avons déterminé la part respective des effecteurs de l'immunité (cellules B et anticorps, Cellules T CD4+, Cellules T CD8+) dans la protection induite par l'immunisation avec des pseudo-particules virales VP2-6 (VLP).
- Nous avons déterminé les mécanismes de « homing » pour ces trois modes d'immunisation.

Une publication est en cours de préparation sur chacun de ces 2 sujets.

8. LISTE DES PUBLICATIONS, COMMUNICATIONS ET CONTRATS

8.1. PUBLICATIONS

8.1.1. Publications internationales

1. Kroneman A, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, Falkenhorst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, **Pothier P.**, Gallay A, Schreier E, Koch J, Szücs G, Reuter G, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Grom AH, Bosch A, Buesa J, Fauquier AS, Hernández-Pezzi G, Hedlund KO, Koopmans M. Data quality of 5 years of central norovirus outbreak reporting in the European Network for food-borne viruses. *J Public Health (Oxf)*. 2008 ; 30 : 82-90.
2. **Ambert-Balay K**, Lorrot M, **Bon F**, **Giraudon H**, **Kaplon J**, Wolfer M, Lebon P, Gendrel D, **Pothier P**. Prevalence and Genetic Diversity of Aichi Virus in Community and Hospitalized Patients. *J Clin Microbiol*. 2008 ; 46: 1252-8.
3. **Sdiri-Loulizi K**, Gharbi-Khélifi H, **de Rougemont A**, Chouchane S, Sakly N, **Ambert-Balay K**, Hassine M, Guédiche MN, Aouni M, **Pothier P**. Acute infantile gastroenteritis associated with human enteric viruses in Tunisia. *J Clin Microbiol*. 2008 ; 46: 1349-55.
4. Maslin J., Nicand E., **Ambert-Balay K.**, Fouet C., Kaplon J., Haus R., **Pothier P.**, Kohli E. Detection and characterization of human caliciviruses associated with sporadic acute diarrhea in adults in djibouti (Horn of Africa). *Am. J Trop. Med. Hyg*. 2008. 78 : 522-526.
5. **Belliot G**, **Lavaux A**, **Souihel D**, **Agnello D**, **Pothier P**. Use of Murine Norovirus as a surrogate of human norovirus to evaluate resistance to disinfectants. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Mar 31.
6. **Goyer M**, Aho LS, **Bour JB**, **Ambert-Balay K**, **Pothier P**. Seroprevalence distribution of Aichi virus among a French population in 2006-2007. *Arch Virol*. 2008 ; 153 : 1171-4.
7. Kroneman A, Verhoef L, Harris J, Vennema H, Duizer E, van Duynhoven Y, Gray J, Iturriza M, Böttiger B, Falkenhorst G, Johnsen C, von Bonsdorff CH, Maunula L, Kuusi M, **Pothier P**, Gallay A, Schreier E, Höhne M, Koch J, Szücs G, Reuter G, Krisztalovics K, Lynch M, McKeown P, Foley B, Coughlan S, Ruggeri FM, Di Bartolo I, Vainio K, Isakbaeva E, Poljsak-Prijatelj M, Grom AH, Mijovski JZ, Bosch A, Buesa J, Fauquier AS, Hernández-Pezzi G, Hedlund KO, Koopmans M. Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the foodborne viruses in Europe Network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol*. 2008, 46: 2959-65.
8. Le Guyader FS, Le Saux JC, **Ambert-Balay K**, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, **Giraudon H**, Delmas G, Pommepuy M, **Pothier P**, Atmar RL. A French oyster-related gastroenteritis outbreak: Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus and rotavirus all involved in clinical cases. *J Clin Microbiol*. 2008 ; 46 : 4011-7.
9. **de Rougemont A**, **Kaplon J**, Lebon P, Huet F, Denis F, Alain S, Fourcade L, Grosjean J, El-Hajje MJ, Gendrel D, **Pothier P**. Unexpected substitution of dominant rotavirus G genotypes in French hospitalized children over five consecutive seasons. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2008 Oct 15.

10. L Verhoef , E Duizer, H Vennema, J Siebenga, Corine Swaan, L Isken, M Koopmans, **K Balay**, **P Pothier**, Paul McKeown, G van Dijk, P Capdepon, G Delmas. Import of norovirus infections in the Netherlands and Ireland following pilgrimages to Lourdes, 2008 – preliminary report. *Eurosurveillance*, Volume 13, Issue 44, 30 October 2008, 17-18.
11. **Sdiri-Loulizi K**, **Ambert-Balay K**, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Hassine M, Chouchane S, Guediche MN, **Pothier P**, Aouni M. Molecular Epidemiology of Norovirus Gastroenteritis among Children in Tunisia during 4-years: Detection of the Norovirus Variant GGII-4 Hunter as early as January 2003. *J Clin Microbiol.* **2009** Feb;47(2):421-9
12. Verhoef LP, Kroneman A, van Duynhoven Y, Boshuizen H, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerg Infect Dis.* **2009** ; 15 (1):31-8 (*publication collective du réseau européen*).
13. Pourasgari F, Ahmadian S, Hassan ZM, Mahdavi M, Salmanian M N AH, **Pothier P**. Intranasal immunization of mice with vp2 DNA of human rotavirus a induces cellular and humoral immunity. *Acta Virol.* **2008** ; 52(4):225-9.
14. **Kamel AH**, Ali MA, El-Nady HG, **de Rougemont A**, **Pothier P**, **Belliot G**. Predominance and Circulation of Enteric Viruses in Grand Cairo. *J Clin Microbiol.* **2009** Feb 4.
15. Iturriza-Gómara M, Dallman T, Bányai K, Böttiger B, Buesa J, Diedrich S, Fiore L, Johansen K, Korsun N, Kroneman A, Lappalainen M, László B, Maunula L, Mathijnssens J, Midgley S, Mladenova Z, Poljsak-Prijatelj M, **Pothier P**, Ruggeri FM, Sanchez-Fauquier A, Schreier E, Steyer A, Sidaraviciute I, Tran AN, Usonis V, Van Ranst M, **de Rougemont A**, and Gray J. Rotavirus Surveillance in Europe 2005-2008: Web-Enabled Reporting and Real-Time Analysis of Genotyping and Epidemiological Data. *Journal of Infectious Diseases* (sous presse)

8.1.2. Publications en langue française

16. Huet F, Chouchane M, Cremillieux C, Aubert M, Caulin E, **Pothier P**, Allaert FA. [Prospective epidemiological study of rotavirus gastroenteritis in Europe (REVEAL study). Results in the French area of the study.] *Arch Pediatr.* **2008** ; 15 : 362-374.
17. Fau C, Billaud G, Pinchinat S, Lina B, **Kaplon J**, **Pothier P**, Derrough T, Marcelon L, LARGERON N, Caulin E, Bellemin B, Nong TC, Gaspard C, Mamoux V, Floret D. [Epidemiology and burden of rotavirus diarrhea in day care centers in Lyon, France.] *Arch Pediatr.* **2008** (7): 1183-92.
18. **de Rougemont A**, **Kaplon J**, Billaud G, Lina B, Pinchinat S, Derrough T, Caulin E, **Pothier P**, Floret D. [Sensitivity and specificity of the VIKIA((R)) Rota-Adeno immuno-chromatographic test (bioMérieux) and the ELISA IDEIA trade mark Rotavirus kit (Dako) compared to genotyping.]. *Pathol Biol* (Paris). 2009 Feb;57(1):86-9.

8.1.3. Publications didactiques

19. **De Rougemont A**, **Balay K**, **Belliot G**, Aho-Glélé L-S, **Pothier P**. Actualité des gastroentérites virales en établissement de soins et d'hébergement. *Hygiène*, 2008 ; 16 : 451-456.

20. **De Rougemont A, Kaplon J, Pothier P.** Les gastroentérites aiguës à rotavirus de l'enfant : une priorité de santé publique. *La Lettre de L'Infectiologue*, 2009 (sous presse).
21. **De Rougemont A , Balay K, Belliot G, Pothier P.** Actualités sur les norovirus *MDSciences*, 2009 (sous presse).
22. **De Rougemont A, Pothier P.** Rotavirus. *Traité de biologie clinique de l'EMC*, 2009 (sous presse)

8.1.4. Communications internationales

1. **De Rougemont A., Kaplon J.,** Gendrel D., Lebon P., Lorrot M., Bingen E., Gagneur A., Tran A., Stephan J.L, Pillet S., Rodiere M., Foulongne V., Floret D., Oriot D., Dubos F., Alain S., Huet F., **Pothier P.** Changing pattern of rotavirus G genotype in French children: high prevalence of G9 and increase of G2 strains. 26th annual meeting of the European Society for Paediatric Infectious Diseases, Graz (Autriche) May 13-17 2008

8.1.5. Communications nationales

2. **Kamel A, Pothier P,** Ali M, **Belliot G.** Prédominance et circulation des virus entériques dans l'agglomération du Caire. Journées Francophones de Virologie, 27-28 mars 2008, Institut Pasteur, Paris.
3. Le Guyader FS, **Balay K,** Le Saux JC, Krol J, Serais O, Parnaudeau S, **Giraudon H,** Delmas G, Pommepuy M, **Pothier P.** Multiple contamination virale dans une épidémie liée à la consommation d'huître. 10^e Journées Francophones de Virologie. Paris, 2008.
4. Surveillance de l'évolution des génotypes G de rotavirus chez l'enfant en France entre 2006 et 2008 : pérennisation des génotypes G1 et G9. **de Rougemont A,** Kaplon J, Gendrel D, Lebon P, Lorrot M, Bingen E, Gagneur A, Tran A, Stephan JL, Pillet S, Rodière M, Foulongne V, Floret D, Oriot D, Martinot A, Alain S, Huet F, **Pothier P.** RICA Dec 2008, Paris.

8.1.6. Conférences sur invitation

5. Emerging enteric viruses: facts and questions. Medical University of Tehran. 22^d February 2008, Téhéran, Iran.

8.1.7. Articles soumis à publication

- a) **Sdiri-Loulizi K,** Hassine M, Gharbi-Khelifi H, Sakly N, Chouchane S, Guediche MN, **Pothier P,** Aouni M, **Ambert-Balay K.** Molecular characterization of Aichi viruses isolated in stool samples from children in Monastir, Tunisia.
- b) **Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K,** Gharbi-Khelifi H, Hassine M, Chouchane S, Sakly N, Guediche MN, **Pothier P,** Aouni M. Detection and molecular characterization of enteric virus in environmental samples in Monastir, Tunisia, between January 2003 and April 2007.

8.2. CONTRAT DE RECHERCHE EN RELATION AVEC LES ACTIVITES DU CNR

1. *Conseil Régional : Contrat d'étude.*
2. *CMCU, Comité Mixte Franco-Tunisien pour la Coopération Universitaire « Suivi des virus entériques dans l'environnement : variabilité génétique, typage moléculaire-phylogénie des astrovirus, calicivirus et de l'hépatite A. Collaboration avec le Pr M. Aouni de l'Université de Tunis.*
3. *Contrats européens :*
 - 3.1. *Enteric Virus Emergence, New Tools (EVENT), 6^e PCRD (FP6-2002-SSP-1) 2004-2008.*
 - 3.2. *Prevention of emerging (food-borne) enteric viral infections: diagnosis, viability testing, networking and epidemiology (DIVINE-NET). Public health programme SANCO, decision N° 1786/2002/EC. 2004-2007.*
4. *Contrat ANR – PRNA : ADHERESIST, 2007. Contamination of food products by enteric viruses (HAV, norovirus, enterovirus): connection between surface properties, adhesion ability and resistance induced to technological and hygienic treatments.*
5. *Contrat ANR–PRNA : SPICECLEAN, 2008. Evaluation de l'efficacité microbicide et du bénéfique organoleptique de traitements athermiques innovants de décontamination appliqués à des épices et des herbes aromatiques séchées. Porteur du projet : P Gervais, GPMA Université de Bourgogne*
6. *Partenariat Hubert Curien, programme Gundishapur Franco-Iranien : 2007-2008.*
7. *Partenariat Hubert Curien, programme Imhotep Franco-Egyptien: 2007-2008.*
8. *Bourse d'étude du gouvernement Egyptien pour KAMEL Aziza (4 années).*
9. *Contrat d'étude Sanofi-Pasteur-MSD : épidémiologie des rotavirus en France.*
10. *Contrat Health Protection Agency : épidémiologie des rotavirus en Europe.*

8.3. COLLABORATIONS

- Collaborations institutionnelles

1. *IFREMER- DEL/MP/Microbiologie (Dr Pommepuy et Le Guyader).*
2. *CNR des hépatites (Pr Elisabeth Dussaix).*
3. *CNR des entérovirus (Pr Bruno Lina).*
4. *Unité de virologie des aliments et de l'eau, AFSSA-LERQAP, 22, rue Pierre Curie 94704 Maisons-Alfort (Dr Sylvie Perelle).*
5. *Dans le cadre du contrat ANR ADHERESIST :*
 - Unité de virologie des aliments et de l'eau, AFSSA-LERQAP, 22, rue Pierre Curie, 94704 Maisons-Alfort (Dr Sylvie Perelle).*
 - ADRIA Normandie (Dr T. Morin).*
 - LCPME UMR 7564, Nancy (Pr Ch. Gantzer).*
 - Microbiology Safety Unit-Institut Pasteur Lille (Dr N. Deboosere) :*
 - Research Center Nestlé, Lauanne (Dr Sanchez-Morgas).*
 - Anjou Research-Veolia Environnement (Dr Menard-Szczepara).*
6. *Dans le cadre du contrat ANR SPICECLEAN :*
 - Laboratoire de Génie des Procédés Microbiologiques et Alimentaires, Université de Bourgogne (Pr P. Gervais)*
 - ADRIA Normandie (Dr T. Morin).*
 - Laboratoire de Microbiologie du Froid, Université de Rouen (Dr N. Orange)*
 - CRITT AGRO HALL, Evreux (Dr F. Tonon).*
 - CRITT 2ABI AGRO ALIMENTAIRE ET BIO INDUSTRIEL, Dijon (Dr JM Delaitre)*

7. *Service de Pédiatrie Générale, Hôpital Saint Vincent de Paul, Paris (Pr D. Gendrel).*
8. *Services de pédiatrie et de virologie des CHU de Brest, Lille, Limoges, Lyon, Montpellier, Poitiers, Saint-Etienne, des hôpitaux de l'AP-HP Trousseau, Robert-Debré et Saint-Vincent-de-Paul.*
9. *Service de virologie, CHU de Limoges (Prs F Denis et S Alain).*
10. *InVS (Drs Henriette de Valk, Gilles Delmas, Véronique Vaillant et Anne Gallais).*
11. *OPEN ROME, 67 rue du Poteau, 75018 Paris (Jean-Marie Cohen).*
12. *INSERM U 601 (Dr J. Le Pendu).*
13. *Laboratoire des Maladies Transmissibles, Université de Tunis, Tunisie (Pr Mahjoub Aouni).*
14. *Réseaux européens: **Pays Bas**: National Institut for Public Health, Bilthoven (Dr M. Koopmans), **Finlande**: Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH), **Danemark**: Virus Diagnostics Laboratory, Copenhagen (Dr Böttiger), **Suède**: Karolinska Institutet, Slona (Dr Swensson 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) and Universitat de Barcelona (Dr Bosch A), **Italie**: Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), **Slovénie**: University of Ljubljana (Dr. Mateja Poljsak-prijatelj), **Hungary**: State Public Health Service (Prof. György Szücs).*

- Collaborations industrielles

1. *Argène-Biosoft, 09120 Varilhes, France.*
2. *Sanofi -Pasteur-MSD, 69348 Lyon Cedex 07, France.*
3. *BioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile.*
4. *Covalab, 69000 Lyon.*
5. *Danone Vitapole, 91767 Palaiseau Cedex.*
6. *Coris Bioconcept, Belgique.*

9. PROGRAMME D'ACTIVITE DES ANNEES 2009 ET 2010

9.1. MISE AU POINT DE REACTIFS

9.1.1. Rotavirus

A partir de nos anticorps monoclonaux anti-rotavirus, nous développons avec les sociétés Covalab et Coris Bioconcept (chapitre 7.1.) des réactifs de détection des rotavirus. Il s'agit de développer un test ELISA et un test d'immuno-chromatographie dont les coûts réduits permettraient une large utilisation dans les pays en voie de développement et ainsi permettre une surveillance virologique en cas de campagne de vaccination. Ce programme devrait être finalisé durant l'année 2009.

9.1.2. Norovirus

En collaboration avec la société BioMérieux, nous développons un programme de production d'anticorps monoclonaux contre les norovirus de génogroupe I et II avec deux objectifs :

- Utiliser ces outils pour développer un test de détection par immuno-chromatographie suffisamment sensible pour être utilisé en diagnostic de routine. Nos premier anticorps monoclonaux sont en évaluation par BioMérieux. Un programme de production et de sélection par résonance plasmonique de surface (Biacore) est établi et bien avancé. L'objectif est d'obtenir un réactif pour la deuxième moitié de 2010.
- Posséder des outils moléculaires pour l'analyse des souches anciennes et nouvelles. Utiliser ces outils pour des expériences de compétition et inhiber la fixation des norovirus sur les sucres récepteurs (Collaboration avec Jacques Le Pendu INSERM U 601). Projet pour les années 2009 à 2011.

9.2. CONTAMINATION VIRALE DES MATRICES ALIMENTAIRES

Notre laboratoire participe à un programme d'étude sur la contamination de matrices alimentaires par des virus entériques (VHA, norovirus, entérovirus). Ce programme étudie les relations existantes entre propriétés de surface des virus, leur capacité d'adhésion et leur résistance aux traitements technologiques et hygiéniques. Son financement a été obtenu auprès de l'ANR-PRNA (« ADHERESIST »). Ce programme doit se poursuivre durant les années 2009 et 2010.

Notre laboratoire participe à un programme se proposant d'évaluer l'efficacité microbicide des traitements athermiques de décontamination appliqués à des épices et des herbes aromatiques séchées. Ce programme « SPICECLEAN » a été financé par l'ANR dans le cadre du programme ALIA. Ce programme est prévu pour les années 2009 à 2011.

9.3. ETUDES EPIDEMIOLOGIQUES

9.3.1. Epidémies de gastroentérites en Etablissements Hébergeant des Personnes Âgées

Notre activité de CNR des virus entériques nous permet d'analyser un grand nombre de gastroentérites survenant dans ces établissements quelque soit leur localisation sur le territoire. L'étude coordonnée par le Dr Philippe Gaspard et financée par le **CCLIN-NORD EST** concernait 97 établissements de cette inter-région.

Cette étude, dont les résultats préliminaires sont présentés dans le tableau 2 page 23, constitue pour nous une étude de faisabilité que nous souhaiterions poursuivre plus largement sous forme de PHRC impliquant les gériatres de différents CHU. Cette étude devrait nous permettre une évaluation plus précise de l'impact des épidémies de gastroentérites à norovirus chez les personnes vivant en établissement. Impact à mesurer en termes de morbidité-mortalité mais aussi en termes de coût économique.

Plusieurs sociétés dans le monde ont commencé un programme de développement de vaccin prototype destiné à protéger contre les infections à norovirus. La poursuite de ces programmes (et de ces investissements) n'a de sens que si le ratio coût vaccinal-coût de la maladie est favorable.

9.3.2. Epidémiologie moléculaire des rotavirus en milieu pédiatrique

La surveillance moléculaire des rotavirus sera poursuivie avec les 11 centres précédemment inclus. S'ajouteront les centres de Nice, de Nantes et un groupement de laboratoires privés de la région parisienne et de Dijon. L'inclusion de ces laboratoires privés nous permettra de toucher des cas moins sévères de gastroentérites. Nous aurons toujours pour objectif la détection des souches émergentes, d'apprécier l'importance de la transmission inter espèce, étudier les mécanismes de cette transmission (segments génomiques impliqués, possibilités de réassortiments).

Nous aurons également pour objectif l'amélioration des techniques de caractérisation et leur adaptation aux nouvelles souches.

9.3.3. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique

Outre la détection systématique du virus Aichi dans les selles, nous avons réalisé une étude sérologique pour la population française à partir d'une sérothèque classée par tranche d'âge (publication n°6). Nous avons commencé une étude identique en Tunisie que nous allons corréliser avec les résultats obtenus dans les selles des enfants tunisiens et dans les prélèvements de l'environnement. Nous pensons obtenir des résultats opposés à ceux obtenus en France. En Tunisie, la circulation du virus Aichi est importante entraînant des infections multiples dans l'enfance. Au terme de ces travaux, nous pensons pouvoir mieux apprécier la pathogénicité de ce virus ainsi que son rôle « d'indicateur virologique » de la qualité de l'eau de ces pays.

Parallèlement nous poursuivons la caractérisation des souches, notamment la souche de génogroupe C qui serait plus localisée à l'Afrique de l'Ouest alors que nous ne l'avons jamais rencontré en Tunisie et en France (à l'exception d'une petite migrante du Mali).

9.3.4. Epidémiologie virus des gastroentérites dans le pourtour méditerranéen.

La surveillance moléculaire des virus sera poursuivie en Tunisie et en Egypte en comparant les souches circulant dans la population et les souches détectées dans les eaux usées en amont et en aval des stations de traitement des eaux.

Notre objectif étant d'étudier les cycles épidémiologiques des virus entériques afin de comprendre les différences observées entre la diversité des souches détectées dans l'environnement et la prédominance des norovirus GGII.4 dans la population.

Ces projets seront financés par un contrat Imhotep pour l'Egypte et une demande de financement a été déposée auprès de l'Agence Universitaire de la Francophonie dans le cadre de l'action « réseau de chercheurs Environnement et développement durable »

9.3.5. Epidémiologie virus des gastroentérites chez les bovins.

En collaboration avec la Direction Départementale des Services Vétérinaires de Côte d'Or nous avons réalisé une étude épidémiologique dans les selles de veau diarrhémique. En entreprenant cette étude nous avons plusieurs objectifs : la caractérisation de souches bovines et le risque de zoonose, l'étude de l'épidémiologie des rotavirus chez des animaux vaccinés (la vaccination antirotavirus est pratiquée depuis plus de 10 ans) et la caractérisation de nouvelles souches de virus. Les résultats préliminaires montrent :

- Le rotavirus ne représentent que 15,6% des prélèvements alors que les calicivirus 23,1%.
- La majorité des rotavirus sont de génotype G6 (60,6%) suivi de G10 (23,9%), seul 2,8% appartiennent au génotype G8 (chez l'homme ce génotype représente 1% des génotypes de rotavirus).
- Les 23,1% de calicivirus se répartissaient ainsi : 19,5% appartenaient au génotype III des norovirus et 7,5% à un nouveau genre dénommé *Becovirus*. parmi les souches correspondant à ce nouveau genre, une pourrait correspondre à un génotype non encore décrit.

Cette étude sera poursuivie dans les années 2009 à 2011 en impliquant d'autres DSV et avec l'appui de la société Merial.

9.4. ETUDES FONDAMENTALES

9.4.1. Etudes des interactions entre norovirus et récepteurs glycanes

Cette étude est effectuée en collaboration avec une équipe de Nantes (Dr J. Le Pendu, INSERM U601) et l'Institut Femto-ST de Besançon (Dr W. Boireau).

La capsid des norovirus est constituée d'une seule protéine (VP1) codée par l'ORF2 et elle est impliquée dans le déterminisme antigénique et la fixation au récepteur. Le potentiel évolutif des norovirus de génogroupe II génotype 4 (GGII.4) est très probablement lié à la capsid virale et plus particulièrement à la région P2 de cette capsid VP1. Nous avons caractérisé l'ensemble du génome de cinq norovirus appartenant au génogroupe II.4 : la souche Dijon 171 (2002), Hunter (2004), 30VG (2006a), H80 (2006b), Le Caire (2007) et nous disposons du plasmide de Maryland 145 (1987). Nous possédons également le norovirus murin et les VLPs correspondantes. Par mutagenèse dirigée sur l'ORF2, nous avons construit des mutants d'intérêt (site de fixation au récepteur, délétion d'acides aminés considérés importants dans les liaisons avec le récepteurs ou les anticorps) et produit des VLPs par expression de l'ORF2.

En parallèle, nous disposons d'une collection de différents carbohydrates ou glycanes représentatifs des antigènes tissulaires des groupes sanguins qui sont aussi les récepteurs des norovirus.

Les interactions entre les VLPs et ces glycanes ou des anticorps seront mesurées par résonance plasmonique de surface (Biacore) qui nous permet de déterminer l'affinité de la liaison et ainsi d'objectiver des différences de réactivité.

Ce projet devrait se poursuivre durant les 3 prochaines années (2009-2011) et les premiers résultats montrent une réactivité différente des variants GGII.4 selon les glycanes testés. Ce travail devrait être valorisé par une thèse d'Université (2011) et des publications (à partir de fin 2009/début 2010).

9.4.2. Etude de la réponse immune aux infections à rotavirus

Nous poursuivons l'étude chez la souris des mécanismes de la réponse immunitaire après immunisation par des protéines ou des pseudo-particules virales par voie nasale, orale ou intra rectale.

Etude du « homing » (ou « adressage ») : La voie nasale a été proposée par certains comme voie d'administration de vaccination antirotavirus sous forme de VLPs. Nous avons montré que l'immunisation intra-rectale était aussi efficace que l'immunisation orale, ces deux voies d'immunisation étant plus efficaces que la voie intra-nasale. Dans la seconde partie du travail, nous avons étudié la migration des cellules sécrétant les anticorps IgA spécifiques du rotavirus aux chimiokines CCL25 et CCL28 qui sont respectivement les ligands des récepteurs CCR9 et CCR10 jouant un rôle dans la migration des plasmocytes. Nous avons également étudié par ELISPOT la liaison des cellules sécrétant des IgA spécifiques (vis-à-vis du rotavirus) à la molécule d'adhésion MadCAM-1.

Les résultats montrent l'importance de la liaison intégrine $\alpha4\beta7$ -MAdCAM, avec éventuellement le récepteur CCR10, dans la migration des cellules vers la *lamina propria* de l'intestin grêle. Ainsi la voie d'administration intra-nasale est bien moins adaptée que la voie orale ou la voie intra-rectale. Une publication est en préparation et sera soumise courant 2009.

Etude des mécanismes de protection : Par des techniques de déplétion (anti-CD4 et anti-CD8) ou en utilisant des souris déficientes (souris Jh^{-/-} déficientes en lymphocytes B) nous montrons le rôle prépondérant des lymphocytes CD4⁺. Ce travail fera l'objet d'une publication courant 2009.

Ce projet sera poursuivi durant les années 2009 et 2010.

10. ANNEXES : FORMULAIRES

Renseignements disponibles sur le site :

<http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-referance-des-virus-enteriques/traitement-des-prelevements>

10.1. ANNEXE A1 :

TRAITEMENT D'UNE EPIDEMIE DE GEA OU D'UNE TIAC AVIS D'EPIDEMIE DE GEA

- Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR :
 - ✓ **Faxer** au demandeur **les 4 formulaires** de la pochette « formulaires à faxer » **ou** envoyer par **e-mail** les « formulaires e-mail ».
 - ✓ Remplir un **formulaire « premières infos »** (formulaire A) (classeur noir)
Important : indiquer l' **identifiant épidémie** de la manière suivante :
code dépt - 2 premières lettres ville - mois – année
Ex : épidémie à Chalon/Saône en mars 2006 = 71CH0306
puis **garder ce code tout au long de l'épidémie.**

Si ambiguïté sur l'identifiant épidémie, ajouter un numéro d'ordre.
Ex : Charolles, 71CH0306-2
 - ✓ **Faxer ce formulaire rempli** à Gilles Delmas (InVS), au **01 41 79 67 69**
- Annonce d'une épidémie par un email de l'InVS :
 - ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques qui auront été fournis par l'InVS.
- Annonce d'une épidémie par l'IFREMER ou l'AFSSA :
 - ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques.
 - ✓ S'assurer de la transmission des informations à l'InVS, sinon les transmettre.
- Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :
 - ✓ Remplir un **formulaire premières infos** (formulaire A) (voir procédure ci-dessus) et le **faxer** à l'InVS

RECEPTION DES PRELEVEMENTS

- Conserver les échantillons à **4°C (traitement dans les 48h) ou à – 20°C.**
- **Enregistrer** les prélèvements :
 - ✓ Repérer sur la **coprothèque** (classeur jaune, onglet : externes) le ou les numéros et identifier chacun des échantillons (commence par **E...**).
 - ✓ Enregistrer les patients dans **Lab400** :
 - ◆ Entrer en numéro de séjour le numéro « 011731380 » correspondant au « **patient CNR** » pour tous les échantillons et préciser dans l'interface « *commentaire analyse : 30925 idcnp* » le nom, le prénom et la date de naissance de chacun des patients.

- ◆ Enregistrer pour chaque échantillon les **examens demandés** :
 - GEA : Elisa adéno 40/41, astro et rota A et RT-PCR Calicivirus

Et pour toutes les **épidémies liées à l'eau ou aux coquillages**, ajouter les 4 analyses suivantes :

- 30958 : RT-PCR Aichivirus
- 30932 : RT-PCR Paréchovirus
- 30944 : RT-PCR Entérovirus
- 30942 : RT-PCR Hépatite A

- ◆ Une fois chaque patient enregistré, imprimer la **liste de travail 11** qui permettra de répertorier les résultats des différentes manip.

- ✓ Mettre toutes les données dans une chemise identifiée par :

- ◆ l'**identifiant épidémie** correspondant
- ◆ le **numéro** du carton/disquette suivi du numéro de la chemise

Ex : 15-3 signifie : carton et disquette en cours n°15, chemise n°3 dans ce carton et cette disquette

- ◆ le **nom de la ville** qui a inspiré le numéro d'identifiant
- ◆ les **numéros des échantillons** correspondants (E___ à E___)

Y ranger tous les documents accompagnant les prélèvements, les courriers, e-mails.
Joindre un exemplaire du **récapitulatif rendus** (formulaire B) et un exemplaire du **viral gastroenteritis outbreak form** (formulaire C).

ANALYSES

□ Immuno-enzymologie

- ✓ adénovirus 40-41 (ELISA Meridian Diagnostic)
- ✓ astrovirus (DAKO)
- ✓ rotavirus du groupe A (« maison », respectivement)

Les kits ELISA sont stockés à + 4°C dans le frigo en pièce d'extraction. Ils sont à utiliser dans la pièce 310. Les kits transportés en pièce 310 doivent y être conservés et ne doivent en aucun cas être rapportés en pièce d'extraction. **Il ne faut donc pas oublier de laisser le tampon de dilution des selles dans la pièce d'extraction.**

□ Extraction des acides nucléiques

- ✓ manuellement, avec QIA Amp viral RNA, Qiagen **OU**
- ✓ automatiquement sur EasyMag

□ Amplification génique

- ✓ Recherche des calicivirus humains :

- ◆ Genre *Norovirus* :

- polymérase (amorces JV12/JV13)
- capsid (amorces GISKF/GISKR et GIISKF/GIISKR, génogroupes I et II respectivement)

- ◆ Genre *Sapovirus* : polymérase (amorces SR80/NVP110)

Si épidémie liée à l'eau ou aux coquillages, réaliser en plus :

- ✓ Recherche des paréchovirus : région non codante (amorces 5'NTR-F/5'NTR-R)
- ✓ Recherche du virus Aichi : polymérase (amorces AI6261/AI6779)
- ✓ Recherche de l'hépatite A

- ✓ Recherche des entérovirus
- Typage (par séquençage des produits de PCR)
 - ✓ calicivirus
- Si *ELISA positif(s)* :
 - ✓ rotavirus du groupe A
 - ✓ astrovirus (RT-PCR Mon244/Mon245 et si nécessaire Mon269/Mon270)
 - ✓ adénovirus (PCR)

Rq : Penser à copier les manips sur le cahier EXTERNE.

Synthétiser les résultats sur la liste de travail à la fin de chaque manip afin d'éviter de faire plusieurs fois la même chose.

RENDU DES RESULTATS

- Rendre les **résultats préliminaires**
 - ✓ **par téléphone** au prescripteur avant l'envoi définitif par courrier.
 - ✓ par **e-mail** à l'InVS tia@invs.sante.fr ou n.jourdan@invs.sante.fr
- **Rendre les résultats définitifs dans Lab400:**
 - ✓ n = négatif , p = positif
 - ✓ Sortir les comptes rendus de Lab400 en procédure d'édition n°466 mais annuler directement la tâche sur l'imprimante (VIROLOIL08, bureau 304).
- **Sur la disquette TIAC, créer un dossier au nom de l'épidémie comprenant :**
 - ✓ Un **compte rendu**, à imprimer en plusieurs exemplaires pour :
 - le laboratoire et le(s) prescripteur(s)
 - la chemise de l'épidémie
 - P Pothier
 - la DDASS et CIRE si prévenues
 - l'InVS (sans le nom des patients)
 - ✓ Un **tableau récapitulatif** de l'épidémie, à imprimer en 4 ou 5 exemplaires, pour :
 - le classeur de résultats définitifs (gros classeur noir)
 - la chemise de l'épidémie
 - P Pothier
 - la DDASS et CIRE si prévenues
 - l'InVS
- Pour les **calicivirus** séquencés : compléter l'**alignement des souches en fonction du génotype (+ le tableau récapitulatif)**.
- **Entrer les données épidémiologiques et moléculaires :**
 - Dans le tableau **banque de données- séquences**
 - Sur le site **eufodborneviruses (réseau européen)**
 - Sur le site de l'InVS **EpiData**

NB : Pour les épidémies annoncées mais non reçues, ne pas oublier de rentrer quand même les données sur le site InVS EpiData.
- **Remplir le récapitulatif externe (épidémies et cas sporadiques).**

ECHANTILLON EXTERNE OU HOSPITALISE HORS CONTEXTE EPIDEMIQUE

RECEPTION DU PRELEVEMENT

- ❑ Conserver les échantillons à **4°C (traitement dans les 48 h)** ou à **- 20°C**.
- ❑ **Enregistrer le prélèvement :**
 - ✓ Dans la **coprothèque** (classeur jaune, onglet : externes ou hospitalisés), enregistrer l'échantillon face au numéro (commence par **E...**ou **H...**) en fin de liste.
 - ✓ Enregistrer le patient dans **Lab400** :
 - ◆ Enregistrer les nom, prénom, date de naissance ...
 - ◆ Enregistrer les examens demandés
 - ◆ Sortir la liste de travail et la mettre avec les papiers accompagnant le prélèvement dans une pochette plastique

ANALYSES

Analyses à réaliser selon la demande

Pour les hospitalisés en néonate sans prescription et dans certains cas particuliers, faire toute la batterie virale par PCR (codes 30939 + 30942 + 30930) :

- ✓ PCR adénovirus + CMV + bocavirus
- ✓ RT-PCR calicivirus, rotavirus A, rotavirus C, astrovirus, torovirus, coronavirus, entérovirus, aichivirus, paréchovirus et éventuellement hépatite A.

Copier les manip sur le cahier EXTERNE.

Synthétiser les résultats sur la liste de travail à la fin de chaque manip afin d'éviter de faire plusieurs fois la même chose.

RENDU DES RESULTATS

- ❑ **Rendre les résultats dans LAB400 :**
 - ✓ n = négatif , p = positif
- ❑ Pour les **Hospitalisés** :
 - ✓ Sortir les **compte-rendus de Lab400** en « Edition des compte-rendus » n°8 puis « Edition par numéro » n°2.
Les faire signer et en envoyer un exemplaire au **prescripteur** par courrier interne.
 - ✓ En garder un exemplaire pour le mettre dans la **pochette plastique**.
La pochette plastique est à archiver dans le **classeur** bleu 'Hospitalisés'.
 - ✓ Remplir le **récapitulatif** hospitalisés.
 - ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter **l'alignement des souches en fonction du génotype (+ le tableau récapitulatif)**.
 - ✓ Entrer les séquences dans **tableau banque de données - séquences**
- ❑ Pour les **Externes** :
 - ✓ Faire un **compte-rendu** « patient » sur la disquette **Cas sporadiques Externes**
L'imprimer sur papier à **en-tête CHU**

Le faire signer et l'envoyer au **prescripteur** sous enveloppe.

- ✓ En garder un exemplaire pour le mettre dans la **pochette plastique**.
La pochette plastique est à archiver dans le **classeur** jaune 'Cas sporadiques'
- ✓ Remplir le **récapitulatif externes épidémies et cas sporadiques**
- ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter **l'alignement des souches en fonction du génotype (+ le tableau récapitulatif)**.
- ✓ Entrer les séquences dans **tableau banque de données - séquences**

10.2. ANNEXE A2 : premières informations

Centre National de Référence
des Virus Entériques

A l'attention de Gilles DELMAS, InVS

FAX : 01 41 79 67 69

PREMIERES INFORMATIONS

IDENTIFIANT EPIDEMIE	
ANNONCEE LE PAR (Nom, adresse, téléphone)	RECU DIRECTEMENT AU CNR (sans annonce préalable) LE : ENVOYE PAR :
DDASS prévenue : oui <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> ne sait pas <input type="checkbox"/> Si non, va-t-elle l'être ? oui <input type="checkbox"/> : par l'établissement touché <input type="checkbox"/> non <input type="checkbox"/> : pour quel motif ? par le CNR <input type="checkbox"/> Adresse et tél de la DDASS :	
AUTRES SUIVIS (DRASS, CIRE, DSV, AFSSA, IFREMER...) (Nom, adresse, téléphone)	
LIEU	
PERIODE EPIDEMIQUE	
NOMBRE DE CAS :	NOMBRE DE PERSONNES EXPOSEES :
NOMBRE DE PRELEVEMENTS ANNONCES :	NOMBRE DE PRELEVEMENTS RECUS :
DESCRIPTION DES SIGNES CLINIQUES Nausées <input type="checkbox"/> Vomissements <input type="checkbox"/> Douleurs abdo <input type="checkbox"/> Diarrhée <input type="checkbox"/> Fièvre <input type="checkbox"/> Précisions :	
NOTION DE CONTAGE, ALIMENTS OU EAU CONTAMINES ?	
COMMENTAIRES DIVERS	

10.3. ANNEXE A3 : Protocoles d'envoi d'échantillons de selles



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

*Centre National de Référence
des Virus Entériques*

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

PROTOCOLE D'ENVOI D'ECHANTILLONS DE SELLES POUR INVESTIGATION D'UNE EPIDEMIE DE GASTRO-ENTERITES

Recueil des échantillons :

- Pour une investigation d'une épidémie de gastro-entérites, un minimum de **5 échantillons** est à envisager.
- Un échantillon de selles par patient doit être recueilli dans un flacon type flacon à coproculture ou à urines.
- **Les prélèvements sont à conserver à + 4°C ou à - 20°C.**

Réalisation du colis et envoi :

- Les procédures d'emballage et de transport doivent correspondre aux normes internationales définies pour les transports des « échantillons cliniques » : instructions ADR P650 (par route) ou IATA 650 (par air).
- L'ensemble des flacons est mis dans un sac plastique dans lequel on aura pris soin de mettre du papier absorbant. Ce sac lui-même devra être mis dans une boîte rigide (plastique, métallique...) fermée hermétiquement, le tout dans un colis en carton ou polystyrène.
- Le colis (type Colissimo) est à envoyer à l'adresse suivante (ouvert tous les jours sauf le dimanche) :

Centre National de Référence des Virus Entériques
Laboratoire de virologie
CHU – Plateau Technique de Biologie
2 rue Angélique Ducoudray
BP 37013
21070 DIJON Cedex

- Joindre à ce colis les formulaires n°1 (demande d'investigation), n°2 et n°3 (renseignements épidémiologiques) ci-joints.

10.4. ANNEXE A4 : Formulaire 1.



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

*Centre National de Référence
des Virus Entériques*

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

DEMANDE D'INVESTIGATION D'UNE EPIDEMIE DE GASTRO-ENTERITES FORMULAIRE N°1

- Expéditeur du colis** (pour le rendu de résultats) :
 - Nom
 - Institution
 - Adresse

 - Téléphone

- Médecin demandant l'investigation** (pour le rendu de résultats):
 - Nom
 - Institution
 - Adresse

 - Téléphone

- Nombre d'échantillons envoyés :**

(Préciser l'identité et la date de naissance des patients ainsi que la date de prélèvement sur les pots)

10.5. ANNEXE A5 : Formulaire 2



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

Centre National de Référence des Virus Entériques

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

RENSEIGNEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES FICHE GLOBALE – FORMULAIRE N°2

- Référent (nom) :**
- Caractéristiques de l'épidémie :**
 - Lieu** (Hôpital, maison de retraite, école, restaurant, domicile...) :
.....
 - Date d'apparition des signes :** - pour le premier cas :/...../.....
- pour le dernier cas :/...../.....
 - Date de fin d'épidémie :**/...../.....
 - Nombre de cas :**
Dont nombre de patients hospitalisés suite à l'épidémie :
 - Nombre de personnes exposées :**
 - Nombre de cas dans les groupes d'âges suivants :**
0-4 ans : 15-64 ans :
5-14 ans : >65 ans :
 - Mode de transmission suspecté :**
 - Hydrique
 - Contact avec animaux
 - Personne à personne
 - Alimentaire puis personne à personne
 - Alimentaire
 - Si alimentaire, préciser :
 - date du repas :/...../.....
 - aliment(s) incriminé(s) :
 - investigation virale des aliments : oui non
 - Durées moyennes :** - de l'incubation :, - des signes :
 - Signes cliniques**
 - Nombre de cas avec :**
 - diarrhées uniquement :
 - vomissements uniquement :
 - diarrhées et vomissements :
 - Autres signes :**
 - Analyses microbiologiques (bactériologie & parasitologie) réalisées :** oui non
 - Si oui, préciser :
 - nombre de patients :
 - résultats :

10.6. ANNEXE A6 : Formulaire 3



Centre Hospitalier
Universitaire de Dijon

Laboratoire de Virologie

*Centre National de Référence
des Virus Entériques*

CHU, Plateau Technique de Biologie
2, Rue Angélique Ducoudray, BP 37013, 21070 Dijon
Tél : 03-80-29-34-37 - Fax : 03-80-29-32-80
cnr@chu-dijon.fr

**RENSEIGNEMENTS EPIDEMIOLOGIQUES
FICHE INDIVIDUELLE – FORMULAIRE N°3**

- Nom :**
- Prénom :**
- Date de naissance :**
- Sexe :**
- Date du prélèvement :**

- Signes cliniques* :**
 - Diarrhée
 - Vomissements
 - Fièvre
 - Douleurs abdominales
 - Autres (préciser) :

- Durée des signes cliniques :** du au
- Evolution des signes* :** Guérison Hospitalisation
Autres

- Résultats des analyses microbiologiques (bactériologie et parasitologie) :**

*Cocher les cases concernées

11. ANNEXES : PUBLICATIONS

- 1. J Public Health (Oxf). 2008 ; 30 : 82-90.**
- 2. J Clin Microbiol. 2008 ; 46: 1252-8.**
- 3. J Clin Microbiol. 2008 ; 46: 1349-55.**
- 4. Am. J Trop. Med. Hyg. 2008. 78 : 522-526.**
- 5. Appl Environ Microbiol. 2008 Mar 31.**
- 6. Arch Virol. 2008 ; 153 : 1171-4.**
- 7. J Clin Microbiol. 2008, 46: 2959-65.**
- 8. J Clin Microbiol. 2008 ; 46 : 4011-7.**
- 9. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008 Oct 15.**
- 10. Eurosurveillance, Volume 13, Issue 44, 30 October 2008, 17-18.**
- 11. J Clin Microbiol. 2009 Feb;47(2):421-9**
- 12. Emerg Infect Dis. 2009 ; 15 (1):31-8 (publication collective du réseau européen).**
- 13. J Clin Microbiol. 2009 Feb 4.**
- 14. Journal of Infectious Diseases (sous presse)**
- 15. Arch Pediatr. 2008 ; 15 : 362-374.**
- 16. Arch Pediatr. 2008 (7): 1183-92.**
- 17. Pathol Biol (Paris). 2009 Feb;57(1):86-9.**