



Rapport d'activité 2011

**Centre National de Référence
des virus entériques
(entérovirus exclus)**

**Bilan d'activité 2011
et programme 2012 - 2013**

**Responsable : Professeur Pierre POTHIER
Laboratoire de Virologie
CHU de Dijon**

Avril 2012

Rapport d'activité 2011

Centre National de Référence des virus entériques (entérovirus exclus)

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%20>

*Accessible à l'aide des moteurs de recherche – Google et autres - avec la dénomination
« CNR des virus entériques »*

Bilan d'activité 2011 et programme 2012 - 2013

Responsable : Professeur Pierre POTHIER

Collaborateurs (2011 - 2016) :

Docteur Christelle AUVRAY

Docteur Katia BALAY

Docteur Gaël BELLIOU

Docteur Davide AGNELLO

Docteur Alexis DE ROUGEMONT

Avril 2012

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION	1
1.1. RAPPEL DES MISSIONS DU CNR DES VIRUS ENTERIQUES	1
1.2. ETAT DE LA QUESTION OBJECTIS DU CNR	1
1.3. RESUME DES ACTIVITES DE 2011 ET OBJECTIFS 2012 - 2013	2
1.4. L'EQUIPE ET ORGANISATION DU CNR	3
1.4.1. Fiche d'identité du CNR	3
1.4.2. L'équipe	4
1.4.3. Organisation du CNR	4
1.4.4. Organigramme du CNR et du laboratoire de virologie	5
1.5. DEMARCHE QUALITE DU CNR	6
1.5.1. Contrôle de qualité interne	6
1.5.2. Contrôle de qualité externe européen	6
1.5.3. Centre de Ressources Biologiques	6
1.5.4. Accréditation	6
1.6. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS	8
1.6.1. Les locaux	8
1.6.2. Les équipements	8
2. ACTIVITES D'EXPERTISE	9
2.1. CAPACITES TECHNIQUES DU CNR	9
2.1.1. Liste des techniques de référence disponibles	9
2.1.2. Collection de souches, d'antigènes ou d'anticorps de référence	9
2.1.2.1. Description des collections	9
2.1.2.2. Conditions de stockage	11
2.1.2.3. Conditions de mise à disposition des souches	11
2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR (ANNEE 2011)	11
2.2.1. Evaluation des trousse de diagnostic de norovirus	11
2.2.2. Evaluation des procédés virucides	12
2.2.3. Investigations virologiques de cas sporadiques	12
2.2.3.1. Entérocolites ulcéro-nécrosantes	12
2.2.3.2. Surveillance de patients immunodéprimés	12
2.2.4. Investigations virologiques des épidémies	13
2.2.5. Principales souches virales caractérisées lors de ces épidémies	14
2.2.6. Conclusions sur les virus entériques caractérisés dans les épidémies	15
3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE	16
3.1. EVOLUTION ET CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS A ROTAVIUS	16
3.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	16
3.1.2. Principaux résultats	16
3.1.2.1. Bilan de la surveillance des saisons 2006-2011	16
3.1.2.2. Variations temporo-spatiales des infections à rotavirus	20
3.1.2.3. Conclusion	25
3.2. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES GASTROENTERITES COMMUNAUTAIRES	26
3.2.1. Fréquence de détection des virus	26
3.2.2. Distribution des virus selon les groupes d'âge	26
3.2.3. Distribution des génotypes des rotavirus et norovirus	28
3.2.4. Conclusions	28
3.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES	29
3.3.1. Réseau de partenaires et répartition géographique	29
3.3.2. Provenance des échantillons	30
3.3.3. Caractéristiques des épidémies (2007-2011)	30
3.3.3.1. Nature et évolution des épidémies	30
3.3.3.2. Sites et modes de transmission	33

3.3.3.3.	Virus en cause.....	35
3.4.	CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX	41
3.4.1.	Réseaux internationaux «FBVE-Net », « NoroNet » et « EuroRotanet »	41
3.4.2.	Collaborations « Egypte - Tunisie - Algérie - Maroc » (2006-2010)	41
3.4.3.	Collaborations « Iran – Niger – Burkina Faso » (2010-2012).....	42
3.4.4.	Collaboration avec le Réseau International des Instituts Pasteur	42
3.4.5.	Contributions de notre laboratoire (2010-2011)	42
3.5.	ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE	43
3.5.1.	Sévérité des gastroentérites selon le génotype de rotavirus (2009-2011)	43
3.5.2.	Virus Aichi : études virologique et épidémiologique (2008-2011).....	43
3.5.3.	Calicivirus bovin et nouveau génotype de <i>Nebovirus</i> (2010-2011).....	43
3.5.4.	Diarrhées chroniques à norovirus chez le transplanté (2010-2011)	43
3.5.5.	Etude des interactions norovirus-récepteurs glycanes (2010-2011).....	43
3.6.	CONCLUSION DES ACTIVITES D'EXPERTISE	45
4.	ALERTE	46
4.1.	CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC L'INVS	46
4.2.	PROCEDURES D'ALERTE DE L'INVS ET DES AUTRES PARTENAIRES.....	46
4.2.1.	Annonce d'une épidémie par téléphone au CNR (par une ARS, un laboratoire...):.....	46
3.1.1.	Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :	46
3.1.2.	Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :	46
4.3.	DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE.....	47
4.3.1.	Transmission des données a l'InVS.....	47
1.1.	Enregistrement d'une épidémie dans la base Voozanoo	47
1.2.	Rendu des résultats à l'InVS.....	47
4.3.2.	Anonymisation des prélèvements	47
4.4.	PROCEDURES DE TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA	48
4.4.1.	Procédures de traitement d'une épidémie.....	48
4.4.2.	Protocoles d'envoi d'échantillons de selles et formulaires.....	54
5.	ACTIVITE D'INFORMATION, DE FORMATION ET DE CONSEIL.....	59
5.1.	PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITES D'EXPERTISE	59
5.2.	ACTIVITES DE CONSEIL.....	59
5.3.	ENCADREMENT DE STAGIAIRES.....	59
6.	TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR... 60	
6.1.	RECHERCHES APPLIQUEES	60
6.2.	RECHERCHES EPIDEMIOLOGIQUES.....	60
6.2.1.	Epidémiologie moléculaire des rotavirus (publication n° 3 et 4).....	60
6.2.2.	Epidémiologie moléculaire des autres virus entériques.....	60
6.2.3.	Diarrhées chroniques chez les immunodéprimés	60
6.2.4.	Caractérisation des virus entériques animaux, épidémiologie moléculaire	60
6.3.	INTERACTIONS NOROVIRUS-RECEPTEUR	60
6.4.	MECANISMES DE LA REPONSE IMMUNE AU NIVEAU DIGESTIF	61
7.	PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS	62
7.1.	PUBLICATIONS NATIONALES	62
7.2.	PUBLICATIONS INTERNATIONALES (2011).....	62
7.3.	COMMUNICATIONS NATIONALES	63
7.4.	COMMUNICATIONS INTERNATIONALES.....	63
7.5.	CONFERENCES SUR INVITATIONS.....	64
7.6.	CONTRATS DE RECHERCHE EN COURS ET LIES AUX ACTIVITES DU CNR	64

8.	PROGRAMME D'ACTIVITE 2012 ET 2013.....	65
8.1.	EN TERMES D'EXPERTISE.....	65
8.1.1.	Participation aux réseaux européens et mondiaux (FBVE et NoroNet, EuroRotaNet) .	65
8.1.2.	Mise à disposition des protocoles de diagnostic et contrôles externes.....	65
8.1.3.	Développement et diffusion des méthodes de diagnostic des norovirus	65
8.1.4.	Diarrhées chroniques chez les transplantés.....	65
8.2.	CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE	66
8.2.1.	Partenariat et collaborations (InVS, IFREMER, ANSES, CNR hépatites A et E):	66
8.2.2.	Surveillance des gastroentérites à rotavirus	66
8.2.3.	Investigations des cas groupés de gastroentérites	66
8.3.	CONTRIBUTION A L'ALERTE DE L'INVS	67
8.4.	ACTIVITE D'INFORMATION, FORMATION, CONSEIL	67
8.4.1.	Site web	67
8.4.2.	Activité de conseil	67
8.4.3.	Activité de formation.....	68
8.4.4.	Colloques et réunions scientifiques.....	68

1. INTRODUCTION

1.1. RAPPEL DES MISSIONS DU CNR DES VIRUS ENTERIQUES

Les missions du CNR des virus entériques (à l'exclusion des entérovirus) ont été définies dans le cahier des charges spécifiques du CNR paru en janvier 2011 :

Apporter une expertise microbiologique :

- Disposer d'une expertise en biologie moléculaire pour l'identification et la caractérisation des différentes souches de virus entériques.
- Participer à la standardisation des méthodes diagnostiques et de typage par l'implication dans un réseau d'expertise et de surveillance internationale,
- Contribuer à la surveillance virologique des gastro-entérites notamment hivernales (surveillance des souches de rotavirus, détection de nouvelles souches virales, notamment calicivirus).

Contribuer à la surveillance épidémiologique, en lien avec l'institut de veille sanitaire :

- En participant à l'investigation de cas groupés par l'identification et la comparaison des souches isolées chez l'homme et dans le véhicule suspecté à l'origine des cas groupés,
- En collaborant avec les réseaux nationaux de surveillance des virus entériques en agroalimentaire (IFREMER, ANSES, etc.),
- En collaborant avec le centre national de référence des virus des hépatites à transmission entérique (hépatites A et E) ;

Contribuer à l'alerte :

- En signalant à l'institut de veille sanitaire tout événement inhabituel : augmentation du nombre de cas, apparition de cas groupés, modification des formes cliniques (répartition, modification de leur expression clinique, formes inhabituelles) etc.

1.2. ETAT DE LA QUESTION OBJECTIS DU CNR

En France, comme dans les autres pays industrialisés, les gastro-entérites se présentent sous **plusieurs aspects posant des problèmes de santé publique totalement différents**.

1. Les gastro-entérites infantiles, principalement à **rotavirus**, sont la cause d'une importante morbidité infantile ayant des répercussions financières sur les budgets de santé et économiques par les coûts indirects induits. Un **vaccin** protégeant contre les infections à rotavirus est disponible. Les questions relatives à sa recommandation ou non sont toujours d'actualité. Les rotavirus ont une très grande diversité génétique et ont montré une fluctuation géographique et temporelle imprévisible. La circulation de souches d'origine animale ou des combinaisons de génotypes inhabituels est faible en France et en Europe. Cependant, le **risque d'émergence de souches nouvelles** est réel. Cette émergence poserait un problème d'efficacité de la vaccination si ces génotypes ne présentaient pas de communauté antigénique avec les souches incluses dans le vaccin.

→ Le CNR des virus entériques **participe activement à un réseau de surveillance épidémiologique européen et anime un réseau national** pour une surveillance moléculaire des rotavirus qui lui permet d'estimer l'importance de ces souches inhabituelle et d'anticiper leur émergence. **Cette surveillance européenne commencée en 2007 devrait se poursuivre durant les prochaines années.**

- Le CNR des virus entériques apporte son expertise aux fabricants de réactifs et laboratoires de microbiologie nationaux de microbiologie en évaluant les réactifs. Dans les deux prochaines années, et en collaboration avec l'AFSSAPS, le laboratoire développera des **contrôles externes des tests de détection des rotavirus dans les selles**.

2. Investigation des cas groupés de gastroentérites

Cas groupés de gastroentérites en collectivités, principalement les établissements hébergeant des **personnes âgées**. Ils sont majoritairement dus aux **norovirus**. Ces gastroentérites surviennent principalement l'hiver, elles sont fréquentes (jusqu'à 50% des établissements selon les épidémies), elles désorientent le fonctionnement des établissements. L'impact économique et social pour ces établissements reste à évaluer. Le mode de transmission de personne à personne, la résistance et la très faible dose infectieuse des norovirus rendent difficile la prévention de ces gastroentérites par les précautions standard d'hygiène. En outre, les norovirus du génogroupe II et du génotype 4 (GII.4) – le plus souvent impliqués - possèdent une étonnante capacité évolutive marquée par l'**apparition de nouveaux variants à l'origine de nouvelles épidémies**. Comprendre les mécanismes de cette évolutivité sera un de nos objectifs pour les années à venir.

Cas groupés de gastroentérites d'origine alimentaire ou hydrique sont également souvent dues aux **norovirus**. Mais à la différence des précédentes, les deux génogroupes sont impliqués. En outre, les co-infections avec plusieurs norovirus ou d'autres virus, notamment le virus Aichi lorsque l'origine est hydrique ou la consommation d'huîtres.

- Le CNR des virus entériques **participe activement à un réseau de surveillance épidémiologique nationale en lien étroit avec l'InVS et les ARS**.

Pour ce qui concerne les gastro-entérites d'origine alimentaire ou hydrique nous collaborons très étroitement avec l'**IFREMER** (Dr S Le Guyader), l'**ANSES** (Maisons Alfort, Dr S Perelle et Nancy, Dr B Gassilloud) et le **CNR des hépatites A et E** (Pr AM Roque-Alfonso et J Isopet).

- Le CNR des virus entériques participe aux **réseaux européens (FBVE-Net) et mondiaux (Noronet)**. En collaboration avec ces réseaux, nous participons aux alertes lorsqu'un événement inhabituel (circulation de nouvelles souches, augmentation anormale des épidémies, épidémies en relation avec un cas groupés survenant sur le territoire français). **Tous ces phénomènes inhabituels font systématiquement l'objet d'une alerte à l'InVS**.
- Ce réseau européen est aussi est une référence internationale avec laquelle nous actualisons et standardisons nos méthodes de détection et de caractérisation nous permettant une **expertise dans le domaine des norovirus et autres virus entériques**. Cette expertise est mise à profit pour les évaluations de réactifs et les investigations de certaines gastro-entérites survenant dans un cadre particuliers (**diarrhées chroniques à norovirus chez les transplantés ou immunodéprimés et entérocolites ulcéro-nécrosantes**).

1.3. RESUME DES ACTIVITES DE 2011 ET OBJECTIFS 2012 - 2013

Les enjeux de santé publique présentés ci-dessus sont toujours d'actualité. La **surveillance et l'alerte** repose sur un réseau structuré permettant une bonne analyse de la situation nationale et

européenne et une vigilance vis-à-vis de tout phénomène anormal permettant ainsi une anticipation des actions. La **participation de notre CNR à ces réseaux nationaux et européens sera poursuivie pour les prochaines années 2012 – 2016**. Ces réseaux nous permettent le partage des techniques et bases de données indispensables à notre **expertise technologique** (caractérisation des souches, alerte, optimisation des techniques...). Nos collaborations avec l'InVS et sur le terrain avec les délégations territoriales des ARS nous permettent aujourd'hui d'intervenir sur l'ensemble du territoire et dans les départements d'Outre-mer

En appui des réseaux existants et bien structurés, nous envisageons d'étendre et organiser d'autres réseaux capables de nous apporter des informations complémentaires. Ainsi, nous poursuivons nos efforts auprès de plusieurs Directions des Services Vétérinaires afin de recueillir **les selles d'animaux diarrhéiques**. L'analyse de ces prélèvements nous a déjà permis de montrer l'identité génétique entre certains rotavirus humains et bovins et ainsi de prouver l'origine animale de ces souches retrouvées chez des enfants. Nous poursuivons nos collaborations avec des laboratoires du sud de la méditerranée afin de structurer un **réseau avec les pays d'Afrique du Nord et d'Afrique Sub-saharienne**. La caractérisation de souches atypiques est pour nous très importante. Leur plus grande fréquence dans ces régions et les flux migratoires augmentent le risque de leur apparition en France. Ce réseau nous permettra d'anticiper et comprendre les phénomènes d'émergence des nouvelles souches.

1.4. L'EQUIPE ET ORGANISATION DU CNR

1.4.1. Fiche d'identité du CNR

Coordonnées du CNR

CNR des virus entériques (entérovirus exclus), laboratoire de Virologie, Pôle de Biologie
CHU de Dijon, BP 37013, 2, rue Angélique Ducoudray,
21070 Dijon Cedex, France

Nom et coordonnées du responsable scientifique

Pr Pierre POTHIER

CNR des virus entériques (entérovirus exclus), laboratoire de Virologie, Pôle de Biologie
CHU de Dijon, BP 37013, 2, rue Angélique Ducoudray, 21070 Dijon Cedex, France

Téléphone : +33 (0)3 80 29 34 29 ou +33 (0)3 80 29 54 87

Téléphone secrétariat : +33 (0)3 80 29 34 37 ou +33 (0)3 80 29 35 23

Fax : +33 (0)3 80 29 32 80

E-mail : pierre.pothier@u-bourgogne.fr

Nom et coordonnées du responsable administratif

Monsieur Pierre-Charles PONS, Directeur Général

CHU de Dijon, BP 77908, 1, Boulevard Jeanne d'Arc, 21079 Dijon Cedex, France

Téléphone : +33 (0)3 80 29 35 75 ; Fax : +33 (0)3 80 29 34 21

E-mail : pierre-charles.pons@chu-dijon.fr

1.4.2. L'équipe

Responsable du CNR des virus entériques :

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

Biologistes (3,1 ETP) :

Personnel permanent : (total 3,1 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 : 0,25 ETP

AMBERT-BALAY Katia : PhD, Biologiste contractuel. Biologie moléculaire, Microscopie électronique. Calicivirus et autres virus entériques. Responsable du suivi des épidémies, des relations avec l'InVS, de la banque de données européenne. Responsable de projet.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 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 : 0,5 ETP.

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

Temps consacré à l'activité CNR : 0,25 ETP.

AUVRAY Christelle : Pharmacien biologiste, Praticien Hospitalo-Universitaire. Responsable Assurance Qualité.

Temps consacré à l'activité CNR : 0,10 ETP.

Techniciens (4,8 ETP) :

Personnel permanent : total 1,8 ETP

KAPLON Jérôme : Virologie médicale, biologie moléculaire.

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

ESTIENNEY Marie : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Personnel temporaire : 3 ETP

BIDALOT Maxime : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

FREMY Céline : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

THERY Lucie : Virologie médicale, biologie moléculaire.

Temps consacré à l'activité CNR : 1 ETP.

Secrétariat, agent technique (1 ETP)

PLESSE Delphine : Secrétariat, gestion administrative.

1.4.3. Organisation du CNR

Le CNR des virus entériques constitue l'**UF 1861**, intégrée dans le **laboratoire de virologie (UF 6114) et le pôle de biologie** pour ses aspects techniques. Elle bénéficie de toutes les infrastructures communes du pôle de biologie à l'exception de la partie pré-analytique. La réception des prélèvements et leur enregistrement sont spécifiques.

L'ensemble des activités du CNR des virus entériques se réalisera sur un **seul site**.

Le responsable du CNR (Pothier Pierre), les biologistes praticiens hospitaliers ou attachés hospitaliers (AGNELLO Davide, AUVRAY Christelle et DE ROUGEMONT Alexis)

sont gérés par l'**UF 6114**. Les ingénieurs biologistes (AMBERT-BALAY et Katia, BELLIO Gaël), les techniciens (KAPLON Jérôme, ESTIENNEY Marie, BIDALOT Maxime, FREMY Céline THERY Lucie) et la secrétaire (PLESSE Delphine) sont gérés par l'**UF 1861**.

La **responsable qualité** du laboratoire de virologie (Dr Christelle AUVRAY) est également responsable pour les activités du CNR, elle est assistée d'un technicien du CNR (Jérôme KAPLON) qui sera son correspondant.

Toutes les **procédures d'hygiène** applicable au CNR sont celles de l'établissement et sont donc commune à celles du laboratoire de virologie.

Le **secrétariat** et la gestion administrative du « quotidien » est propre au CNR et nécessite une personne temps plein.

Les gestions administrative et financière du CNR sont assurées par le pôle de recherche du CHU de Dijon. Le correspondant administratif et financier est Madame Alexandra HOAR.

La gestion administrative du personnel affecté spécifiquement au CNR (2 ingénieurs et 5 techniciens) est assurée par le pôle de recherche (Monsieur Antoine LEZE, cadre supérieur du pôle recherche). La gestion de proximité est assurée par le cadre du laboratoire de virologie ou le responsable du CNR pour ce qui concerne les ingénieurs.

Tous les salaires des personnels du CNR (UF 1861) sont payés par le CHU de Dijon.

1.4.4. Organigramme du CNR et du laboratoire de virologie

Assurance Qualité C. AUVREY (RAQ) O. CARITEY (technicienne UF 6114) J. KAPLON (technicien UF 1861)		Laboratoire de Virologie UF 6114 CNR des virus entériques UF 1861 P. POTHIER : Chef de service Florence MARECHAL : Cadre de santé		Référent hygiène : C. LOBREAU (technicienne UF 6114)	
Direction Recherche Clinique et Innovation			Laboratoire de virologie / Pôle de biologie		
CNR des virus entériques	Welience Unité de transfert	Isolements Sérologies	Biologie Moléculaire	Cytométrie en flux	
P. POTHIER (PU-PH) A de ROUGEMONT (PHU) D. AGNELLO (PA) K. AMBERT-BALAY G. BELLIO Ingénieurs de recherche	P. POTHIER (PU-PH) P DAVAL Ingénieur	JB. BOUR C. AUVREY (PH)	P. POTHIER (PU-PH) C. AUVREY JB. BOUR (PH) A de ROUGEMONT (PHU) C. MANOHA Ingénieur de recherche	P. POTHIER (PU-PH) A de ROUGEMONT (PHU) D. AGNELLO (PA)	
J. KAPLON M. ESTIENNEY M. BIDALOT L. THERY C. FREMY		MC. LAVIGNE P. SIMON A. LOBREAU C. LEMAIRE O. CARITEY M. DARNIOT V. CARMAZANA		B. GRAMMICO C. JEAN-PIERRE V. LAURENT C. PITOISET H. GIRAUDON M. VILLAUME	
Secrétaire : D. PLESSET		Secrétariat commun microbiologie			

1.5. DEMARCHE QUALITE DU CNR

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 qualité des analyses de biologie 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 un **système documentaire spécifique**.

1.5.1. Contrôle de qualité interne

Cette activité d'expertise est aussi soumise à des **contrôles de qualité internes systématiques** afin de garantir les résultats rendus par le CNR des virus entériques.

Contrôle de qualité de l'extraction des acides nucléiques (ARN) et témoin d'inhibition des RT-PCR conventionnelles : L'ajout d'un ARN synthétique dans l'échantillon clinique permet de contrôler la qualité de l'extraction automatisée sur plateforme NucliSENS EasyMAG (BioMérieux) et de vérifier l'absence d'inhibiteurs des RT-PCR conventionnelles. Ce dispositif mis en place au CNR des virus entériques vise ainsi à identifier les résultats d'analyses faussement négatifs. Le même dispositif est mis en place pour le contrôle qualité des techniques de RT-PCR en temps réel.

1.5.2. Contrôle de qualité externe européen

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. Trois types de contrôles de qualité externe ont ainsi été mis en place : l'un concerne la **détection et la caractérisation des calicivirus humains** et est géré par le RIVM aux Pays Bas ; un autre concerne la **détection et la caractérisation des rotavirus** et est géré par le Laboratoire spécialisé du Public Health Agency en Grande Bretagne ; un troisième concerne le contrôle qualité des entérovirus.

1.5.3. Centre de Ressources Biologiques

Nous avons également accès au Centre de Ressources Biologiques des CHU de Dijon-Besançon (Centre Ferdinand Cabanne) qui a été accrédité en 2009.

1.5.4. Accréditation

Enfin, toujours dans son approche de qualité, le CNR des virus entériques lui-même s'est engagé vers l'**accréditation partielle en novembre 2013** selon la **norme ISO 15189**, au même titre que le laboratoire de virologie et l'ensemble du pôle de biologie du CHU de Dijon, pour aboutir avant 2016 à l'accréditation totale.

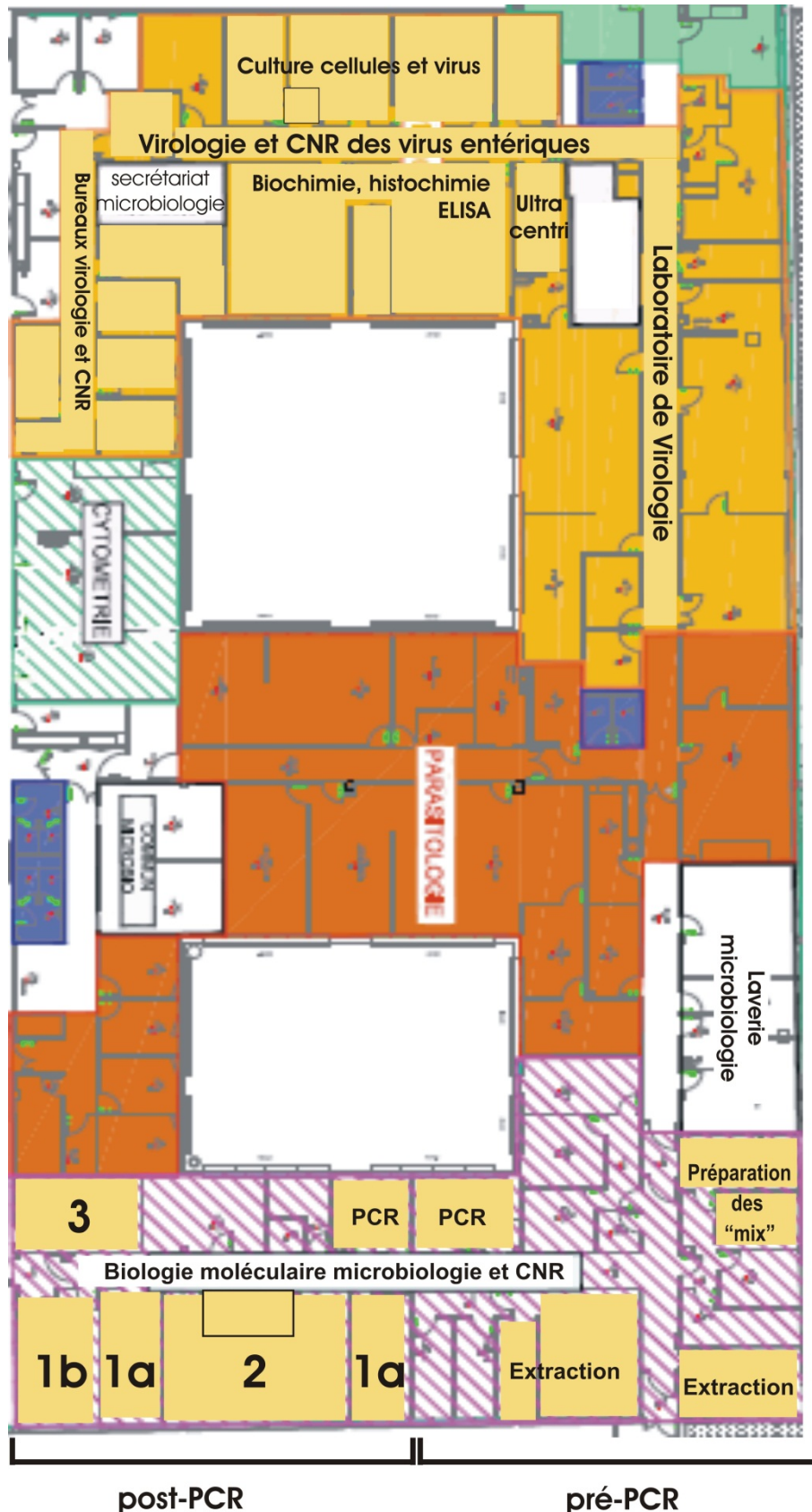


Figure 1 : Plan du laboratoire de virologie et place des activités liées au CNR des virus entériques. Dans la zone biologie moléculaire microbiologie, le CNR dispose de pièces communes avec les autres activités de virologie, il s'agit des pièces de préparation des « mix », d'extraction et celles des 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 du laboratoire.

1.6. DESCRIPTION DES LOCAUX ET EQUIPEMENTS

1.6.1. Les locaux

Le laboratoire de virologie et le CNR des virus entériques ont intégré de nouveaux locaux en mai 2008 (figure 1). Ces nouveaux locaux sont situés au 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 et les salles de réunion se situent au rez-de-chaussée.

Les surfaces dédiées au laboratoire de virologie sont représentées en ocre clair sur le plan de la figure 1. Ces pièces sont **en pression négative** 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 aux services de microbiologie dont l'activité CNR :
 - Pièces Pré PCR : préparation des mélanges réactionnels (« mix »), 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 et laverie commune.

1.6.2. Les équipements

- Tout l'équipement nécessaire pour la biologie moléculaire : thermocycleurs classiques et temps réel, électrophorèse, lecteurs de gel, salles pré et post PCR. Extracteur automatique d'acides nucléiques (BioMérieux et Beckman-Coulter).
- Equipement pour le clonage (inoculation, centrifugeuses basse et moyenne vitesse..).
- Ultracentrifugeuses.
- Appareils d'immuno-analyse (ELISA). Immunofluorescence, appareil pour ELISPOT ; Cytomètre en Flux Canto II BD
- Salle propre en surpression de type L2. Tout l'équipement pour la culture de cellules et l'isolement de virus: Hotte à flux laminaire, étuves, incubateurs à CO₂. Laboratoire de type L3 et son équipement.
- Services communs dans le plateau technique de Biologie ou sur le campus « CHU-Université-INRA » :
 - Séquenceurs (Plateau Technique de Biologie).
 - Animalerie (Campus).
 - Accès au service de Microscopie Electronique (Campus)
 - Accès au Centre de Ressources Biologiques du CHU de Dijon (Centre Ferdinand Cabanne, Plateau Technique de Biologie).

2. ACTIVITES D'EXPERTISE

2.1. CAPACITES TECHNIQUES DU CNR

2.1.1. 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, entérovirus, bocavirus, virus de l'hépatite A, CMV, Torovirus et Coronavirus. Ces techniques reposent sur l'amplification par RT-PCR ou PCR suivie d'un « séquençage » des portions génomiques amplifiées. Les analyses phylogénétiques sont réalisées à l'aide de logiciels tels que « Code Aligner » et « Bionumerics » avec une base de données continuellement mise à jour et constituée de toutes les souches caractérisées dans le cadre du réseau européen ainsi que la GenBank, base de données internationale.

- Nous utilisons des techniques de **PCR en temps réel** pour les **norovirus murin**, les **norovirus humains** GI et GII et pour les **rotavirus**. Ces techniques sont également utilisées pour apprécier la diminution de la « charge virale génomique » après traitement *in vitro* pour l'évaluation de l'efficacité virucide d'un traitement technologique des aliments ou *in vivo* chez la souris pour des essais de protection par immunisation ou autre traitement. Ces techniques de PCR temps réel sont également utilisées pour détecter et **quantifier le virus excrété** dans les selles de patients transplantés afin d'adapter les traitements anti-suppresseurs.
- Ces techniques sont aussi utilisées pour détecter d'autres virus entériques, notamment les **adénovirus**.
- 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 ou l'évaluation de l'efficacité virucide d'un traitement technologique des aliments.
- 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 virus Aichi** 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, **Cytométrie en flux**, **ELISPOT**) pour la détection des antigènes viraux 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.

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

2.1.2.1. Description des collections

La collection des souches a commencé dès la création du CNR en 2002. Depuis 2007 nous y avons ajouté la production de pseudo particules virales (VLPs) et d'anticorps monoclonaux.

Collection de souches ou prélèvements.

- Notre collection de **virus capable de se multiplier en culture** comprend :
 - Rotavirus bovin (souche RF); simien (souche SA11).
 - Virus Aichi A.

Astrovirus type 4 et type 8.

- Notre **collection de souches** parfaitement caractérisées est importante en quantité et en diversité. Elle comprend la plupart des génotypes connus de **rotavirus**, **norovirus** (plus de 1000 souches de chaque) et la plus importante collection de souches de **virus Aichi**. Nous fournissons plusieurs laboratoires en Europe et dans le reste du monde en réactifs de référence.
 - Elle comprend également plusieurs souches d'**astrovirus**, de **sapovirus** et d'**adénovirus** avec une diversité de sérotypes ou de génotypes.
 - Par ailleurs, nous disposons d'une collection de virus isolés à partir de selles bovines. Il s'agit de **rotavirus et norovirus bovins** de différents génotypes particulièrement utiles pour prouver l'origine bovine de certains virus isolés chez l'homme par comparaisons génétique.
- Au total, notre collection comprend la plupart des génotypes de norovirus et de rotavirus détectés chez l'homme et une grande variété de souches de sapovirus, d'astrovirus et de virus Aichi. Cette collection nous permet, entre autres, **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). Nous utilisons en retour cette banque pour la vérification et la comparaison des séquences génomiques des virus caractérisés dans notre laboratoire.

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

- La plupart des virus responsables de gastroentérites ne se multiplient 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)**. Aujourd'hui, nous disposons de 11 VLPs correspondant à des souches caractéristiques des principaux norovirus humains :

- VLPs disponibles :

- ✓ norovirus de génogroupe I : GI.1, GI.2 et GI.3 ;
- ✓ norovirus de génogroupe II : GII.3, GII.4, GII.6 et GII.12.

Pour le génotype GII nous disposons des VLPs correspondantes aux variants Bristol, US95/96, Hunter₂₀₀₄, 2006a, 2006b, Le Caire et 2008.

Les VLP GI.1 et GII.4 (Bristol) ont été conçues par le NIH-USA qui nous a confié ces VLP pour des travaux académiques.

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 de pseudo-particules précédemment citées. Nous disposons d'anticorps monoclonaux obtenus à partir des génogroupes I et II (GI et GII). Ces anticorps seront utilisés d'une part pour l'étude de l'évolutivité des souches de génogroupe II et de génotype 4 (GII.4) et d'autre part pour le **développement d'un réactif pour immuno-diagnostic** (immuno-chromatographie ou autre méthode immuno-enzymatique).

2.1.2.2. Conditions de stockage

- Nos prélèvements sont répartis en aliquotes : cryotubes de 1,8ml.
- Conservés à -40°C ou -80°C
- Les plasmides norovirus sont conservés à -20°C dans de l'eau pure Milli-Q (Millipore®).
- Ils sont « anonymisé » et identifiés par numéro unique. Ils sont classés et répertoriés en fonction du ou des virus présents.

2.1.2.3. Conditions de mise à disposition des souches

- Nos prélèvements et nos souches caractérisées sont disponibles gratuitement à tous les laboratoires publics ou privés qui en font la demande.
- Ainsi, durant les années 2006 à 2010 nous avons transmis :
 - des souches parfaitement caractérisées à plusieurs laboratoires en France et à l'étranger.
 - des VLP ou des plasmides en baculovirus (sous réserve d'un contrat de transfert pour utilisation à but non lucratif) à plusieurs laboratoires de recherche en France et en Suède.
 - La mise à disposition de prélèvements ou de matériel viral ou recombinant (VLPs et plasmides) à des sociétés privées est possible dans le cadre d'un contrat entre les établissements.

2.2. ACTIVITES D'EXPERTISE DU CNR (ANNEE 2011)

2.2.1. Evaluation des trousse de diagnostic de norovirus

- Nous avons complété l'évaluation des trousse R Biopharm et évalué trois nouveaux réactifs disponibles, ImmunoCardSTAT de la société Médián (réactif Denka), Norotop de la société All Diag et SD BioLine norovirus de la société Alere.

SENSIBILITE

	RidaQuick Norovirus RBiopharm		immunoCard STAT Norovirus Meridian Bioscience		Norotop All Diag		SD BioLine Norovirus Alere	
		nb pos / nb testés		nb pos / nb testés		nb pos / nb testés		nb pos / nb testés
Génogroupe I	17%	10/58	26%	13/48	52%	32/61	23%	19/80
Génogroupe II	64%	103/160	39%	49/128	50%	44/87	54%	59/108
GII.4	78%	60/77	59%	32/54	61%	17/28	67%	22/33

Tableau 1 : Comparaison de la **sensibilité** de 3 trousse de détection des norovirus par immunochromatographie sur un ensemble de génotypes représentatifs. La **spécificité** des ces 3 trousse est équivalente, proche de 100%.

Les résultats de la sensibilité de ces réactifs sont présentés dans le tableau 1. La **sensibilité est très faible pour les norovirus du génogroupe I**, à l'exception du réactif Norotop All Diag (52%). Pour la détection des norovirus du génogroupe II, elle s'étale entre 39% et 64%. La **sensibilité varie de 59 à 78% pour le génotype GII.4**. Sachant que cette souche est prédominante dans les épidémies hivernales touchant les établissements hébergeant des personnes âgées, on peut considérer ces tests utiles pour un premier diagnostic rapide dans ce contexte, sous réserve qu'il n'y ait pas de dérive antigénique de ces souches les rendant non détectables par ces tests.

2.2.2. Evaluation des procédés virucides.

○ **2009 – 2011** : Nous utilisons le norovirus murin pour évaluer **l'efficacité virucide des traitements technologiques utilisés dans l'industrie agro-alimentaire** en mesurant le pouvoir infectieux du virus (par titrage) et dénombrant les génomes viraux par PCR en temps réel. La maîtrise de ce savoir-faire nous permet de collaborer avec différents laboratoires dans le cadre de contrats ANR (ADHERESIST et SPICECLEAN).

→ Ainsi, en utilisant le **norovirus murin** comme virus test, nous avons montré que :

- les techniques utilisant les **hautes pressions n'étaient pas efficaces** ;
- au contraire, **celles utilisant la lumière pulsée étaient efficaces**.

2.2.3. Investigations virologiques de cas sporadiques.

2.2.3.1. Entérocolites ulcéro-nécrosantes

Nous avons exploré 2 épidémies d'entérocolites ulcéro-nécrosantes en 2011 (13 épidémies et 73 nouveau-nés depuis 2006), l'une de 3 cas et l'autre de 8 cas. Les recherches de virus entériques ont été négatives pour toutes les selles analysées

2.2.3.2. Surveillance de patients immunodéprimés

- En collaboration avec les services de **transplantations de l'hôpital Necker (AP-HP)**, nous avons montré **l'importance du norovirus dans les diarrhées chroniques survenant chez l'immunodéprimé**. Ce travail a été présenté dans les congrès spécialisés en transplantation afin de sensibiliser cette discipline et publié dans la revue « *Transplantation* ». En parallèle nous avons largement ouvert les facilités de notre laboratoire aux services traitant ces immunodéprimés et aidé les laboratoires de virologie de CHU correspondants à mettre en place localement les méthodes moléculaires de détection (article joint en annexe).

Nous avons suivi **83 patients transplantés** de l'hôpital Necker présentant une diarrhée chronique (soit 118 prélèvements analysés). Pour 46 patients la recherche virale était négative.

Pour **32 patients, un norovirus** a été détecté (représentant un total de 72 prélèvements).

- **Sur la période de janvier 2011 à mars 2012** nous avons reçu **164 selles représentant le suivi de 128 patients** (50 en 2010) provenant de différents hôpitaux. **Pour 42 nous retrouvions au moins une selle positive (32,8%) et pour 35 patients nous retrouvions un norovirus dans au moins une selle (27,3%).**

La responsabilité des norovirus dans les diarrhées chroniques chez les transplantés et plus généralement les immunodéprimés est maintenant reconnue par les cliniciens. Notre CNR est ouvert aux laboratoires des CHU suivant des immunodéprimés pour faciliter l'implantation des techniques de biologie moléculaire et disponible pour les caractérisations moléculaires plus poussées (par exemple caractérisation des variants). Nous envisageons également des travaux, notamment épidémiologiques, afin de mieux comprendre ces infections.

- **Au total depuis janvier 2008** nous avons reçu **316 prélèvements** provenant de 23 hôpitaux suivant des transplantés. Cela représente **le suivi de 236 patients** pour lesquels on a reçu au moins 1 selle. Quatre-vingt-cinq patients (**36%**) avaient au moins une selle positive pour un des virus entériques recherchés. Il s'agissait du **norovirus pour 66 de ces patients soit 25,4% des patients**.

- Le variant norovirus principalement retrouvé était GII.4-2006b ou GII.4-2010 selon la date de recueil des selles, c'est-à-dire celui circulant dans la population non immunodéprimée. Par contre nous **n'avons pas observé d'incidence saisonnière**.

2.2.4. Investigations virologiques des épidémies.

Epidémies année = nombre	Virus	Noro	Sapo	Rota A	Adéno	Astro	Aichi	Entéro	Agent inconnu
2007 = 75	Monoinfections : 59	54	0	5	0	0	0	0	11
	Infections mixtes : 5	5	0	1	0	1	3	2	
2008 = 155	Monoinfections : 116	107	1	4	0	2	0	2	26
	Infections mixtes : 13	12	6	5	0	0	2	1	
2009 = 184	Monoinfections : 139	126	1	10	0	1	1	0	30
	Infections mixtes: 15	15	15	4	0	3	3	1	
2010 = 276	Monoinfections : 214	202	2	6	1	2	1	0	39
	Infections mixtes: 23	21	1	5	1	1	5	3	
2011 = 272	Monoinfections : 203	188	6	9	0	0	0	0	47
	Infections mixtes: 22	44	1	2	1	1	1	3	

Tableau 2 : Epidémies investiguées et virus recherchés et caractérisés.

Année 2011 : Epidémies positives : Prélèvements reçus : **moyenne : 3,9 selles/épidémie** +/- 2,6 ; médiane : 3 selles/épidémie ; Prélèvements positifs : moyenne : 3 / épidémie +/- 2 et médiane 3 selles/épidémie. → **pour environ 4 selles reçues 3 étaient retrouvées positives**.

Epidémies négatives : Prélèvements reçus : **moyenne : 2,7/épidémie** +/- 2,2 et médiane : 2/épidémie.

o **Dans la quasi-totalité des épidémies, l'alerte a été effectuée par l'InVS, les CIRE ou les délégations territoriales des ARS concernées**. Les prélèvements ont été transmis par des laboratoires publics ou privés, ou directement par l'établissement touché par l'épidémie. 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).

○ **En 2011**, nous avons expertisé **272 épidémies dont 225 étaient positives** pour un virus entérique **soit 82,7%** (pour 92,88% un norovirus était retrouvé dans les prélèvements de selles seul ou associé à un autre virus). De ces épidémies, 1007 prélèvements ont été analysés dont 676 étaient positifs pour au moins un des virus entériques (67,13%). Pour les épidémies retrouvées positives pour un virus entérique, nous avons reçu en moyenne **4 selles par épidémie et 3 d'entre elles étaient positives pour un de ces virus**. Le nombre de selles reçues était moindre dans les épidémies restées sans étiologie (bien que de façon non significative).

Ces chiffres soulignent la nécessité d'analyser **au moins 4 selles par épidémie** si l'on veut avoir le maximum de chance d'identifier le virus responsable de l'épidémie.

2.2.5. Principales souches virales caractérisées lors de ces épidémies.

- **Norovirus** : 232 souches caractérisées dans 210 épidémies.
 - Génogroupe I (GI) : 19 souches
 - ✓ GI.1 (1); **GI.4 (11)** ; GIb (1); Gib/GI.6 (3); GI non typés (3).
 - Génogroupe II (GII) : 213
 - ✓ GII.2 (2); GII.3 (3); **GII.6 (11)**; GII.7 (5); GII.7/GII.6 (4); GII.13 (2); GII.14 (1) ; GIIB/GII.3 (2) ; GIIB/GII.13 (1) ; GIIE/GII.4 Caire (2) ; **GIIE/GII.4₂₀₁₀ (7)**; **GIIG/GII.1 (7)** ; GII non typés (4).
 - ✓ **GII.4** : 162 souches
GII.4₂₀₁₀ (159) ; GII.4₂₀₀₈ (2) ; GII.4_{2006a} (1)

*Rappel 2006-2010: **Norovirus** : 649 souches caractérisées.*

- ✓ 64 Génogroupe I (GI) :
 - GI.1 (7); GI.2 (10); GI.3 (5); GI.4 (15); GI.5 (5); GI.7 (6); GI.8 (5) ; GI.9 (4) ; GI.10 (2); GI.12 (3); GI.14 (1).
- ✓ 600 Génogroupe II (GII) :
 - GII.1 (1); GII.2 (11); GII.6 (17); GII.7 (3); GII.8 (1); GII.9 (1); GII.11 (1); GII.13 (10); GII.15 (1); GII.16 (1); GIIB/GII.3 (14) et **GIIG/GII.12 (25)**
 - **GII.4** : 495. *Notamment les variants 2004 (11) ; 2006a (69) ; 2006b (227) ; Le Caire (10) ; 2008 (15), 2010 (170 dont 14 identifiés a posteriori)*
- **Rotavirus** (22 souches retrouvées dans 11 épidémies) :
les principaux génotypes : 3 G1P[8] ; 4 G2P[4] ; 2 G3P[8] ; 5 G4P[8] ; 1 G9P[8].
Les combinaisons inhabituelles : 2 G1P[4] ; 1 G4P[4] ; 4 G9P[4] ;
Aucun génotype d'origine animale
- Sapovirus : 13 souches retrouvées dans 7 épidémies), toutes de Génogroupe I.2.
- Aichi virus : 2 souches de Génogroupe B retrouvées dans 1 épidémie liée à la consommation de coquillages.
- Astrovirus : 1 souche de génotype 5.
- Entérovirus : 3 souches correspondant à 3 épidémies dont 2 liées à la consommation de coquillages.
- Adénovirus sérotype 41, 1 souche associée avec 1 norovirus dans une épidémie d'origine alimentaire probable.

Rappel 2006-2010:

- **Rotavirus** : 45 souches dont les principaux génotypes G1P[8] ; G2P[4] ; G3P[8] ; G4P[8] ; G9P[8].
- **Sapovirus** : 12 souches de Génogroupe I.2.
- **Aichi virus** : 18 souches. Génogroupe B : 10 (2009 – 2010) ; génogroupe A : 6 (≤ 2008) ; non caractérisé : 2.
- **Astrovirus** : 13 souches dont génotype 1 (6) ; génotype 4 (2) ; génotype 8 (3) ; génotype non caractérisé (2)
- **Entérovirus** : 13

2.2.6. Conclusions sur les virus entériques caractérisés dans les épidémies.

Activité comparable à 2010 : Le nombre des épidémies traitées est comparable à celui de 2010, il en est même du nombre de selles traitées et de souches caractérisées.

Nette prédominance des norovirus du génotype GII.4 variant 2010. Ce variant a complètement remplacé les variants 2006a et b et 2008.

Les autres génotypes fréquemment retrouvés sont :

- ✓ **GI.4** retrouvé dans 11 épidémies et 6 fois associé à d'autres virus (4 fois avec d'autres norovirus et 2 fois avec norovirus et d'autres virus).
- ✓ **GII.6** retrouvé dans 11 épidémies le plus souvent comme seul pathogène (9 épidémies dont 5 d'origine alimentaire).
- ✓ Le génotype recombinant GIlg/GII.12 qui représentait 10% es souches caractérisées en 2010 n'a pas été retrouvé en 2011. Par contre le recombinant GIlg/GII.1, très proche, a été retrouvé dans 7 épidémies comme le recombinant GIle/GII.4₂₀₁₀ (7 épidémies).

Les norovirus de génotypes GII.4 sont les principaux norovirus circulants avec une **grande capacité évolutive**. Cette année 2011, ils sont toujours prédominants le même variant que l'année précédente.

Pour ce qui concerne les autres génotypes, chaque saison apparaît un ou plusieurs génotypes qui émergent mais qui ne persistent guère plus d'une saison.

Les rotavirus ont été le seul virus retrouvé dans 9 épidémies (sur un total de 11 épidémies). Toutes ces épidémies s'étaient déroulées dans des maisons de retraite avec comme mode de transmission de personne-à-personne (6) ou inconnu (3).

Les sapovirus ont été le seul virus retrouvé dans 6 épidémies (5 en maisons de retraite et 1 dans une école) sur un total de 7.

Les astrovirus, Aichi virus et entérovirus n'ont été retrouvés qu'en association avec des norovirus.

Sur les 8 épidémies où nous caractérisions plusieurs virus entériques, 5 étaient d'origine alimentaire dont 4 liées à la consommation de coquillages.

3. ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3.1. EVOLUTION ET CARACTERISTIQUES DES INFECTIONS A ROTAVIUS

3.1.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

Dès 2001, nous avons commencé une surveillance moléculaire des souches de rotavirus en milieu pédiatrique en prévision de la prochaine disponibilité de vaccins anti-rotavirus. Depuis 2004 et surtout l'hiver 2006 nous avons mis en place un réseau de surveillance épidémiologique et moléculaire des rotavirus comprenant 11 CHU de province et 3 établissements de l'Assistance Publique de Paris (figure 2). S'ajouteront à partir de 2008 le CH de Charleville-Mézières et un groupement de laboratoires privés de la région parisienne (Val de marne) et un autre de la région dijonnaise.

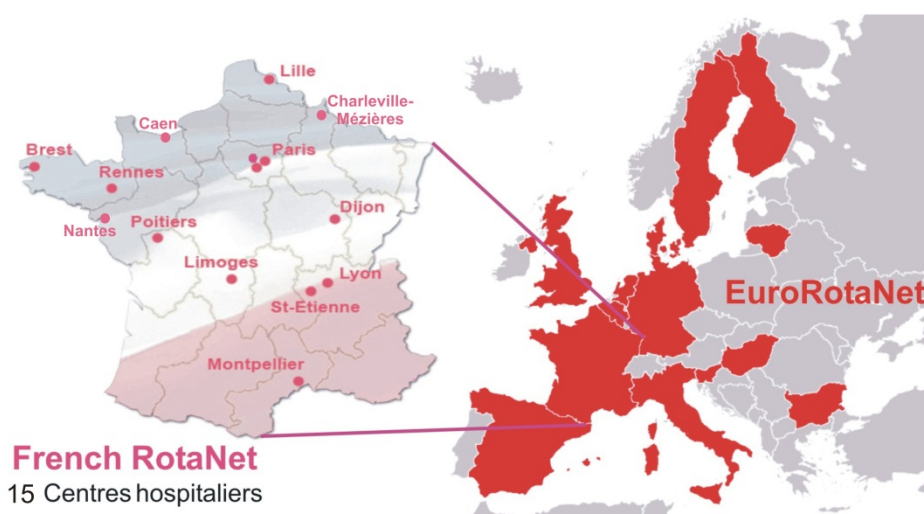


Figure 2 : Répartition des centres participant à l'étude rotavirus en milieu pédiatrique

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

3.1.2. Principaux résultats.

3.1.2.1. Bilan de la surveillance des saisons 2006-2011

Quinze centres ont inclus 2897 enfants (sex ratio= 1,34) et envoyé 2802 prélèvements « rotavirus positifs » au CNR, 2799 souches ont pu être caractérisées (tableau 3). Parallèlement 630 fiches cliniques correspondant à une partie de ces prélèvements ont été recueillies.

Centre	Nbre d'échantillons	Centre	Nbre d'échantillons
Brest	148	Nantes	
Caen	32	Paris Armand-Trousseau	
Charleville-Mézière	23	Paris Robert-Debré	
Dijon	61	Paris St-Vincent-de-Paul	
Lille	146	Poitiers	38
Limoges		Rennes	
Lyon	120	Saint-Etienne	151
Montpellier	54	Total	773

Tableau 3 : Participation des centres durant la saison 2010-2011.

Analyse globale de la répartition des combinaisons génotypiques G/P :

Résultats obtenus en France (figure 3) : Le recueil des prélèvements sur l'ensemble des saisons 2006–2011 représente **3571 souches de rotavirus** (tableau 4) totalement ou partiellement caractérisées. Les cinq principales combinaisons de génotypes G/P ont été durant ces quatre années : **G1P[8] (63,3%)** suivie de **G9P[8] (17,5%)**, cumulant à elles seules **80,8% des souches détectées**, puis **G2P[4] (8,6%)**. Les autres combinaisons classiques, G3P[8] (3%) et G4P[8] (2,7%), représentaient moins de 6%. Ainsi, les 4 combinaisons génotypiques classiques et incluses dans un des vaccins (G1P[8]/G2P[4]/G3P[8] et G4P[8]) représentaient environ 78%. Le « nouveau » génotype **G9P[8] représente le deuxième génotype** en terme de fréquence mais diminue nettement depuis 2009 (en 2009-2010 le génotype G2P[4] était avant G9P[8]).

Les **génotypes ou combinaisons atypiques** représentent **2,4%** et les infections mixtes **2,4%**.

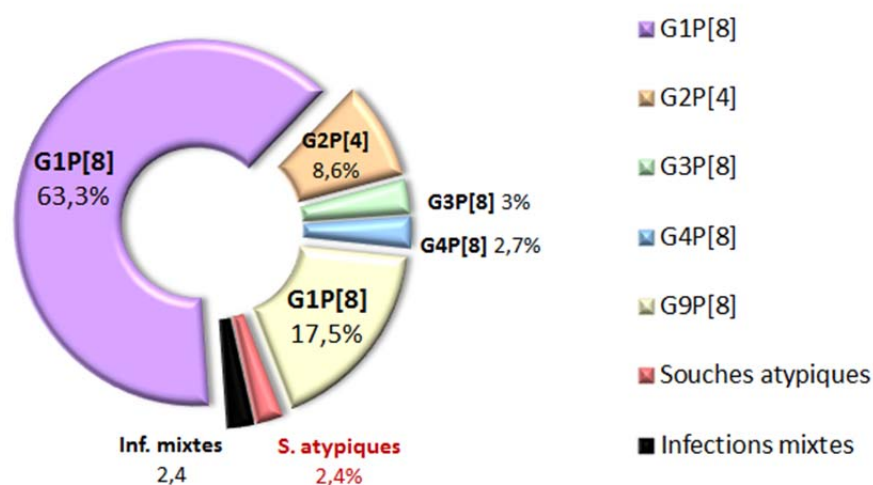


Figure 3 : Distribution des génotypes G (a) et P (b) des rotavirus détectés **en France** durant l'ensemble de la surveillance 2006-2011.

Les résultats obtenus en Europe (figure 4) sont sensiblement différents de ceux observés en France pour 2 combinaisons génotypiques. Le génotype **G9P[8]** est plus fréquent en France que dans l'ensemble des pays européens participant à l'étude, 20,% en France contre 11,9% pour l'ensemble. Au contraire, le génotype **G4P[8]** est moins fréquent en France, 2,1% contre 15,4%.

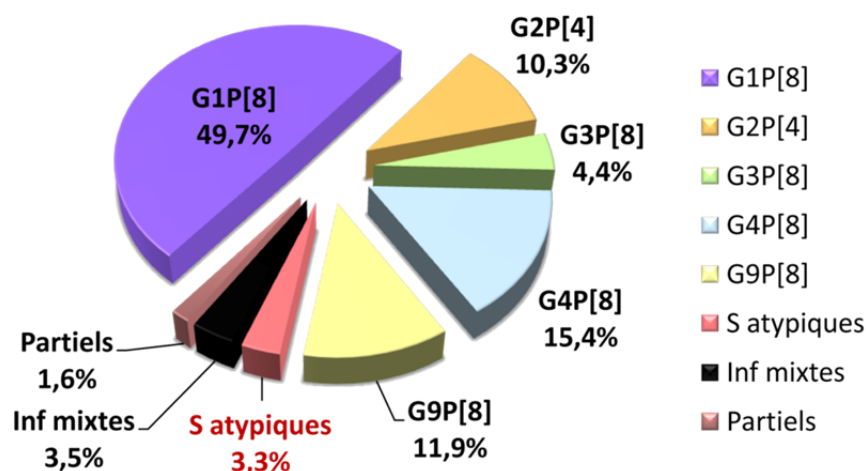


Figure 4 : Distribution des combinaisons génotypiques des rotavirus détectés **en Europe** durant l'ensemble de la surveillance 2006-2009 (Iturriza-Gomara et coll. 2011).

Analyse séparée de la répartition des génotypes G ou P :

L'analyse séparée des **génotypes G** (tableau 4 et figure 5) montre une répartition des souches semblable à celle observée pour les combinaisons G/P. Les génotypes G inhabituels détectés en France ont été les génotypes **G6** (0,2%), **G8** (0,3%) et **G12** (0,4%). Aucun autre génotype G n'a été détecté. **Les souches de génotypes G6 et G8 ont une origine animale probable** (tableau 5)

Les **génotypes P** sont peu diversifiés et très largement dominés par le génotype **P[8]** (88,7%), alors que le génotype **P[4]** représente 9,8%. Ce résultat concernant le génotype P[4] est à considérer dans le suivi des effets de la vaccination (en particulier le vaccin Rotarix®, G1P[8]). Les génotypes atypiques en France étaient représentés par **P[3], P[6], P[9] et P[14]** : 37 souches soit 1% de l'ensemble.

	Nombre de souches détectées (%)										Total (%)	
	2006-2007 <i>n</i> =567 (%)		2007-2008 <i>n</i> =736 (%)		2008-2009 <i>n</i> =644 (%)		2009-2010 <i>n</i> =852 (%)		2010-2011 <i>n</i> =772 (%)		2006-2011 <i>n</i> =3571 (%)	
Génotypes G (incluant les infections mixtes)												
G1	300	(52,9)	492	(67,0)	363	(56,4)	539	(63,3)	585	(75,8)	2279	(63,8)
G2	73	(12,9)	13	(1,8)	33	(5,1)	158	(18,5)	44	(5,7)	321	(9)
G3	18	(3,2)	18	(2,4)	29	(4,5)	35	(4,1)	32	(4,1)	132	(3,7)
G4	5	(0,9)	2	(0,3)	36	(5,6)	20	(2,3)	39	(5,1)	102	(2,9)
G6	0	(0,0)	2	(0,3)	0	(0,0)	3	(0,4)	3	(0,4)	8	(0,2)
G8	4	(0,7)	1	(0,1)	2	(0,3)	2	(0,2)	0	(0,0)	9	(0,3)
G9	143	(25,2)	177	(24,2)	167	(25,9)	81	(9,5)	59	(7,6)	627	(17,6)
G12	2	(0,4)	8	(1,1)	1	(0,2)	1	(0,1)	2	(0,5)	14	(0,4)
G1 + G2	2	(9,1)	2	(8,7)	1	(7,7)	5	(38,5)	0	(0,0)	10	(0,3)
G1 + G3	1	(4,5)	3	(13,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,1)	5	(0,1)
G1 + G4	0	(0,0)	0	(0,0)	2	(15,4)	1	(7,7)	0	(0,0)	3	(0,1)
G1 + G9	14	(63,6)	14	(60,9)	7	(53,8)	5	(38,5)	3	(0,4)	43	(1,2)
G2 + G3	1	(4,5)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,0)
G2 + G4	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(7,7)	0	(0,0)	1	(0,0)
G2 + G9	1	(4,5)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(7,7)	0	(0,0)	2	(0,1)
G3 + G4	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(7,7)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,0)
G3 + G9	2	(9,1)	4	(17,4)	0	(0,0)	0	(0,0)	4	(0,5)	10	(0,3)
G4 + G9	1	(4,5)	0	(0,0)	2	(15,4)	0	(0,0)	0	(0,0)	3	(0,1)
Génotypes P												
P[3]	1	(0,2)	0	(0)	0	(0)	0	(0,0)	0	(0,0)	1	(0,1)
P[4]	73	(12,9)	14	(1,9)	33	(5,1)	181	(21,2)	48	(6,2)	349	(9,8)
P[6]	7	(1,2)	3	(0,4)	3	(0,5)	8	(0,9)	6	(0,8)	27	(0,8)
P[8]	481	(84,8)	713	(96,9)	606	(94,1)	650	(76,3)	717	(92,9)	3167	(88,7)
P[9]	1	(0,2)	1	(0,1)	0	(0,0)	0	(0,0)	0	(0,0)	2	(0,1)
P[14]	0	(0,0)	1	(0,1)	1	(0,2)	3	(0,4)	1	(0,1)	6	(0,2)
P[4]+P[8]	4	(0,7)	4	(0,5)	1	(0,2)	10	(1,2)	0	(0,0)	19	(0,5)

Tableau 4 : Distribution et prévalence par année des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2011

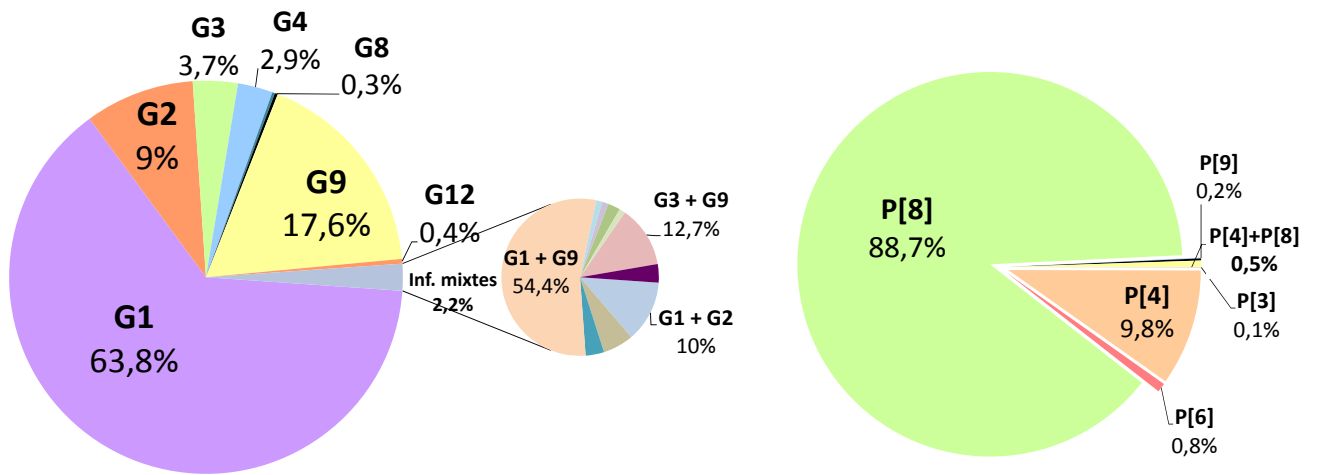


Figure 5 : Distribution séparée des génotypes G et P détectés en France entre 2006 et 2011.

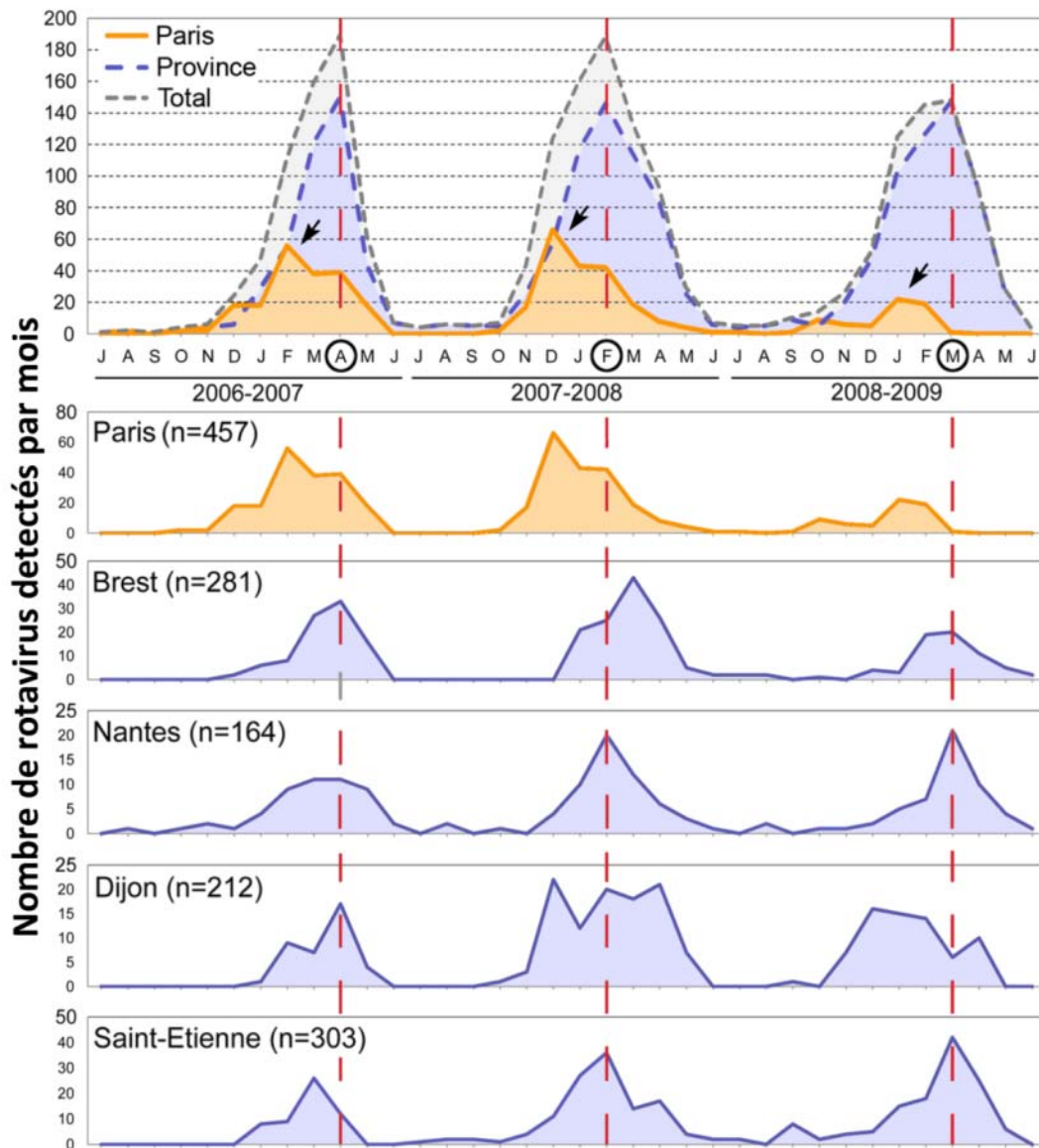


Figure 6 : Distribution temporo-spatiale des rotavirus (juillet 2006 à juin 2009) pour l'ensemble de l'étude et pour 5 centres représentatifs.

3.1.2.2. Variations temporo-spatiales des infections à rotavirus

Sur l'ensemble de la France, le pic des infections à rotavirus apparaissait en février ou mars pour les deux dernières saisons (2007-08 et 2008-09) et plus tardivement, en avril, pour la première saison (2006-07). La précocité ou non des épidémies ne peut être expliquée par la prédominance d'un génotype pour une saison donnée. Les pics épidémiques sont différents selon les centres. Par ailleurs, il semble que **les épidémies à rotavirus apparaissent 1 à 2 mois plus tôt en région parisienne** (figure 6). Ce phénomène pourrait être lié à la densité de la population et aux transports en commun qui constituent une situation plus spécifique à la région parisienne qu'aux autres centres étudiés.

Variations temporelles des génotypes de rotavirus (figure 7 à 9) :

○ **Génotypes G :**

Les variations selon les saisons concernent tous les génotypes majoritaires, mais durant la période de surveillance elles sont plus marquées pour les **génotypes G9 et G2**.

– Le **génotype G1 est le génotype largement majoritaire pour toutes les saisons**, à l'exception de la saison 2004-2005. Ce phénomène a été également observé dans les autres pays européens du réseau de surveillance. Cette prévalence élevée et continue serait due à l'émergence régulière de nouveaux variants antigéniques sous l'effet de la pression immunitaire.

– **Génotype G9** : Nous avons détecté pour la première fois en France le génotype G9 en 1998 mais il est resté rare jusqu'en 2004. Durant l'hiver 2004-2005 ce génotype G9 est devenu brusquement la souche majoritaire et depuis reste, au moins en France, le deuxième génotype en termes de fréquence, après le génotype G1. Il existe une variabilité selon les saisons, devenu brusquement le génotype majoritaire en 2004-2005 avec 67,6% des souches analysées, il s'est stabilisé entre 16,4 et 25,9% de 2005 à 2009.

Le fait marquant des saisons 2009-2010 et 2010-2011 est la décroissance de la prévalence du génotype G9 qui représente moins de 10% des souches isolées (respectivement 9,3% et 7,4%). Cette décroissance est observée dans tous les centres. La décroissance du génotype G9 est intervenue au moins une année plus tard que dans la plupart des autres pays européens (Allemagne, Suède, Espagne notamment). Cette décroissance pourrait être due à une forme de « stérilisation » immunitaire car ces souches G9 ne semblent pas posséder les capacités de glissement antigénique des souches G1P[8].

– **Génotype G2** : La surveillance de ce génotype présente un intérêt particulier car le vaccin monovalent ne contient que les génotypes G1 et P[8]. Il existe une **variabilité cyclique de la prévalence de ce génotype**. Durant les saisons 2006-2007 et 2009-2011 la prévalence de ce génotype était respectivement de 12,9 et 18,5%.

– **Génotypes G3 et G4** : Contrairement aux observations des années 2001 à 2005, ces génotypes n'ont pas représenté un grand nombre de souches pour la période 2006-2011 (respectivement 3,6 et 2,3% de la totalité des souches caractérisées, avec un maximum de 4,5 et 5,6% et en 2008-2009).

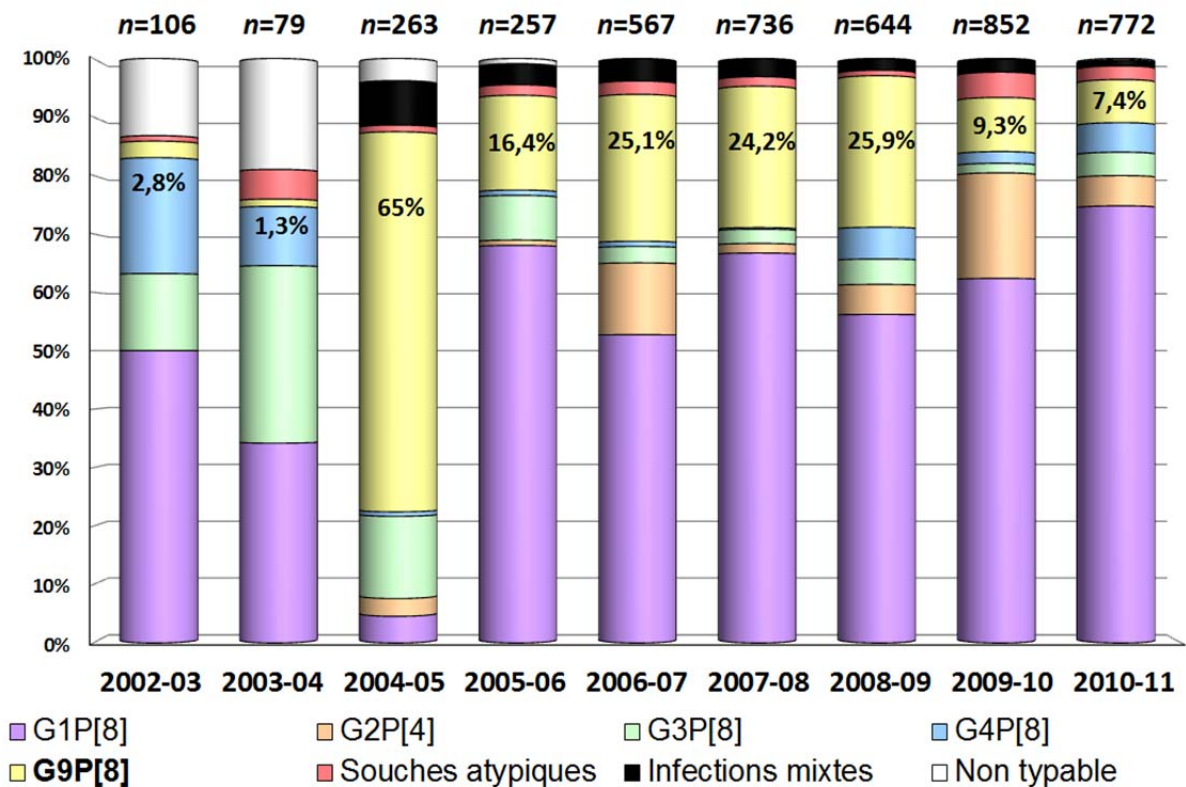


Figure 7 : Evolution des génotypes G de rotavirus en France entre 2001 et 2010.

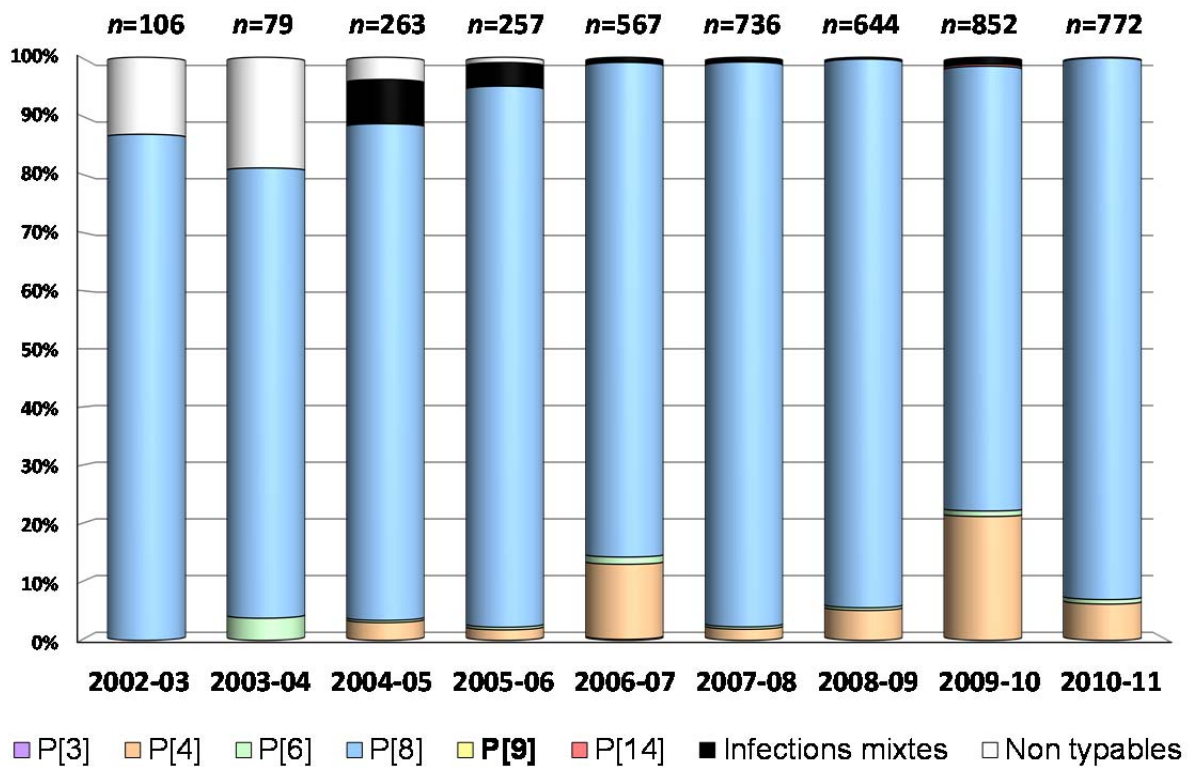


Figure 8 : Répartition des génotypes P de rotavirus en France entre 2001 et 2011. Contrairement aux observations relevées pour les génotypes G qui ne présentent pas de dominance nette et constante d'un génotype particulier, le génotype P[8] est très largement prédominant.

○ **Génotypes P :**

La variabilité constatée pour les génotypes G n'est pas retrouvée pour les génotypes P. Le génotype P[8] est très largement majoritaire tout au long de l'étude et quel que soit le centre d'origine du prélèvement (figure 8). L'augmentation du génotype P[4] durant 2009-2010 est liée à celle du génotype G2.

○ **Souches ou combinaisons inhabituelles** (tableaux 4 et 5, figure 9) :

Il s'agit de génotypes habituellement non détectés ou rares chez l'homme. Il s'agit des génotypes G6, G8, G12, P[3], P[6], P[9] et P[14]. Sur l'ensemble de l'étude elles représentent 2,4% des souches et 2,3% en 2011.

Certaines de ces souches (environ 1%) peuvent être d'origine animale (bovine, porcine, caprine, féline ou canine).

Les génotypes G8 et G12 sont les plus importants et doivent être surveillés car à risque d'émergence. Les génotypes G12 sont bien adaptés à l'homme mais possèdent encore une capacité épidémique interhumaine insuffisante. Les génotypes G8 caractérisés dans notre étude montrent une co-circulation de souches bien adaptées à l'homme et de souches strictement d'origine animale.

La figure 10 montre l'évolution de la fréquence de ces souches entre les saisons 2001 et 2011. En 2011 ces souches représentaient

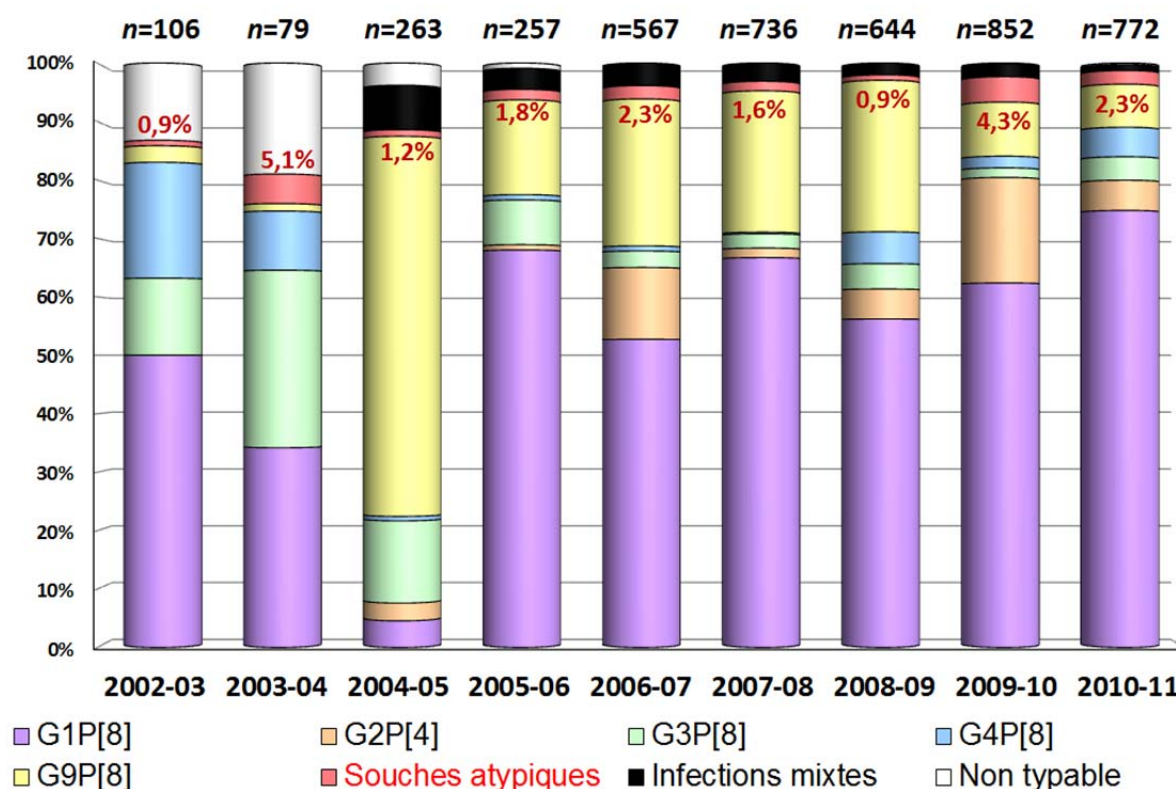


Figure 9 : Evolution des génotypes ou combinaisons génotypiques inhabituels de rotavirus en France entre 2001 et 2011 (en rouge les principaux génotypes et le pourcentage global)

Le tableau 5 indique l'espèce animale d'origine des segments codant les protéines VP7, VP4, VP6 et NSP4. Nos résultats montrent ainsi la possibilité d'infections humaines par des virus réassortants dont certains gènes sont d'origine animale.

N° de souche	VP7 (G)		VP4 (P)		VP6		NSP4		Site	Saison
R1486	G3	Hu/An	P[3]	Ca/Fe/Si	I	An	E3	An	Brest	2006-07
R1320	G3	Hu/An	P[9]	Hu/Fe	I	An	E2	An	Montpellier	2006-07
R3198	G3	Hu/An	P[9]	Hu/Fe	I	An	E3	An	Brest	2008-09
R1737	G6	Bo	P[9]	Hu/Fe	I	An	E2	An	St-Etienne	2007-08
R2775	G6	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	E2	An	Nantes	2007-08
R3449	G6	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Poitiers	2009-10
R3545	G6	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	E2	An	St-Etienne	2009-10
R3548	G6	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	E2	An	St-Etienne	2009-10
R4734	G6	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	E2	An	Montpellier	2010-11
R5197	G6	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Lille	2010-11
R5233	G6	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Lille	2010-11
R1197	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris RD	2006-07
R1259	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris RD	2006-07
R1265	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris RD	2006-07
R1357	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris SVP	2006-07
R1853	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris RD	2007-08
R2631	G8	Bo	P[6]	Hu/Po	I	An	E2	An	Paris SVP	2008-09
R3265	G8	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	E3	An	Nantes	2008-09
R3304	G8	Bo	P[14]	Hu/La/Cap	I	An	nt	-	Charleville	2009-10
R1725	G12	Hu	P[6]	Hu/Po	II	Hu	E1	Hu	St-Etienne	2007-08
R2728	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Nantes	2006-07
R1196	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Paris RD	2006-07
R1945	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Limoges	2007-08
R1778	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Paris SVP	2007-08
R1956	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Limoges	2007-08
R2237	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Paris AT	2007-08
R1949	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Limoges	2007-08
R1955	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Limoges	2007-08
R1939	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Limoges	2007-08
R2836	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Nantes	2008-09
R4380	G12	Hu	P[6]	Hu/Po	II	Hu	E1	Hu	Paris RD	2009-10
R4925	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	St-Etienne	2010-11
R4969	G12	Hu	P[8]	Hu	II	Hu	E1	Hu	Dijon	2010-11

AT : Hôpital Armand-Trousseau, Paris; RB : Hôpital Robert-Debré, Paris; SVP : Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris.

Hu : humain; An: animal; Bo: bovin; Ca: canin; Cap: caprin; Fe: félin; Ov: ovin; Po: porcine

Nt: non typable

Tableau 5 : Risque d'émergence et barrière d'espèce pour les rotavirus de génotypes G6, G8 (origine bovine) et certains G3 (origine canine ou féline).

Variabilité géographique des génotypes de rotavirus :

Il existe également **une variabilité selon les centres** (figure 10) et, pour l'étude européenne, selon les pays (figure 11). Cette variabilité concerne tous les génotypes.

Par exemple pour ce qui concerne le génotype G9, sa prévalence est restée élevée en France jusqu'en 2009 alors que dans la plupart des pays européens elle avait commencé à décroître dès la saison 2007-2008. Prévalence européenne du génotype G9P[8] : 2006-2007 = 20,17%, 2007-2008 = 10,52% ; 2008-2009 = 8,03%.

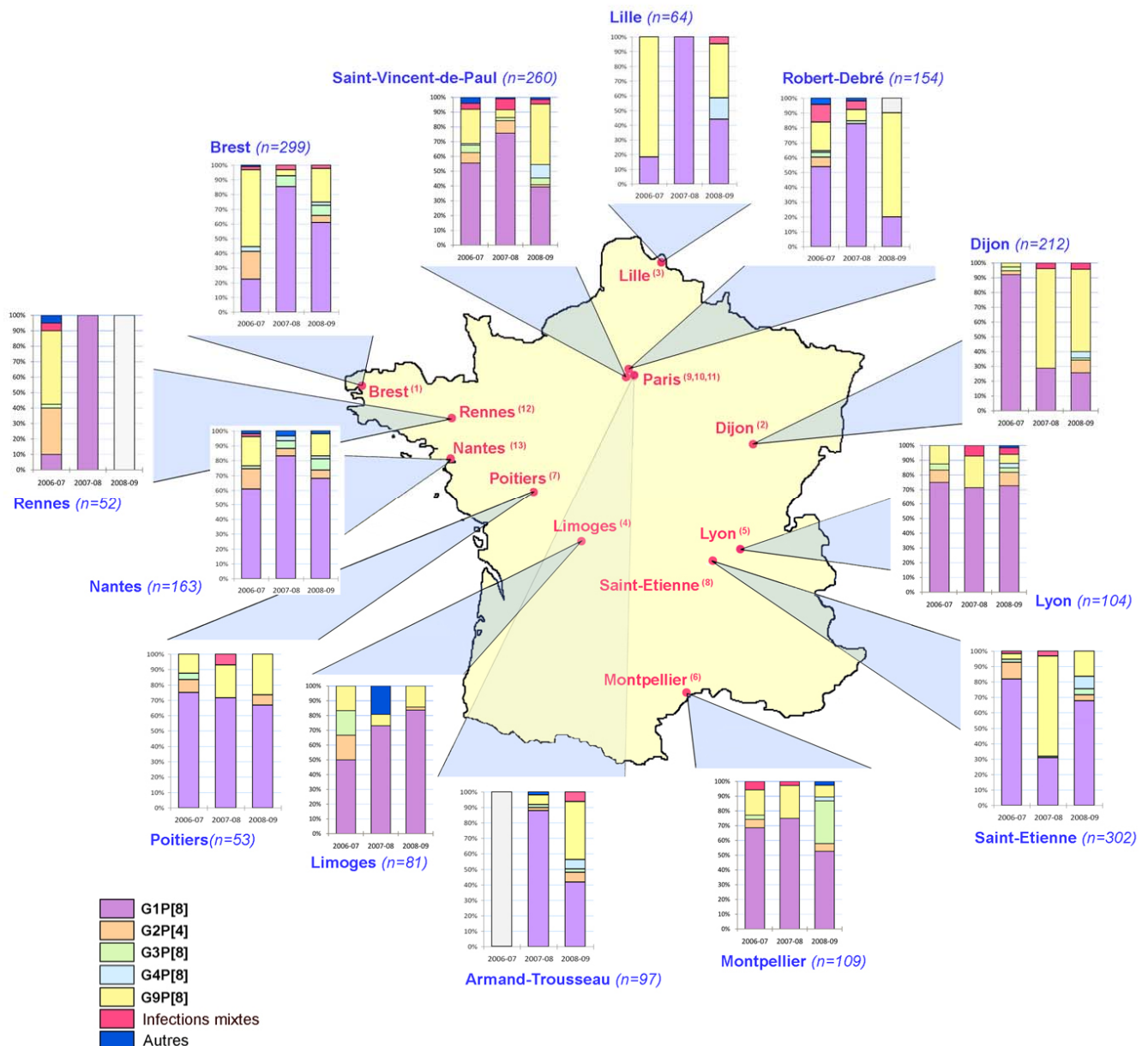


Figure 10. Répartition des combinaisons génotypiques G/P de rotavirus par centre au cours des saisons 2006 à 2009.

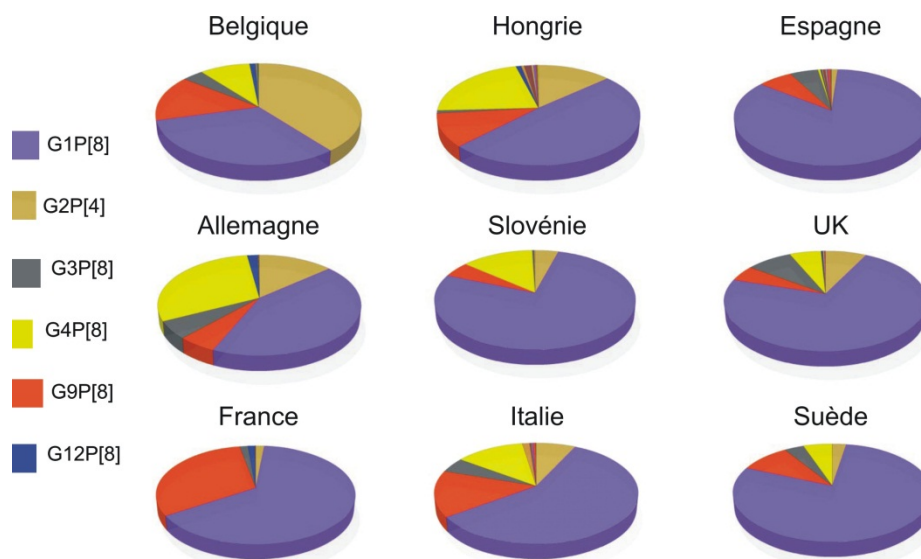


Figure 11 : Comparaison de nos résultats pour la saison 2007-2008 avec ceux d'autres pays du réseau européen du réseau EuroRotaNet.

3.1.2.3. Conclusion

Cette surveillance épidémiologique des souches de rotavirus s'est effectuée en France en dehors de toute pression vaccinale. En effet, la couverture vaccinale n'a jamais dépassé 9% tous vaccins confondus.

Les résultats significatifs sont :

- La **large prédominance du génotype G1** à l'exception de la saison 2004-2005.
- **L'émergence du génotype G9** comme nouveau génotype majeur avec G1, G2, G3 et G4.
- La **variation cyclique des génotypes G2, G3 et G4**. Notre étude a particulièrement mis en évidence celle du génotype G2P[4]. La variation du génotype G2P[4] doit être surveillée compte tenu de l'utilisation d'un vaccin monovalent.
- Associée à cette variabilité selon les saisons, il existe une très **grande variabilité géographique, les génotypes prédominant pouvaient variés d'une région à une autre**.
- La stabilité de la fréquence des souches inhabituelles et l'existence de **souches d'origine animale** infectant les enfants de cette étude.

3.2. SURVEILLANCE MOLECULAIRE DES GASTROENTERITES COMMUNAUTAIRES

L'objectif de cette étude était de d'une part détecter et caractériser les virus responsables de gastro-entérites non-hospitalisées d'autre part conduire, au moins partiellement, cette surveillance en parallèle à celle sur les rotavirus en milieu hospitalier.

Ainsi nous avons sélectionné un premier groupe de 4 laboratoires dijonnais et un second groupe de laboratoire de la banlieue proche de Paris (Val de Marne). L'étude a commencé début novembre 2008 et les résultats présentés couvrent la période de **novembre 2008 à février 2011**. Les virus recherchés étaient les rotavirus, norovirus, sapovirus, astrovirus, adénovirus et les virus Aichi. Les laboratoires nous transféraient toutes les coprocultures positives ou négatives qu'ils recevaient.

3.2.1. Fréquence de détection des virus

Au total, 1311 prélèvements de selles ont été envoyés au CNR ; 1232 échantillons ont été analysés se répartissant ainsi :

- 0-2 ans : 230 selles (17,5%) → 79 positives : (33,9%)
- 2-5 ans : 110 selles (8,4%) → 31 positives : (28,2%)
- 5-65 ans : 633 selles (48,3%) → 47 positives : (7,4%)
- >65 ans : 338 selles (25,8%) → 24 positives : (7,1%)

Au moins 1 virus a été retrouvé dans 181 selles (14,7%) (figure 12) :

- 169 mono-infections : 52 rotavirus, 77 norovirus, 5 sapovirus, 15 astrovirus, 7 virus Aichi, 13 adénovirus.
- 12 infections mixtes : norovirus avec rotavirus (n=4 selles) ou sapovirus (n=2) ou astrovirus (n=2) ou virus Aichi (n=2) ; rotavirus associé à sapovirus (n=2).

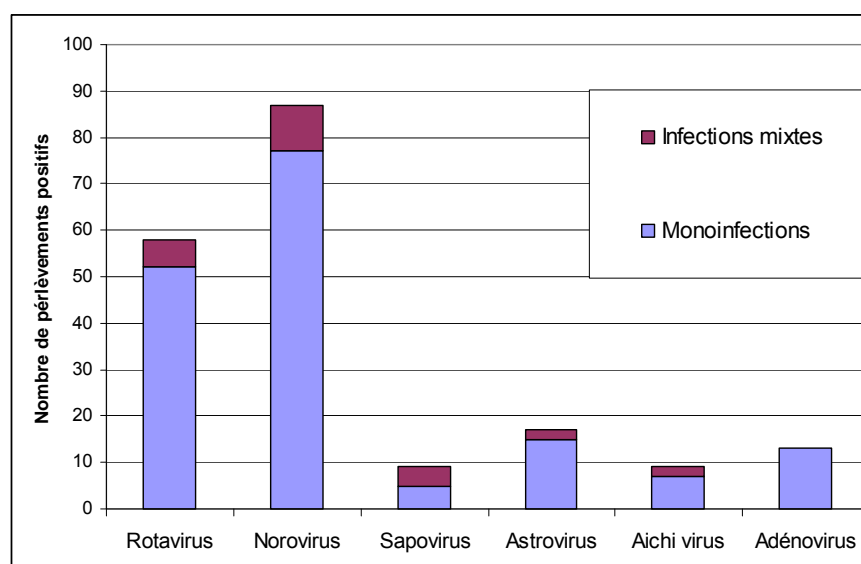


Figure 12 : Fréquence des virus entériques isolés dans les 1232 selles de patients diarrhéiques non hospitalisés (181 étaient positives pour au moins un virus).

3.2.2. Distribution des virus selon les groupes d'âge

Les virus entériques ont été plus fréquemment détectés chez les enfants de moins de 5 ans (figures 13a et 13b):

- 0-2 ans : 33,9% des prélèvements

- 2-5 ans : 28,2%
- 5-65 ans : 7,4%
- > 65 ans : 7,1%

Les infections à rotavirus sont très liées à l'âge. La majorité des rotavirus est retrouvée chez les enfants de moins de 5 ans (figure 15a). Les rotavirus sont la cause de 45,5% des gastro-entérites virales dans cette tranche d'âge (14,7% de l'ensemble des prélèvements de cette tranche d'âge). Les infections à rotavirus sont moins fréquentes chez les enfants plus âgés et les adultes, chez qui elles ne représentent que 12,7% des étiologies virales.

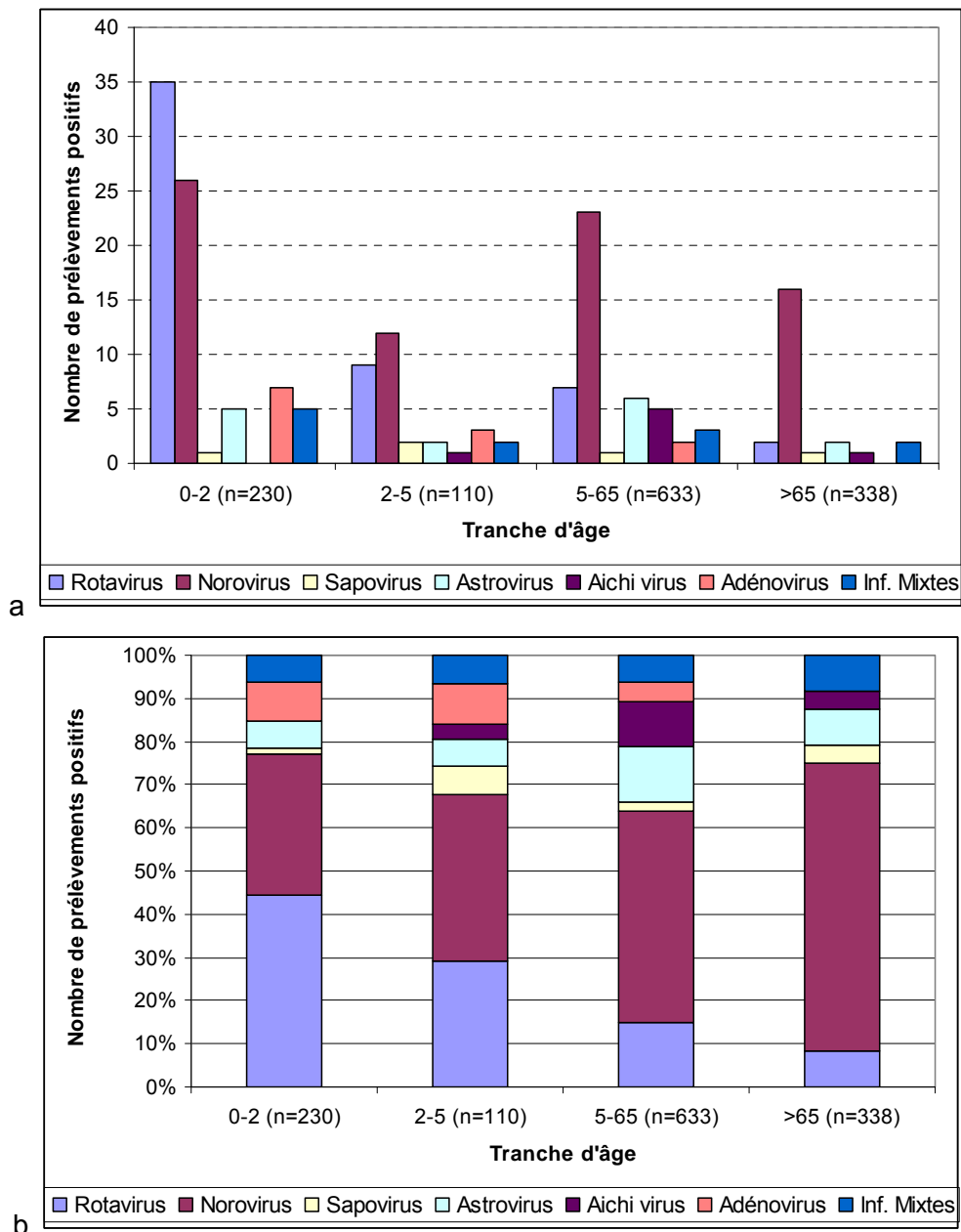


Figure 13 : Distribution des virus entériques en fonction des tranches d'âge

Les infections à norovirus sont détectées dans toutes les tranches d'âge.

- Chez l'enfant de moins de 5 ans les norovirus sont une cause importante de gastroentérite, deuxième cause virale derrière les rotavirus. Les norovirus sont la cause de 39,1% des gastro-entérites virales dans cette tranche d'âge (12,6% de

l'ensemble de prélèvements de cette tranche d'âge). Chez les enfants de moins de 2 ans les norovirus sont la seconde cause derrière les rotavirus. Ils sont la première étiologie de gastro-entérites virales chez les enfants de 2 à 5 ans.

- Les norovirus sont par contre la principale cause des gastroentérites chez les patients de plus de 5 ans, les autres virus étant minoritaires (figure 15a et b).

3.2.3. Distribution des génotypes des rotavirus et norovirus

Rotavirus : Le principal génotype de rotavirus circulant dans la population est G9P[8] (50%) suivi de G1P[8] (36,2%). Cette proportion était différente selon la région étudiée. Dans la région de Dijon la répartition était G9P[8] (59,4%) et G1P[8] (25%) alors que dans la banlieue parisienne G9P[8] et G1P[8] représentaient respectivement 38,5% et 50% des souches. Ces différences correspondent à celles retrouvées parmi les rotavirus des enfants hospitalisés.

Norovirus : Les norovirus de génogroupe II sont largement prédominantes puisque seules 3 souches de génogroupe I ont été trouvées (2 GI.3 et 1 GI.nt). Dans la région de Dijon comme dans la banlieue parisienne, les souches de génogroupe II et génotype 4 ont été le plus fréquemment retrouvées avec toutefois des prévalences différentes : 51,5% en région parisienne et 65,4% en région dijonnaise.

3.2.4. Conclusions

Les 6 virus entériques recherchés représentent 14,7% des étiologies des gastro-entérites chez les patients consultant un médecin généraliste ou un pédiatre de ville. Mais le pourcentage de positivité varie selon l'âge. Entre 28 et 34% des prélèvements sont positifs chez les enfants de moins de 5 ans. Par contre, seulement 7% des selles sont positives pour un virus chez les enfants de plus de 5 ans, les adultes et les personnes âgées.

Les rotavirus et les norovirus sont les plus fréquemment détectés. Chez les enfants de moins de 2 ans les rotavirus prédominent alors que dans les autres tranches d'âge, les norovirus sont les plus fréquents, principalement au-delà de 5 ans. Globalement pour les enfants de moins de 5 ans, les rotavirus représentent 44 échantillons positifs et les norovirus 28. Si dans cette tranche d'âge (0 – 5 ans) les rotavirus restent le virus le plus fréquemment en cause, les **norovirus représentent une étiologie fréquente de gastroentérites communautaires**, beaucoup plus fréquente par rapport à celle observée chez les enfants hospitalisés. Il est probable que l'hospitalisation « filtre » les cas de gastroentérites les plus sévères, donc celles qui seraient dues aux rotavirus.

Parmi les rotavirus, les génotypes G1P[8] et G9P[8] sont les plus fréquents avec des différences selon la région, G9P[8] étant prédominant à Dijon. Ces différences sont par ailleurs similaires à celles observées chez les enfants hospitalisés.

Le typage moléculaire des souches de norovirus a montré une très forte prédominance du génogroupe II. Malgré une très grande diversité au sein de ce génogroupe, le génotype GII.4 prédomine.

3.3. DETECTION ET INVESTIGATION DES CAS GROUPES

3.3.1. Réseau de partenaires et répartition géographique

- o l'**InVS** et les **CIRE**, les **Délégations territoriales des ARS** et d'autre part les **services hospitaliers**, les **CLIN** ou les **services d'hygiène des établissements de soins**.

Les **Délégations territoriales des ARS** ou les **CIRE** notifient les épidémies et déclenchent l'alerte et l'investigation virologique. Plus rarement, l'alerte nous est donnée par un service hospitalier, le **CLIN** ou le service d'hygiène d'un établissement de soins.

Toutes les données nous parvenant sont immédiatement transmises à l'**InVS** pour la coordination des investigations épidémiologiques et virologiques. L'**InVS** et les **CIRE** réalisent les investigations épidémiologiques. **Un point hebdomadaire téléphonique avec l'InVS** est réalisé tous les mardis pour coordonner et suivre au plus près les investigations virologiques et épidémiologiques.

Outre ce point hebdomadaire, nous avons avec les **CIRE**, les **Délégations territoriales des ARS** et les établissements concernés des contacts étroits tout au long du traitement de l'épidémie (rendu rapide des résultats, éventuellement résultats intermédiaires, information sur les virus en cause et les antiseptiques ou désinfectants efficaces).

o Les autres laboratoires de référence

- **IFREMER** - Centre de Nantes (Dr Soizic LE GUYADER) : laboratoire de référence pour les virus entériques dans les **produits de la mer**. Ce laboratoire fait partie du même réseau européen que le nôtre (« EVENT/DIVINE »). Nous collaborons étroitement et en temps réel pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspectée est un produit de la mer (alerte, investigation, comparaison des souches etc...).
- **ANSES – Unité de virologie des Aliments et de l'eau**, Maisons Alfort (Dr Sylvie PERELLE) : laboratoire de référence pour **l'eau et les aliments**. Nous collaborons avec ce laboratoire pour tous les cas groupés de gastroentérites dont l'origine suspectée est alimentaire ou hydrique (alerte, investigation, comparaison des souches...).
- **ANSES - Laboratoire d'Hydrologie de Nancy**, 40, Rue Lionnois F-54000 NANCY (Dr Benoît GASSILLOUD).
- **Centre de Référence pour les Hépatites A et E**. AP.HP - Paris Paul Brousse (Pr Elisabeth DUSSAIX). Nous collaborons étroitement avec ce CNR, notamment pour les épidémies d'origine hydrique ou alimentaire. 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.

3.3.2. Provenance des échantillons

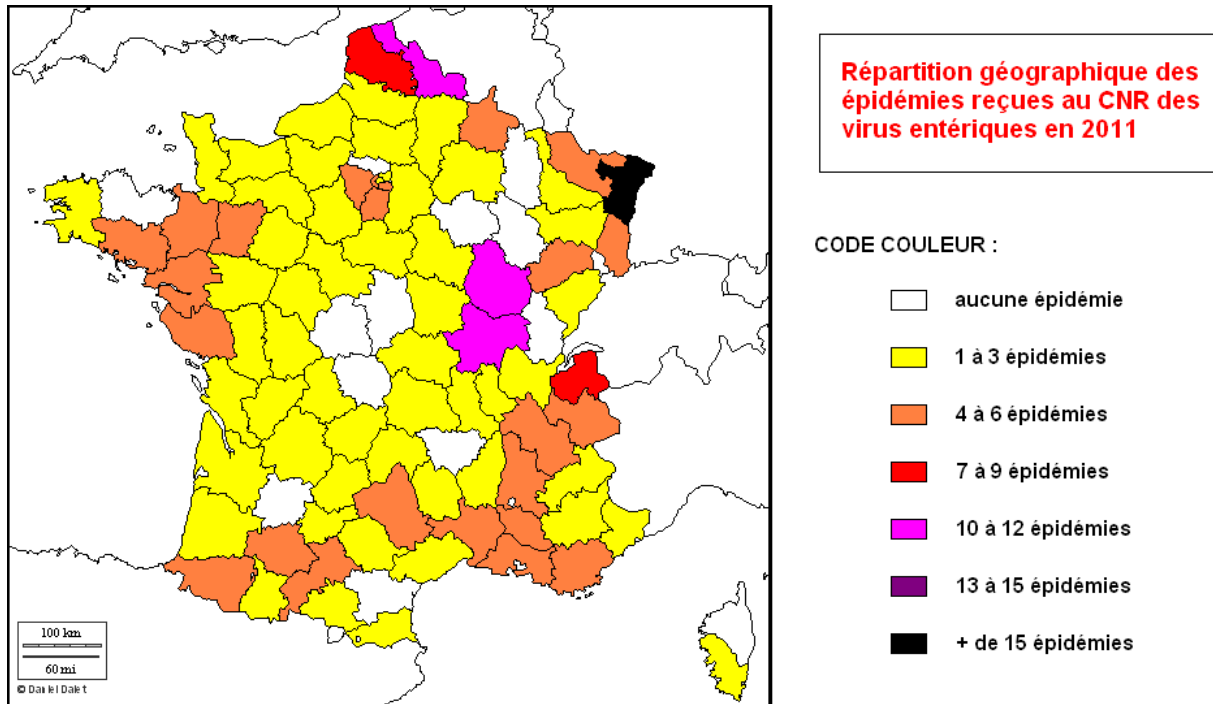


Figure 14 : Répartition géographique des épidémies reçues durant l'année 2011.

3.3.3. Caractéristiques des épidémies (2007-2011)

3.3.3.1. Nature et évolution des épidémies

Les figures 15 et 16 montrent l'évolution du nombre des épidémies de janvier 2007 à mars 2012. Cela représente 1097 épidémies dont 272 en 2011.

Une saisonnalité hivernale très marquée :

Les figures 15 et 16 montrent que la majorité des épidémies surviennent l'hiver, entre **novembre et mars. Plus de 85% des épidémies analysées au CNR sont survenues durant** cette période : 159 pour l'hiver 2008-2009 ; 150 pour l'hiver 2009-2010, 217 pour l'hiver 2010-2011, 196 pour l'hiver 2011-2012. Cette saisonnalité concerne principalement les épidémies survenant en maison de retraite et dans les services hospitaliers. On ne retrouve pas ce caractère saisonnier pour les épidémies survenant lors de réceptions / banquets ou dans les restaurants.

Risque élevé d'épidémie en établissement hébergeant des personnes âgées :

Nous avons suivi de façon prospective et sur trois années (2008 à 2011) 35 unités réparties dans 18 établissements pour personnes âgées (EHPA) de l'inter-région Nord-Est. Les résultats montrent que **15 établissements (83,3%) et 29 unités (82,8%) ont été touchés par au moins une épidémie durant ces trois années.** Ce chiffre global représente 20 unités (57,1%) en 2008-09, 10 (28,6%) en 2009-10 et 19 (54,3%) en 2010-11. Cette variabilité suit la fréquence des épidémies de gastro-entérites durant les hivers 2008 à 2011 enregistrée au CNR. Elle pourrait être liée à l'émergence de nouveaux variants.

Figure 15 : Epidémies de gastroentérites selon le site durant la période 2007 - 2011

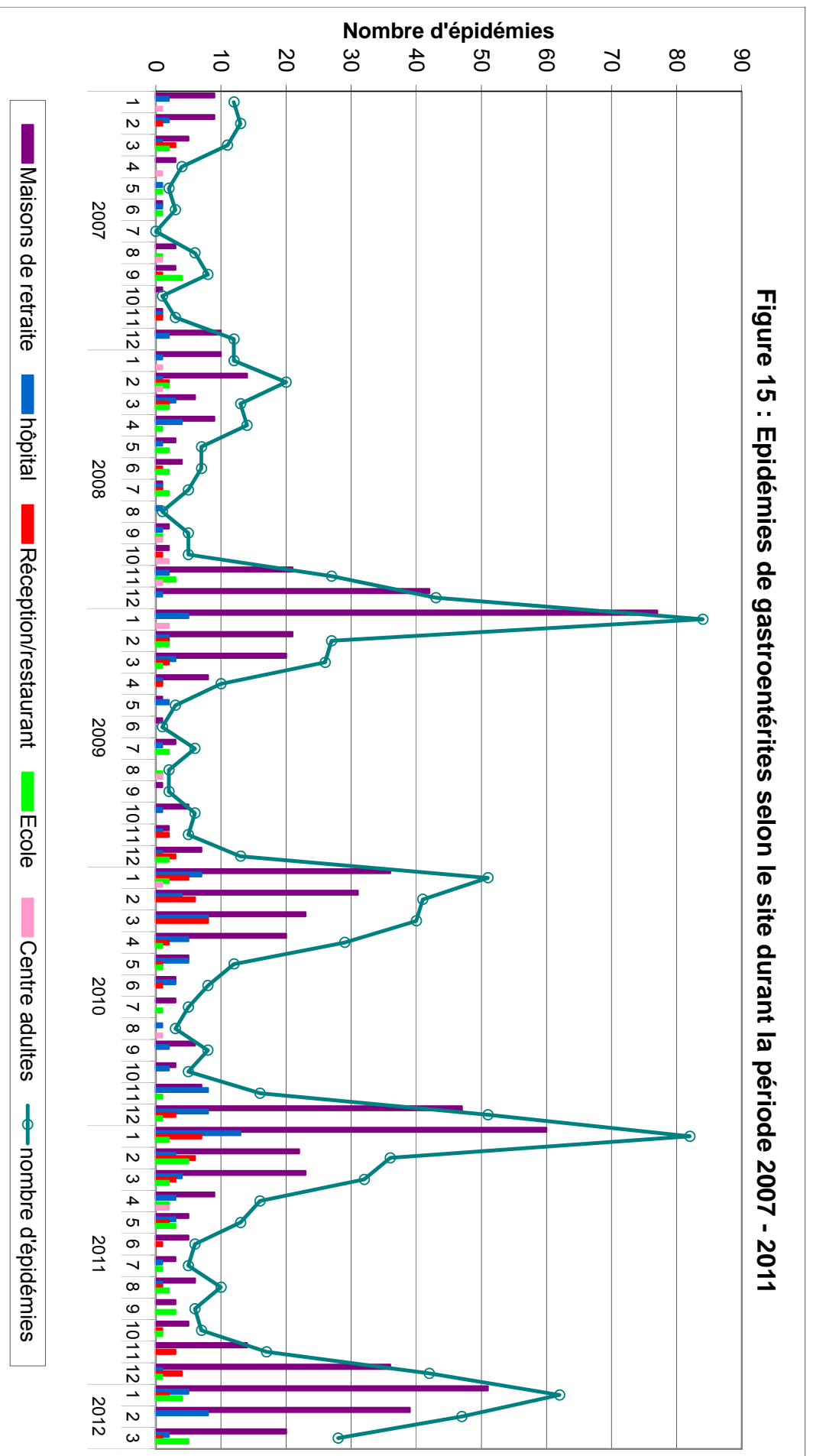
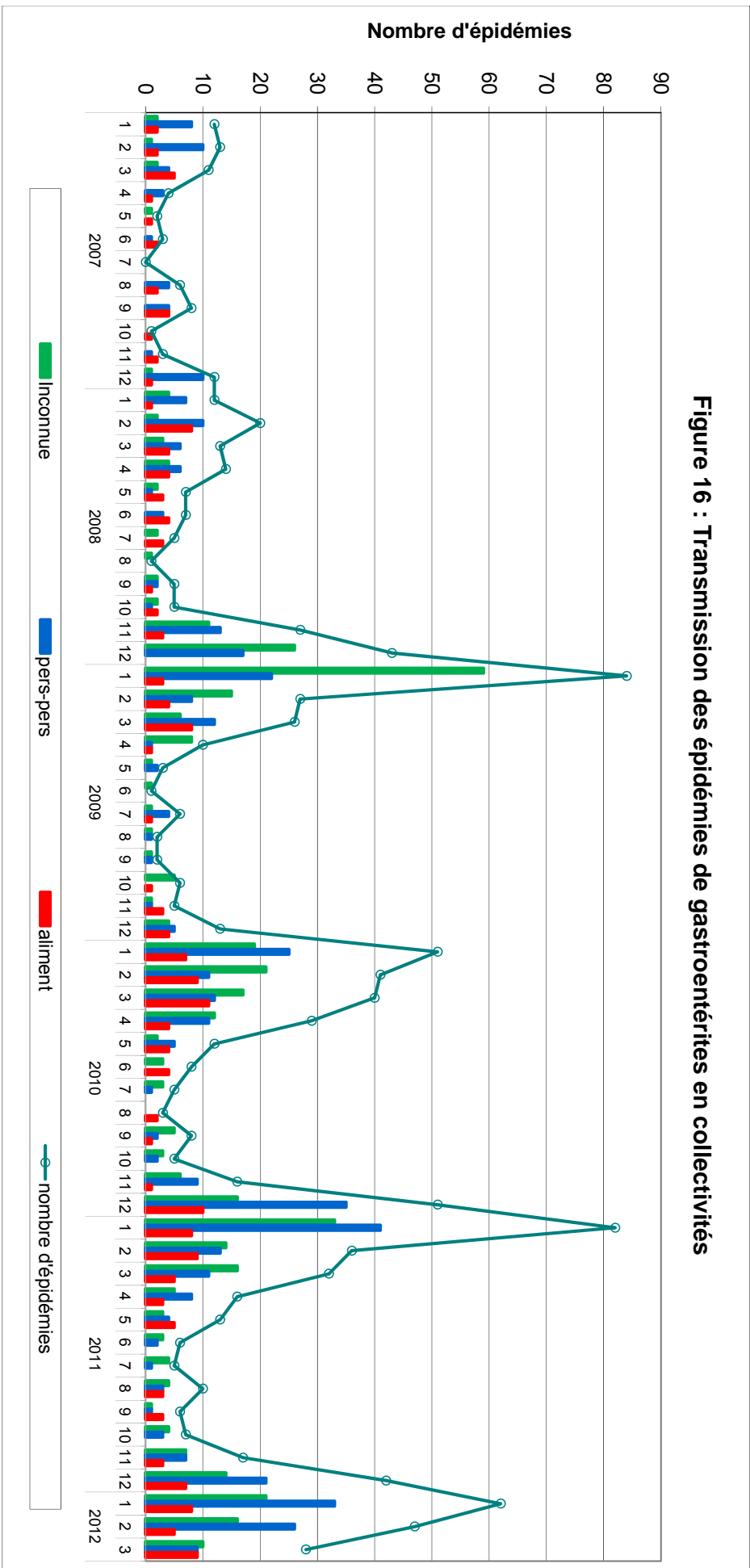


Figure 16 : Transmission des épidémies de gastroentérites en collectivités



3.3.3.2. Sites et modes de transmission

Site ou établissement (figure 15): La grande majorité des 1097 épidémies (2007-2011) est survenue dans des établissements pour personnes âgées ou maisons de retraites : 790 épidémies soit 72,5%. Les autres sites sont des services hospitaliers (140 épidémies : 12,8%), des réceptions (80 épidémies : 7,3%), des écoles (70 épidémies : 6,4%) et 16 épidémies sont survenues dans des collectivités d'adultes.

Respectivement pour 2011 : 191 épidémies (70,2%), 29 (10,7%), 28 (10,3%), 22 (8,1%) et 2 épidémies.

Mode de transmission (figure 16) : Durant cette période 2007-2011, le mode de transmission restait inconnu ou non renseigné pour 431 épidémies (38,1%). Le mode de transmission de personne à personne est incriminé dans 464 épidémies (49,3%). Une origine alimentaire était à l'origine de 202 épidémies (18,4%) et une origine hydrique a été trouvée pour 8 épidémies (0,7%).

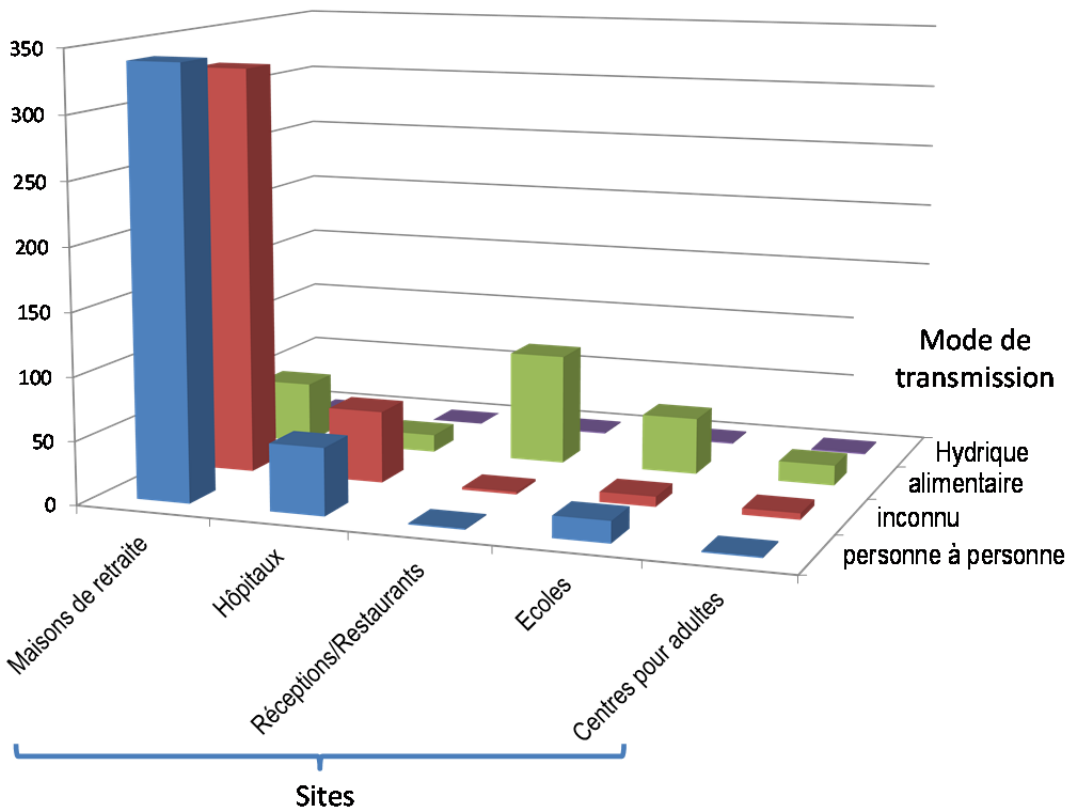
Respectivement pour 2011 : Origine inconnue pour 108 épidémies (39,7%), personne à personne pour 115 (42,3%), alimentaire pour 46 (16,9%), 22 (0,7%) et 1 épidémie d'origine hydrique.

Pour la quasi-totalité des épidémies provenant de maisons de retraite ou des services hospitaliers le mode de transmission est de personne-à-personne (environ 45%) ou non connu (environ 45%). **L'origine alimentaire est toutefois retrouvée dans 7% des épidémies survenant en maison de retraite et 11,3% des services hospitaliers** (figure 17).

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

L'observation rapportée sur les années 2007 à 2011 n'est pas significativement différente si on limite à l'année 2011 (tableau 6).

Epidémies explorées au CNR entre 2007 et 2011



Année 2011	Mode de transmission				Total
	Pers-pers	inconnu	alimentaire	Hydrique	
Maisons de retraite	95	88	8	0	191
Hôpitaux	12	17	0	0	29
Réceptions/Restaurants	1	0	26	1	28
Ecoles	6	4	11	1	22
Centres pour adultes	0	0	1	0	1

Figure 17 et tableau 6 : Correspondance entre mode de transmission et site de survenue de l'épidémie.

3.3.3.3. Virus en cause

Depuis 2007 jusqu'à mars 2012, 1097 épidémies ont été investiguées, pour 916 d'entre elles un virus était retrouvé dans les selles parvenues au laboratoire (83,5%). Dans la très grande majorité des cas le virus en cause est un **norovirus** (850 épidémies soit 93,2% des épidémies positives) et pour 805 épidémies (88,3%) il était le seul virus détecté (figure 18). Parmi les norovirus, ceux du génogroupe II (791 souches) et plus particulièrement le génotype 4 (GII.4 : 634 souches), sont largement prédominants (figures 19 et 20).

Dans 66 épidémies (7,2%) nous avons retrouvé un autre virus responsable (rotavirus, astrovirus, virus Aichi, adénovirus ou sapovirus pour les principaux).

Aucun virus n'a été détecté pour 185 épidémies soit 16,9% de l'ensemble des épidémies traitées.

Les norovirus GI.4 sont de loin les plus fréquemment retrouvés lors des épidémies. Les norovirus GI.4 présentent une grande capacité évolutive. Depuis 2002 de nouveaux variants apparaissent régulièrement (figure 20). Durant la période de surveillance sont d'abord apparus en 2006 les variants 2006a et 2006b qui ont co-circulé jusqu'à fin 2007. A partir de 2008, le variant 2006b est devenu largement prédominant. Les variants 2008 et 2010, très proches pour ce qui concerne leur capsid, ont remplacé le variant 2006b (figures 20 et 21), et depuis début 2011 jusqu'à présent nous retrouvons quasi exclusivement le variant 2010.

Caractéristiques des épidémies dues aux norovirus GI.4 (figure 22):

Mode de transmission : Le mode de transmission de personne à personne des infections à norovirus GI.4 est plus fréquent que pour les autres génotypes. Au contraire, une source alimentaire est nettement moins fréquemment l'origine des épidémies à norovirus GI.4.

Site de l'épidémie : Les norovirus GI.4 sont plus fréquemment détectés dans les établissements hébergeant des personnes âgées (EHPA) que les autres génotypes.

Les norovirus recombinants (tableau 7 :

Les **norovirus GI.1b/GI.3** sont apparus pour la première fois en 2000 et en France. Ces recombinants ont un gène de polymérase(ORF1) spécifique et se recombinent avec un gène de capsid (ORF2) d'un virus de génogroupe II (dans le cas présent souvent (mais pas exclusivement) un génotype 3. Ces recombinants sont apparus pour la première fois en France lors d'une épidémie liée à la contamination du réseau d'eau de consommation dans une commune. Ce recombinant est resté associé aux épidémies d'origine alimentaire ou hydrique. Depuis début 2009 il est rarement isolé dans les selles provenant d'épidémies.

Les **génotypes GI.12/GI.12** puis **GII.1/GII.1** sont apparus pour la première fois en octobre 2009 mais de façon significative à **partir de janvier 2010**. Au total, ces génotypes ont été détectés dans **36 épidémies depuis octobre 2009** (respectivement 19 et 16 épidémies plus un virus GI.12/GI.12). Pour 23 épidémies, il s'agissait du seul virus détecté ; pour 13 autres épidémies, on avait détecté plusieurs virus comme cause de l'épidémie. Ces génotypes sont génétiquement très proches pour leur polymérase.

Mode de transmission : **20 épidémies d'origine alimentaire**, 8 d'origine inconnue et 8 par transmission de personne à personne.

Site de l'épidémie : 10 dans des maisons de retraite, 3 dans des services hospitaliers, 11 épidémies lors d'une réception (ou d'un repas) et 12 dans des écoles (10) ou centre pour adultes (2) (tableau 7).

Les **génotypes GIle/GII.4** sont apparus pour la première fois en février 2011 (2 épidémies) mais de façon significative à **partir de décembre 2012 (7 épidémies) et nous totalisons 12 épidémies entre janvier et mars 2012**. Au total, ces génotypes ont été détectés dans **21 épidémies**. Pour 19 épidémies, il s'agissait du seul virus détecté ; pour 1 épidémie, on avait détecté plusieurs virus comme cause de l'épidémie. Contrairement aux précédents recombinants, le génotype Ge/GII.4 est surtout responsable d'épidémies en maison de retraite et le mode de contamination principal est de personne à personne.

Mode de transmission : **11 épidémies transmettent de personne à personne**, 7 d'origine inconnue et 3 d'origine alimentaire.

Site de l'épidémie : 20 dans des maisons de retraite, 1 dans un service hospitalier (tableau 7).

virus		2000-07	2008	2009	2010	2011	2012*
GGI Ib	Maison retraite	4	1	0	1	1	1
	Hôpitaux	0	0	0	2	0	
	Réception	9**	2**	0		1	
	Ecole ou collectivités	6**	3**	0		1	
	total	19	6	0	3	3	1
GGI Ig	Maison retraite			1	6	2	1
	Hôpitaux			0	2	1	0
	Réception			0	9**	1	1
	Ecole ou collectivités			1	6**	3	1
	total	0	0	2	23	7	4
GGI e	Maison retraite					9	11***
	Hôpitaux					0	1
	Réception					0	0
	Ecole ou collectivités					0	0
	total	0	0	0	0	9	12

* *Mois de janvier, février et mars de l'année 2012.*

** *Mode de transmission : principalement par les aliments*

*** *Mode de transmission : principalement de personne à personne*

Tableau 7 : Norovirus du génogroupe II recombinants (polymérase GI Ib, GG I Ig et GG I e). Apparition selon les années et dans les sites respectifs. Les recombinants GI Ib/GII puis GG I Ig/GII étaient retrouvés principalement lors de réceptions ou dans des collectivités ou écoles, le mode de transmission était principalement alimentaire. Le nouveau recombinant GI e/GII semble plutôt retrouvé dans les épidémies survenant en EHPA ou longs séjours et transmis de personne à personne.

Figure 18 : Virus responsables des épidémies. Période de 2007 à 2011

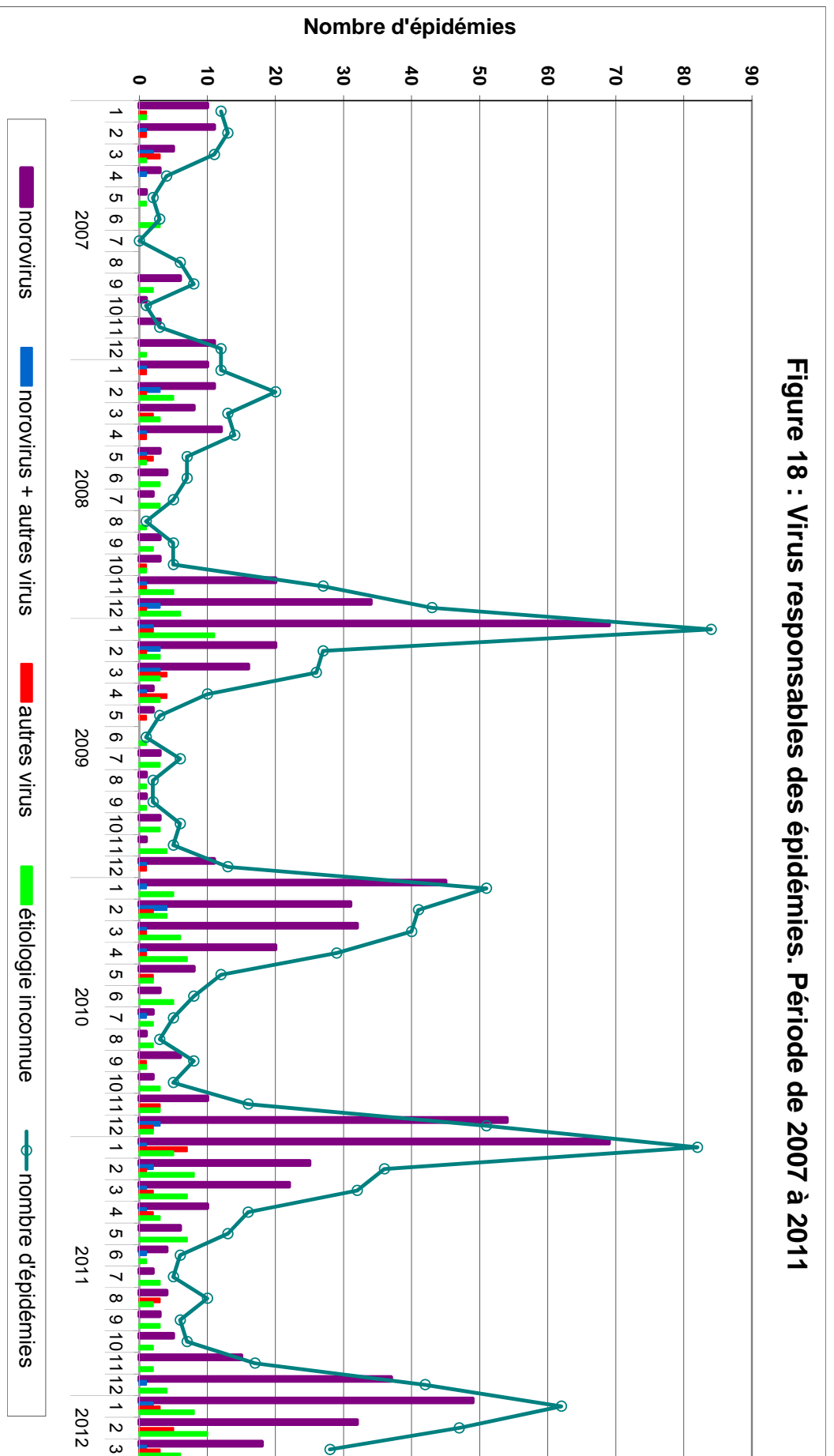


Figure 19 : Répartition des génogroupes de norovirus par épidémie

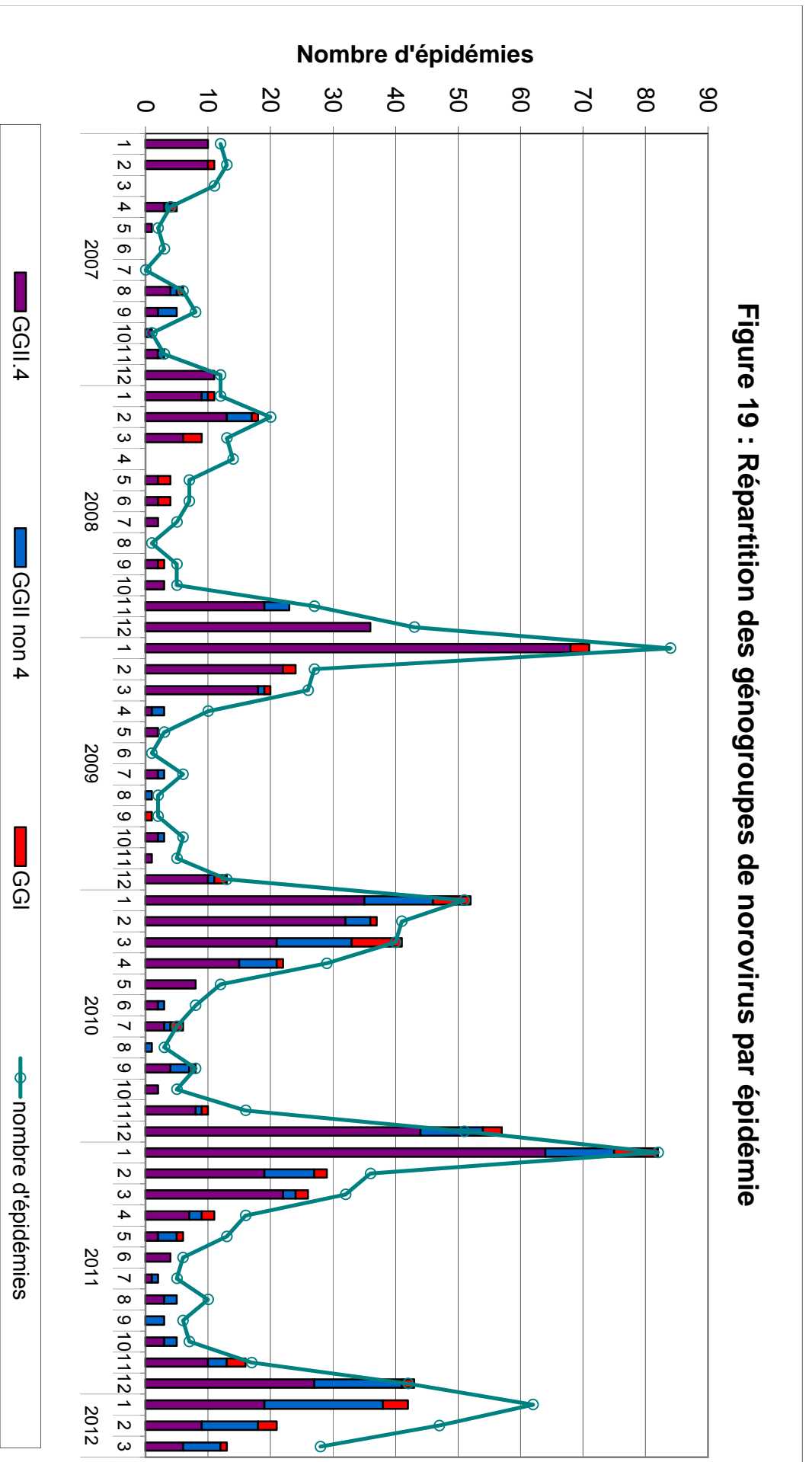
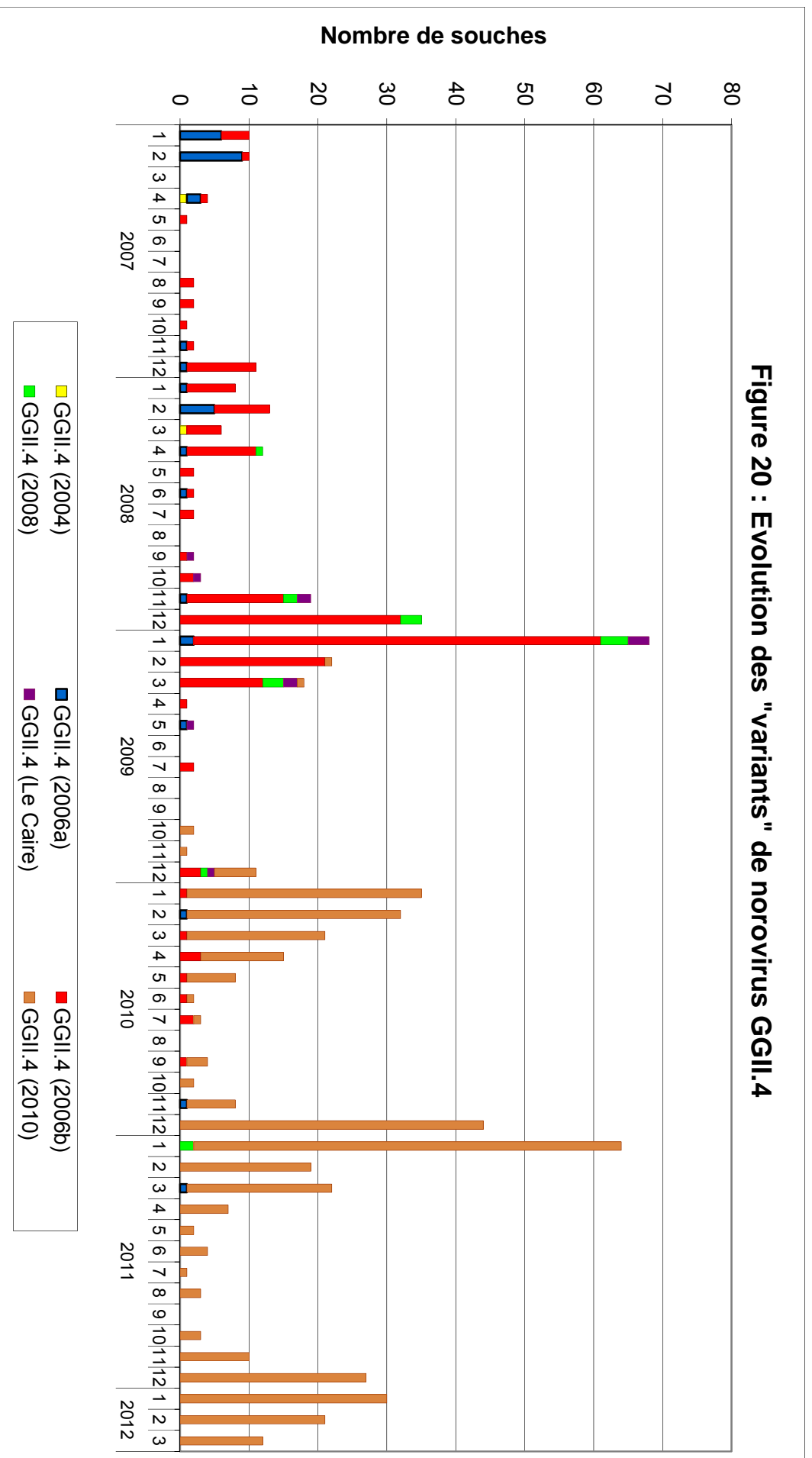


Figure 20 : Evolution des "variants" de norovirus GGII.4



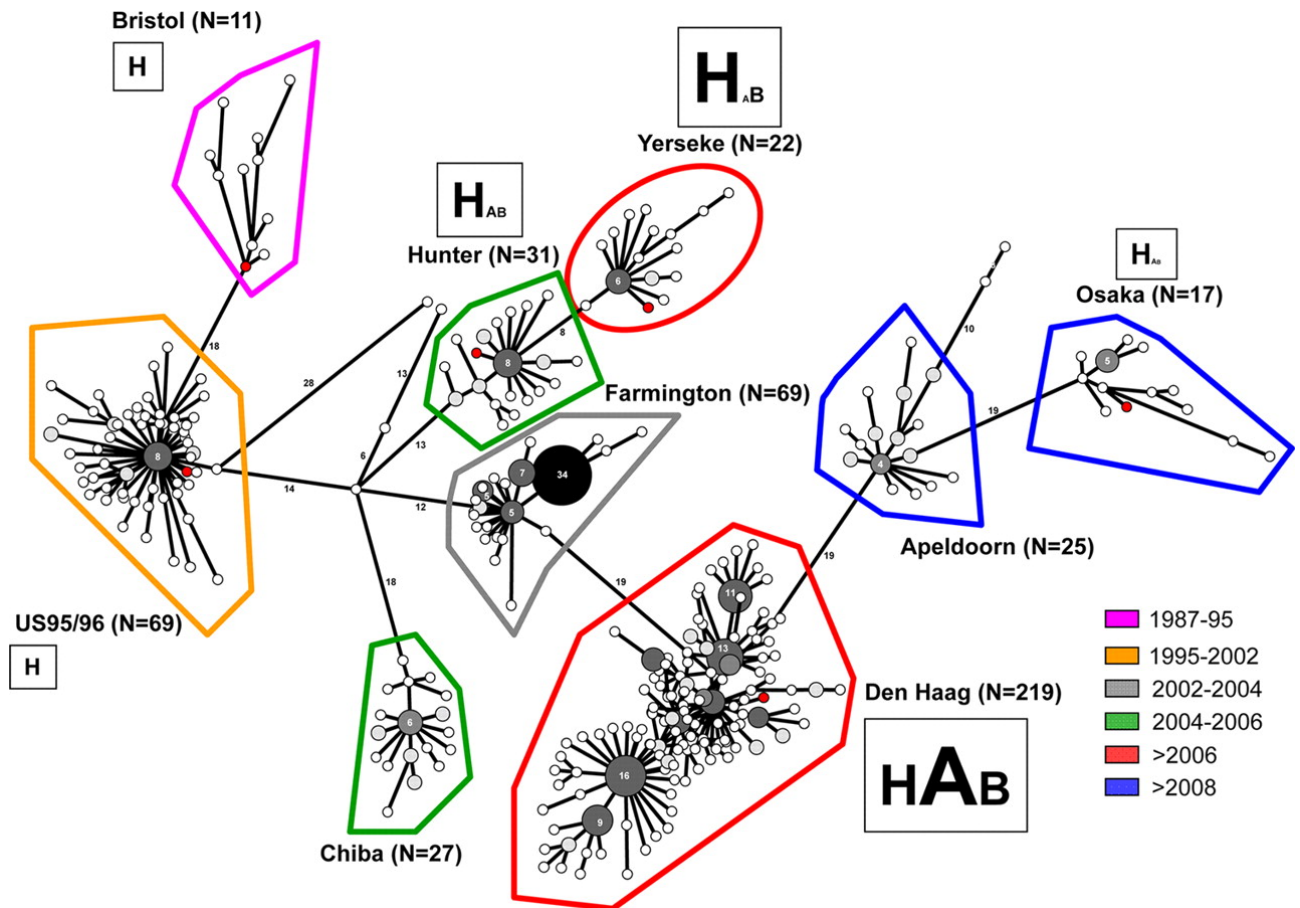


Figure 21 : Analyse phylogénétique des souches GII.4 dans l'ORF2 (codant la capside) sur un « arbre minimum couvrant ». Les variants 2006b dériveraient des souches « Farmington » détectées pour la première fois en 2002. Les variants 2006a dériveraient des souches « Hunter » (2004) ; les variants 2008 et 2010 seraient proches et dériveraient de la souche 2006b. Pour les antigènes A, B, et H, la taille de la lettre est mise à l'échelle en fonction de l'affinité relative déterminée par Résonance Plasmonique de Surface.

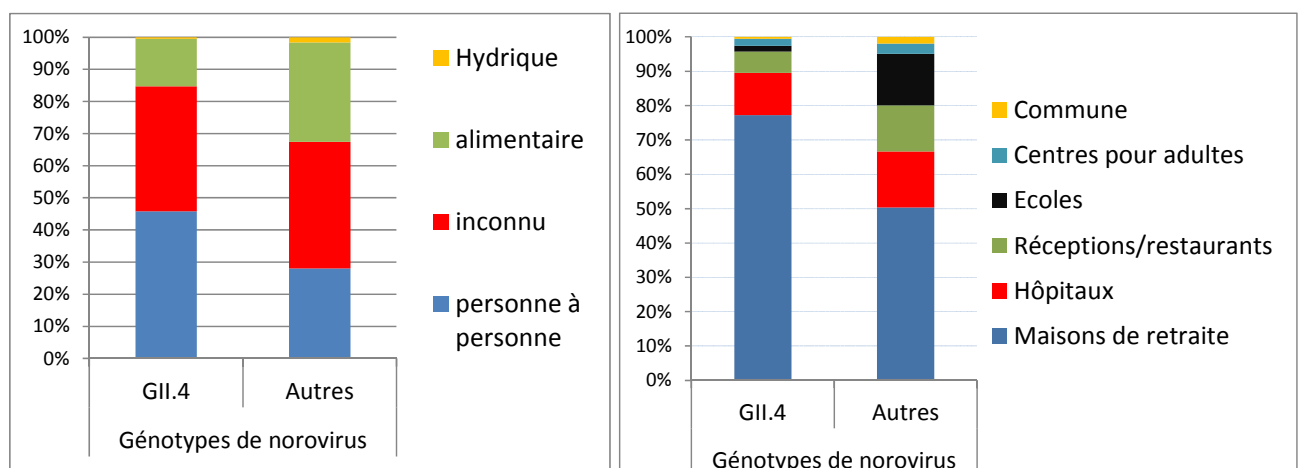


Figure 22 : Caractéristiques des épidémies dues aux norovirus de génotype GII.4 comparées à celles dues aux autres génotypes. Le mode de transmission de personne à personne est plus fréquent pour les épidémies à norovirus GII.4. Au contraire, une origine alimentaire est nettement moins fréquente dans les épidémies dues au génotype GII.4 que pour celles dues aux autres génotypes.

3.4. CONTRIBUTION AUX RESEAUX DE SURVEILLANCE INTERNATIONAUX

3.4.1. Réseaux internationaux «FBVE-Net », « NoroNet » et « EuroRotanet »

Le **réseau européen « FBVE-Net »** regroupe aujourd'hui les laboratoires qui participaient aux réseaux européens « DIVINE » et « EVENT » issus de financements de la Communauté Européenne. Nos partenaires français dans ce réseau sont l'InVS, l'IFREMER et le CNR des virus des hépatites A et E. Le **réseau NoroNet est mondial** et spécialisé sur les norovirus ; il regroupe plusieurs laboratoires européens, d'Amérique du Nord et du Sud, Asie et d'Océanie. Nos partenaires français sont l'InVS et l'IFREMER. **Le CNR des virus entériques de Dijon fait partie de ces deux réseaux dès leur origine.** Ces réseaux ont pour mission la surveillance et la caractérisation des virus responsables de gastroentérites, essentiellement les norovirus. Ils nous offrent l'accès à une base de données avec partage de celles-ci ; la possibilité d'une comparaison des souches de norovirus et d'une surveillance prospective des nouveaux variants. Ils sont pour nous des outils majeurs de la caractérisation des souches de norovirus détectées.

Le **réseau « EuroRotanet »** a pour mission la surveillance et la caractérisation des rotavirus responsables des gastroentérites chez les enfants. **Le CNR des virus entériques de Dijon a participé à la création de ce réseau européen.** Ce réseau nous permet une actualisation de nos techniques de caractérisation des génotypes de rotavirus et un partage des données virologique épidémiologique.

Outre notre participation aux recherches épidémiologiques dans un cadre européen, l'intégration de notre laboratoire dans ces réseaux nous donne l'accès aux **contrôles externes de qualité (rotavirus et norovirus).**

- *Composition des réseaux européens : Ces réseaux regroupent 14 laboratoires de 12 pays européens : **Pays Bas:** RIVM, Bilthoven (Dr M. Koopmans) ; **Finlande:** Helsinki University Central Hospital (Dr von Bonsdorff KH) ; **Danemark:** Virus Diagnostics Laboratory, Copenhague (Dr Böttiger) ; **Suède:** Karolinska Institute, Slona (Dr Svensson L) ; **Grande Bretagne:** Central Public Health Laboratory, London (Dr Brown D) ; **Allemagne:** Robert Koch-Institut, Berlin (Dr Schreier E) ; **Espagne:** Institut de Salud Carlos III, Madrid (Dr Sanchez A), Universitat de Barcelona (Dr Bosch A) et Universitat de Valencia (Dr Buesa J) ; **Italie:** Istituto Superiore di Sanità, Rome (Dr Ruggeri FM), **Slovénie :** Medical Faculty of Ljubljana (Dr. Poljsak-Prijatelj M); **Hongrie :** County Institute of State Public Health Service (Dr Szucs G) ; **France :** IFREMER (Dr Le Guyader S), CNR hépatites A et E-APHP Paul Brousse (E. Dussaix), CNR virus entériques-CHU Dijon (Pr Pothier P).*
- *Composition du réseau NoroNet : Europe (Pays-Bas, Grande-Bretagne, Allemagne, Hongrie, Suède et France) ; Amérique (USA, Canada, Nicaragua Venezuela, Chili) ; Asie Israël, Japon, Chine, Inde, Malaisie) ; Océanie (Australie et Nouvelle-Zélande).*

3.4.2. Collaborations « Egypte - Tunisie - Algérie - Maroc » (2006-2010)

Ces collaborations ont été soutenues par les **programmes CMCU et Hubert Curien** du Ministère des Affaires Etrangères et du Ministère de la Recherche. Nous avons formé **des étudiants tunisien et égyptien** aux techniques de diagnostic et de caractérisation moléculaire. Deux thèses d'Université, une en co-tutelle : Université de Bourgogne et Université de Monastir, Tunisie (Madame SDIRI-LOULIZI Khira) et une seconde de l'Université de Bourgogne (Mademoiselle KAMEL Aziza, de nationalité égyptienne) ont été soutenues respectivement en janvier et décembre 2009. D'autres étudiantes tunisiennes sont actuellement en stage dans notre laboratoire dans le cadre d'une thèse en co-tutelle. Il s'agit de Madame Mouna HASSINE-ZAAFRANE (quatrième année de thèse) et Madame Siwar AYOUNI (deuxième année de thèse).

Nous avons accueilli durant 9 mois un **stagiaire marocain** (Dr Doblali T., Hôpital Militaire d'Instruction Mohamed V et Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat). Nous devons accueillir un étudiant marocain durant l'année 2012.

Enfin, nous avons commencé une collaboration avec l'**Institut Pasteur d'Alger** afin d'y mettre en place les techniques de caractérisation moléculaire des rotavirus.

Les populations de ces pays ont des liens très forts avec l'Europe. Les gastroentérites virales y sont très fréquentes avec pour conséquence la circulation d'une diversité de souches virales et le risque d'émergence de certaines d'entre elles. Ces collaborations ont donc pour objectif une surveillance de l'épidémiologie des virus entériques dans la population et dans l'environnement des pays du pourtour méditerranéen afin d'anticiper un risque de diffusion en Europe. Ces études nous ont également permis de mieux comprendre le rôle des virus « nouveaux » comme le virus Aichi dans les gastro-entérites.

3.4.3. Collaborations « Iran – Niger – Burkina Faso » (2010-2012)

Dès 2008 nous avons entrepris une collaboration avec un laboratoire iranien de l'Université de Téhéran. En 2009-2010, nous avons commencé une étude épidémiologique sur les virus entériques avec l'étudiante accueillie et son nouveau laboratoire d'accueil, le département de Biotechnologies du « RAZI Vaccine and Serum Research Institute » (responsable Dr Mirjalili A.). Les événements politiques ont retardé ce projet. Une mission initialement prévue en 2010 a été repoussée à 2011 par le Ministère des Affaires Etrangères.

En 2010 nous avons accueilli un **stagiaire nigérien** et commencé une collaboration avec comme objectifs :

- 1) l'installation sur place d'un laboratoire capable de diagnostiquer et caractériser les rotavirus en vue de l'introduction de la vaccination par des ONG.
- 2) la réalisation d'une étude épidémiologique sur norovirus et virus Aichi.

En 2010 nous avons commencé une collaboration avec le **Burkina Faso** et nous avons accueilli étudiant en thèse, Monsieur Joseph MAKAYA MAKUMBU, du 1^{er} octobre au 30 décembre 2011.

3.4.4. Collaboration avec le Réseau International des Instituts Pasteur

2010-2012 : Nous participons au comité de suivi du programme « Infections entériques graves » organisé via l'Institut Pasteur et son Réseau International (responsables Sansonetti P et Victoir K). notre objectif est d'implanter dans les Instituts Pasteur de Bangui (République Centrafricaine) et de Madagascar les techniques de diagnostic moléculaire des virus entériques -essentiellement rotavirus et norovirus - responsables de gastroentérites. L'objectif étant une analyse moléculaire et épidémiologique des virus entériques circulant dans ces pays.

3.4.5. Contributions de notre laboratoire (2010-2011)

- Participation à la surveillance des épidémies à l'échelle européenne. Etude de **l'épidémiologie des virus responsables de gastroentérites et plus particulièrement les norovirus**.
- Participation à une étude multicentrique d'**évaluation des trousse de détection des norovirus** par immuno-enzymologie.
- **Etude phylogénétique des norovirus et autres calicivirus**, surveillance des nouvelles souches.
- Animation ou participation à un réseau de **surveillance des rotavirus**.
- Etude de **l'épidémiologie et de la pathogénicité des virus Aichi**.

3.5. ETUDES PONCTUELLES CONCOURANT A LA SURVEILLANCE

3.5.1. Sévérité des gastroentérites selon le génotype de rotavirus (2009-2011)

Ce travail a été conduit d'une part en collaboration avec le service de Pédiatrie Générale de l'hôpital Saint Vincent de Paul de l'AP-HP et d'autre part avec les données cliniques de notre réseau rotavirus. Nos résultats ne mettent **pas en évidence de différence de sévérité entre les génotypes de rotavirus**, notamment entre les génotypes G1 et G9.

3.5.2. Virus Aichi : études virologique et épidémiologique (2008-2011)

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, épidémiologique et clinique. Les études portant sur ce virus sont peu nombreuses et ne permettent pas d'en dégager un rôle pathogène clairement défini. Les travaux de notre CNR ont apporté une meilleure connaissance sur ce virus, son épidémiologie et sa pathogénicité et son rôle dans les gastroentérites.

3.5.3. Calicivirus bovin et nouveau génotype de *Nebovirus* (2010-2011)

Ce travail a été effectué en collaboration avec le laboratoire départemental de Côte d'Or (Dr E. Gueneau et Dr P. Asdrubal).

Principaux résultats et conclusions :

→ Les calicivirus bovins sont endémiques en France, avec un taux de détection de 24,8%. Parmi eux, les norovirus de génogroupe III prédominent, avec une prévalence de 19,5%, tandis que les nebovirus sont retrouvés dans 7,5% des cas.

→ Parmi les norovirus de génogroupe III, l'incidence la plus forte est observée pour les souches de génotype 2 (14%) par rapport aux souches de génotype 1 (5,5%).

→ Les souches de nebovirus identifiées sont toutes apparentées à la souche de référence Bo/Nebraska/80/US, exceptée une souche. Cette souche pourrait représenter un **nouveau génotype potentiel de nebovirus**, différent des souches Nebraska et Bo/Newbury1/76/UK jusque-là décrites.

3.5.4. Diarrhées chroniques à norovirus chez le transplanté (2010-2011)

En collaboration avec les équipes de transplantation de l'hôpital Necker, nous avons montré que les norovirus et sapovirus étaient fréquemment à l'origine de diarrhée chronique chez les transplantés de reins (Publication 9). Les génotypes viraux en cause étaient ceux retrouvés dans la population. Pour 10 des 13 patients ayant eu un suivi virologique, l'excrétion virale s'est prolongée plus de 27 jours (27 à 581 jours). Ces diarrhées chroniques se sont compliquées d'une insuffisance rénale aiguë (81%) ou d'un rejet du greffon (5/16 cas). L'identification de l'étiologie virale a permis d'adapter le traitement immunosuppresseur.

Ce travail est actuellement poursuivi par une information aux équipes de transplantation (présentations lors de manifestations scientifiques et autres moyens de communications). Le CNR des virus entériques travaille les services de transplantation et de virologie de 23 Centres Hospitaliers (essentiellement des CHU).

3.5.5. Etude des interactions norovirus-récepteurs glycanes (2010-2011)

La surveillance accrue des épidémies de NoV et l'amélioration des techniques de génétique moléculaire ont permis de montrer la prédominance des NoV de type GII.4. L'apparition d'un

nouveau type de variant à partir de 2002, le variant Farmington, a vu un changement dans la circulation des NoV GII.4 avec des variants circulant de façon prédominante pour une période de 3 ans pour ensuite disparaître au profit d'autres.

A partir de ce constat épidémiologique, l'objectif de nos travaux a été d'établir un lien entre les observations faites au cours des épidémies de gastroentérites et les propriétés de ces variants au niveau moléculaire. L'analyse de plusieurs variants, isolés entre 1987 et 2007, a permis de démontrer que l'apparition de ceux-ci après 2002 s'était accompagnée d'une affinité accrue pour les antigènes tissulaires des groupes sanguins, récepteurs naturels des NoV humains. D'autre part, nous avons démontré que le variant 2006b, très prédominant ces dernières années, avait la capacité d'infecter 95% (sécréteurs et non sécréteurs) de la population au lieu des 80% (sécréteurs) toujours observés pour les autres variants GII.4. Ces travaux ont ainsi permis d'établir le lien entre la grande prédominance de certains variants GII.4, en particulier les variants 2006b, et leur capacité accrue d'accroche avec les récepteurs des cellules intestinales.

Les nouvelles techniques d'investigation acquises dans le cadre de cette étude nous fournissent ainsi de nouveaux outils pour étudier l'impact des NoV dans la population.

3.6. CONCLUSION DES ACTIVITES D'EXPERTISE

- La sensibilité des trousse de diagnostic des norovirus par **immunochromatographie** est médiocre si l'on tient compte de l'ensemble des génotypes et moyenne pour le génotype GII.4. Ces résultats ne nous permettent pas de recommander ce système de diagnostic pour un diagnostic individuel. Par contre la multiplication des analyses de selles dans le cas des épidémies pourrait pallier le **manque de sensibilité de ces tests** dont l'avantage est – pour certains - la simplicité d'utilisation, donc l'utilisation au sein même d'un établissement. Ceci est vrai pour les épidémies survenant en EHPA ou services de long séjour où le génotype majoritairement retrouvé est le GII.4. Ces tests n'ont aucun intérêt dans le cas des épidémies d'origine alimentaire où l'on retrouve majoritairement d'autres génotypes.

Un autre problème trouvé dans l'utilisation de ces tests est leur **moindre sensibilité pour la détection des nouvelles souches**. Ce phénomène qui demande à être mieux étudié pourrait être **lié à la dérive antigénique des norovirus de génotype GII.4**. S'il était confirmé, ce phénomène nécessiterait une surveillance régulière de la sensibilité de ces tests vis-à-vis des nouveaux génotypes circulant.

- Les épidémies analysées par le CNR depuis 2006 ont augmenté pour se stabiliser depuis la saison 2008-2009. Cette augmentation est plus le résultat d'un meilleur recrutement sur l'ensemble du territoire, y compris les DOM, plus qu'une que d'une réelle augmentation des épidémies de gastroentérites. Depuis la saison 2008-2009 le nombre d'épidémies analysées au CNR reflète mieux l'intensité des épidémies hivernales.

Les **norovirus sont la première cause des gastroentérites collectives** analysées dans notre laboratoire. Dans la grande majorité des cas il s'agit de norovirus appartenant au génogroupe II et plus précisément au génotype 4 (**GII.4**). Souvent cette souche est responsable d'épidémies survenant en **maison de retraite** avec comme mode de contamination la **transmission de personne à personne**.

Le second point devant être souligné est la très **grande capacité évolutive des norovirus GII.4**. Le variant prédominant dès janvier 2008 était 2006b qui a persisté durant l'hiver 2008 - 2009. Pour les hivers 2009-2010 et 2010-2011, un nouveau variant (variant 2010) est apparu et a été responsable de la majorité des épidémies.

4. ALERTE

4.1. CONTACT HEBDOMADAIRE AVEC L'INVS

Un **point hebdomadaire avec l'InVS** est effectué le mardi par rendez-vous téléphonique. Le réseau sentinelle est associé à cette réunion téléphonique.

Nos contacts à l'InVS sont Madame Nathalie JOUDAN-DA SILVA et Monsieur Gilles DELMAS.

Notre interlocuteur au réseau sentinelle est Monsieur Christophe ARENA.

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

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

- ✓ **Faxer** au demandeur les **4 formulaires** de la pochette « Épidémie : protocole et formulaires à faxer » (classeur « Formulaires ») **ou** les envoyer par **e-mail** (*S:\CNR Virus Entériques\Modèles\Formulaires épidémie e-mail*).
- ✓ Déterminer l'**identifiant de l'épidémie** (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :
code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année
(Exemple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)
- ✓ Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>) :
 - ◆ Vérifier s'il n'existe pas déjà une fiche enregistrée par l'InVS pour cette épidémie
 - ◆ Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à l'InVS, créer une nouvelle fiche

3.1.1. Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :

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

3.1.2. Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :

- ✓ Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- ✓ Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyer au prescripteur, par fax ou par mail, le formulaire n° 2 (fiche globale) pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

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

4.3. DESCRIPTION DE L'INFRASTRUCTURE INFORMATIQUE

4.3.1. Transmission des données à l'InVS

Voozanoo (<https://voozanoo.invs.sante.fr>) :

Voozanoo est une base de données partagée entre l'InVS et le CNR, qui permet un échange en temps réel des informations épidémiologiques et moléculaires sur les épidémies de gastroentérites annoncées et/ou traitées (voir paragraphe 3.2.1. Procédure de traitement d'une épidémie).

1.1. Enregistrement d'une épidémie dans la base Voozanoo

Annonce d'une épidémie au CNR directement par un laboratoire, une ARS ...

- ◆ Vérifier s'il n'existe pas déjà une fiche enregistrée dans la base **Voozanoo** par l'InVS pour cette épidémie
- ◆ Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à l'InVS, créer une nouvelle fiche pour entrer les premières informations

Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo :

- ◆ Noter les données enregistrées par l'InVS sur une feuille **Premières informations** (classeur « Formulaires ») à ranger dans la chemise violette du casier « Épidémies en attente » en précisant qu'il s'agit d'une annonce InVS.

1.2. Rendu des résultats à l'InVS

Les résultats préliminaires et définitifs sont entrés dans la base **Voozanoo** de l'InVS.

Parallèlement, les résultats définitifs sont entrés dans le système informatique des analyses de laboratoire du CHU de Dijon (LAB400) pour archivage ; ce système informatique est protégé par un accès sécurisé.

4.3.2. Anonymisation des prélèvements

Enregistrement des prélèvements reçus au CNR

- ◆ Repérer sur la coprothèque (classeur jaune, onglet : Externes) le ou les numéros et identifier chacun des échantillons face au numéro en fin de liste (commencer par **E...**) puis les enregistrer sur le **serveur du CHU**

(S:\CNR Virus Entériques\Coprothèques\COPROTHÈQUE Externes).

Classement des dossiers

Annexer les documents joints aux prélèvements dans une chemise identifiée par :

- ◆ le **nom de la ville** qui a inspiré le numéro d'identifiant
- ◆ l'**identifiant l'épidémie** (*code département / 2 premières lettres de la ville / mois / année*)
- ◆ le **numéro** du carton suivi du numéro de la chemise (Exemple : 15.03 correspond au carton en cours n°15, la chemise n°3 dans ce carton)
- ◆ les **numéros des échantillons** correspondants (E.... à E....)

4.4. PROCEDURES DE TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS DES CAS GROUPE DE GEA

4.4.1. Procédures de traitement d'une épidémie.

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

AVIS D'EPIDEMIE DE GEA ou TIAC

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

- ✓ **Faxer** au demandeur les **4 formulaires** de la pochette « Épidémie : protocole et formulaires à faxer » (classeur « Formulaires ») **ou** les envoyer par **e-mail** (S:\CNR Virus Entériques\Modèles\Formulaires épidémie e-mail).
- ✓ Déterminer l'**identifiant de l'épidémie** (code à garder tout au long de l'épidémie) de la manière suivante :
code département – 2 premières lettres de la ville – mois – année
(Exple : épidémie à La Baule en mars 2006 = 44BA0306)
- ✓ Dans la liste « **Épidémies annoncées/reçues** » (chemise violette, casier « Épidémies en attente ») : vérifier s'il n'existe pas le même identifiant ou si l'épidémie n'a pas déjà été annoncée ; compléter la liste.

Remarque : - s'il y a déjà eu une épidémie dans la même ville, le même mois, ajouter un numéro d'ordre (Exemple : 44BA0306/2)

- de même, en cas d'ambiguïté sur l'identifiant de l'épidémie (Exple : épidémie à Batz-sur-mer également en mars 2006 : 44BA0306/2)

- ✓ Compléter une feuille **Premières informations** (classeur « Formulaires ») à ranger dans la chemise violette du casier « Épidémies en attente ».
- ✓ Entrer ces premières informations dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>) :
 - ◆ Vérifier s'il n'existe pas déjà une fiche enregistrée par l'InVS pour cette épidémie
 - ◆ Si l'épidémie n'a pas encore été annoncée à l'InVS, créer une nouvelle fiche

□ Annonce d'une épidémie via la base Voozanoo de l'InVS :

- ✓ Noter les données enregistrées par l'InVS sur une feuille **Premières informations** (classeur « Formulaires ») à ranger dans la chemise violette du casier « Épidémies en attente » en précisant qu'il s'agit d'une annonce InVS.
- ✓ Compléter la liste **Épidémies annoncées/reçues** » (chemise violette, casier « Épidémies en attente ») en précisant également « annonce InVS ».
- ✓ Attendre la **réception éventuelle** des prélèvements, accompagnés des formulaires épidémiologiques qui auront été fournis par l'InVS.

□ Arrivée de prélèvements sans annonce préalable :

- ✓ Suivre la procédure décrite pour une épidémie annoncée par téléphone.
- ✓ Si les prélèvements ne sont pas accompagnés des formulaires du CNR, envoyer au prescripteur, par fax ou par mail, le formulaire n° 2 (fiche globale) pour avoir des renseignements sur l'épidémie.

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

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 face au numéro en fin de liste (commencer par **E....**) puis les enregistrer sur le **serveur** (*S:\CNR Virus Entériques\Coprothèques\COPROTHÈQUE Externes*).
- ✓ Enregistrer les prélèvements dans **LAB 400** :
 - ◆ Entrer en numéro de séjour le numéro « **011731380** » correspondant au « **patient CNR** » pour tous les échantillons et préciser dans l'interface « **Commentaire** » le nom, le prénom et la date de naissance de chacun des patients.
 - ◆ Pour une épidémie personne à personne ou alimentaire (hors coquillage), enregistrer en première intention :
 - Code **30990** : RT-PCR norovirus temps réel
 - ◆ Pour une épidémie liée à l'eau ou aux coquillages, enregistrer les codes d'analyses suivants :
 - Code **30995** : Seeplex (PCR adénovirus, RT-PCR astrovirus, rotavirus et norovirus G1/G2)
 - Code **30942** : RT-PCR Hépatite A
 - Code **30944** : RT-PCR Entérovirus
 - Code **30958** : RT-PCR Aichivirus
 - Code **30975** : RT-PCR Sapovirus
 - ◆ Une fois chaque patient enregistré, imprimer la **liste de travail** qui permettra de répertorier les résultats des différentes manip.
- ✓ Compléter la **liste des épidémies** (*S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste épidémies*)

□ **Mettre toutes les données dans une chemise identifiée par :**

- ◆ le **nom de la ville** qui a inspiré le numéro d'identifiant
- ◆ l'**identifiant épidémie** correspondant
- ◆ le **numéro** du carton suivi du numéro de la chemise
(Exple : 15.03 correspond au carton en cours n°15, la chemise n°3 dans ce carton)
- ◆ les **numéros des échantillons** correspondants (E.... à E....)

Remarque : Joindre à la chemise le formulaire « **Premières informations** » et un exemplaire du formulaire « **Récapitulatif rendu des résultats** ».

ANALYSES

□ **Extraction des acides nucléiques :**

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

□ **Épidémie personne à personne ou alimentaire (hors coquillage) :**

- ✓ Recherche de *Norovirus* par temps réel :
 - ◆ Génogroupe 1 (amorces : JJV1NF/JJV1R, sondes : JJV1P et RING-1B)
 - ◆ Génogroupe 2 (amorces : QNIF2d/Cog2R, sonde : QNIF2)
- ✓ Si l'épidémie est positive en temps réel, PCR classique One Step :
 - ◆ Polymérase (amorces JV12/JV13)
 - ◆ Capside (amorces GISKF/GISKR et/ou GIISKF/GIISKR)
- ✓ Si l'épidémie est négative en temps réel :
 - ◆ Recherche de sapovirus (amorces SR80/NVP110)
 - ◆ Recherche immuno-enzymologie :

- Adénovirus 40-41 (Elisa Meridian)
- Astrovirus (Elisa Oxoid)
- Rotavirus du groupe A (Elisa Méridian)
- ◆ Si Elisa positif(s) :
 - Rotavirus du groupe A (RT-PCR)
 - Astrovirus (RT-PCR Mon244/Mon245 et si nécessaire Mon269/Mon270)
 - Adénovirus (PCR Adv-hex1deg/hex2deg)

Remarque : Les kits ELISA sont stockés à + 4°C dans le frigo en pièce post-PCR (1-114) et les kits neufs dans la chambre froide à +4°C au sous-sol. Les tampons de dilution des selles, qui sont utilisés en pièce d'extraction (1-120A), ne doivent en aucun cas transiter par le secteur post-PCR. Il ne faut donc pas oublier de sortir des kits neufs avant que ceux-ci soient stockés en post-PCR. Les tampons sont, eux, stockés dans la pièce d'extraction (1-120A).

□ **Épidémie liée à l'eau ou aux coquillages :**

- ✓ Recherche de norovirus, adénovirus, astrovirus et rotavirus du groupe A par **PCR Seeplex**. Si la PCR Seeplex est positive pour un ou plusieurs virus réaliser :
 - ◆ Norovirus en One Step : polymérase (amorces JV12/JV13) et capsid (amorces GISKF/GISKR et/ou GIISKF/GIISKR)
 - ◆ Adénovirus (PCR Adv-hex1deg/hex2deg)
 - ◆ Astrovirus (RT-PCR Mon244/Mon245 et si nécessaire Mon269/Mon270)
 - ◆ Rotavirus du groupe A (nouvelle technique)
- ✓ Recherche de sapovirus dans la polymérase (amorces SR80/NVP110)
- ✓ Recherche des entérovirus (amorces E1-E2)
- ✓ Recherche du virus Aichi : polymérase (amorces AI6261/AI6779)
- ✓ Recherche de l'hépatite A (amorces HAV1-HAV2)

□ **Typage par séquençage des produits de PCR :**

- ✓ Purification des produits de PCR positifs
- ✓ Quantification
- ✓ Séquençage

Important : Penser à copier les manips sur le cahier EXTERNE et à synthétiser les **RÉSULTATS** sur la liste de travail à la fin de chaque manip.

RENDU DES RESULTATS

□ **Rendre les résultats préliminaires :**

- ✓ **par téléphone** au(x) prescripteur(x) avant l'envoi définitif par courrier
- ✓ dans la base **Voozanoo** de l'InVS : <https://voozanoo.invs.sante.fr>

□ **Rendre les résultats définitifs dans LAB 400 :**

- ✓ Ajouter, si nécessaire, les codes correspondants aux analyses complémentaires effectuées
- ✓ Entrer, pour chaque analyse, le résultat : **n+** = négatif OU **p+** = positif

ATTENTION : Les compte-rendus d'épidémie ne sont pas à sortir via LAB 400 ; cependant le logiciel garde les résultats en mémoire. Pour qu'ils ne soient pas imprimés, utiliser la **procédure d'édition n°466** mais annuler directement la tâche sur l'imprimante (VIROLOIL08).

□ **Créer un dossier au nom de l'épidémie sur le serveur (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\CR épidémies\dossier n°..) comprenant :**

- ✓ Un **compte rendu** (à imprimer en plusieurs exemplaires) pour :
 - ◆ la chemise de l'épidémie
 - ◆ P. Pothier
 - ◆ la ARS (ou CIRE)
 - ◆ le laboratoire expéditeur

- ◆ le(s) prescripteur(s)
- ✓ Un **tableau récapitulatif** de l'épidémie (à imprimer en 3 exemplaires) pour :
- ◆ la chemise de l'épidémie
 - ◆ P. Pothier
 - ◆ le classeur Fiches épidémies
- **Pour les calicivirus séquencés :**
- ◆ Compléter **l'alignement des souches en fonction du génotype** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences)
 - ◆ Entrer le numéro des échantillons séquencés dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste des échantillons par virus)
- **Entrer les données épidémiologiques et moléculaires (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats) :**
- ◆ Dans la base **Voozanoo** de l'InVS (<https://voozanoo.invs.sante.fr>)
Rem : Pour les épidémies annoncées mais non reçues, ne pas oublier d'entrer aussi les données
 - ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Externes »
 - ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableaux « Récapitulatif échantillons Externes » et « Récapitulatif Épidémies »
 - ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** » (hors calicivirus)
 - ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
 - ◆ Sur le site du réseau européen **FBVE** (<http://secure.rivm.nl/mpf/norovirus/database>)

ECHANTILLON HOSPITALISE OU EXTERNE HORS CONTEXTE EPIDEMIQUE (CAS SPORADIQUE)

RECEPTION DU PRELEVEMENT

- ❑ **Noter la date de réception du ou des prélèvements sur le(s) papier(s) joint(s)** (formulaire du CNR, prescription, feuille de laboratoire...)
- ❑ **Conserver les échantillons** : à 4°C (traitement dans les 48h) ou à – 20°C.
- ❑ **Enregistrer le prélèvement** :
 - ✓ Dans la **coprothèque** (classeur jaune, onglet : hospitalisés ou externes), enregistrer l'échantillon face au numéro en fin de liste (commencer par **H...** ou **E...**) puis sauvegarder sur le **serveur** (S:\CNR Virus Entériques\Coprothèques\COPROTHÈQUE Hospitalisés ou COPROTHÈQUE Externes).
 - ✓ Enregistrer le patient dans **LAB 400** :
 - ◆ Enregistrer le nom, le prénom, la date de naissance, la date de prélèvement
 - ◆ Enregistrer les examens demandés
 - ◆ Imprimer la liste de travail ; la glisser dans une pochette plastique avec les papiers accompagnant le prélèvement et la déposer dans la pochette « **cas sporadiques et hospitalisés** », casier « **en cours d'analyse** ».

ANALYSES

- ❑ **Réaliser les analyses selon la demande**
- ❑ **Dans certains cas particuliers (exple : les hospitalisés en néonate sans prescription et les patients hospitalisés à Necker), faire toute la batterie virale par PCR** :
 - ◆ Code **30939** (Seeplex, bocavirus, coronavirus, CMV, entérovirus, paréchovirus, sapovirus et virus Aichi)
 - ◆ Et éventuellement le code **30942** (hépatite A)

Remarque : Penser à copier les manips sur le cahier EXTERNE.
Synthétiser les résultats sur la liste de travail à la fin de chaque manip.

RENDU DES RESULTATS

- ❑ **Rendre les résultats dans LAB 400** :
 - ✓ **n+** = négatif , **p+** = positif
- ❑ **Pour les Hospitalisés** :
 - ✓ Imprimer un **compte-rendu dans LAB 400** en « Edition des comptes rendus » (n°8) puis « Edition par numéro » (n°2).
 - ✓ Faire signer le compte-rendu et en faire une copie. Envoyer l'original au prescripteur par **courrier interne** (casier « **courrier** », pièce de sérologie PB-1087). Ranger la photocopie avec la feuille de travail dans la pochette plastique et l'archiver dans le **classeur bleu « Hospitalisés »**.
 - ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter l'**alignement des souches en fonction du génotype** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences) et entrer le numéro des échantillons dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste des échantillons par virus).

✓ Entrer les **données épidémiologiques et moléculaires** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats) :

- ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Hospitalisés »
- ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
- ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** »
- ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableau « Récapitulatif Hospitalisés »

□ **Pour les Externes** :

- ✓ Faire un **compte-rendu** dans le dossier « **CR Cas sporadiques** » de l'année en cours (S:\CNR Virus Entériques\Rendu résultats\CR Cas sporadiques\Externes\Externes 200_) puis l'imprimer sur papier à **en-tête du CHU**.
- ✓ Faire signer le compte-rendu et en faire une copie. Envoyer l'original au **prescripteur** sous enveloppe. Ranger la photocopie avec la feuille de travail dans la pochette plastique et l'archiver dans le **classeur jaune « Cas sporadiques »**.
- ✓ Pour les **calicivirus** séquencés : compléter l'**alignement des souches en fonction du génotype** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats\Alignement séquences) et entrer le numéro des échantillons dans les **tableaux norovirus** et/ou **sapovirus** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats>Liste des échantillons par virus).
- ✓ Entrer les **données épidémiologiques et moléculaires** (S:\CNR Virus Entériques\Rendu Résultats) :
 - ◆ Dans le dossier « **Banques de données** », tableau « Bq données Externes »
 - ◆ Dans le dossier « **CNR Entérovirus Lyon** », « Tableau récapitulatif mensuel 200_ »
 - ◆ Dans le dossier « **Liste des échantillons par virus** »
 - ◆ Dans le dossier « **Récapitulatifs ext et hosp** », tableau « Récapitulatif échantillons Externes »

4.4.2. Protocoles d'envoi d'échantillons de selles et formulaires.

Renseignements disponibles sur le site :

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

*Site accessible par moteurs de recherche avec la dénomination suivante
« CNR virus entériques »*



Centre Hospitalier Universitaire **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'ÉCHANTILLONS DE SELLES POUR INVESTIGATION D'UNE ÉPIDÉMIE DE GASTRO-ENTÉRITES

Recueil des échantillons :

- Pour l'investigation d'une épidémie de gastro-entérites, un minimum de **3 à 5 échantillons** est recommandé (un échantillon par patient).
- Chaque échantillon doit être recueilli dans un flacon type flacon à coproculture.
- Les prélèvements sont à conserver à +4°C (pour un envoi sous 48h) ou à -20°C (pour un envoi différé).
- **Les prélèvements doivent être accompagnés des formulaires n°1 (demande d'investigation), n°2 et n°3 (renseignements épidémiologiques) ci-joints.**

Réalisation du colis :

- **Les prélèvements doivent être envoyés dans un triple emballage conforme à la réglementation en vigueur pour le transport des échantillons cliniques (arrêté ADR¹) :**
 - ✓ Déposer les flacons (*réipients primaires*), entourés de papier absorbant, dans un sachet plastique ou une boîte rigide (plastique, métallique...) à fermeture hermétique (*emballage secondaire*), puis dans une boîte en carton ou polystyrène (*emballage extérieur*), avec interposition de matières de rembourrage appropriées.
 - ✓ Apposer sur la surface extérieure du colis la désignation « Matière Biologique, catégorie B » près de la mention UN 3373 en forme de losange.



MATIERE BIOLOGIQUE
CATEGORIE B

Conditions d'envoi :

- **Le colis est à envoyer à température ambiante (max. 25°C) ou réfrigéré (max. 4°C) dans un délai rapide (48-72h) par voie postale ou par transporteur agréé.**
- Pour éviter les délais d'acheminement trop longs, il est souhaitable d'effectuer l'envoi en début ou en milieu de semaine (laboratoire ouvert tous les jours sauf le dimanche).
- Expédier le colis à l'adresse suivante :

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

¹ Arrêté du 5 décembre 2002 modifiant l'arrêté du 1^{er} juin 2001 relatif au transport des matières infectieuses : instructions ADR P650 (par route) ou IATA 650 (par air).



Centre Hospitalier Universitaire **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

Étiquette à découper et à coller sur le colis :

Nombre d'échantillons envoyés :

👉 Préciser l'identité et la date de naissance des patients ainsi que la date de prélèvement sur les pots à coproculture.



**MATIERE BIOLOGIQUE
CATEGORIE B**



Centre Hospitalier Universitaire **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 FORMULAIRE N°2 – FICHE GLOBALE

Référent (nom, qualité) :

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 :
Dont nombre de patients décédés 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** :
 - Personne à personne
 - Alimentaire (hors coquillage)
 - Alimentaire puis personne à personne
 - Coquillage
 - Hydrique
 - Inconnu

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 :
 - vomissements uniquement :
 - diarrhées uniquement :
 - diarrhées et vomissements :
- Autres signes cliniques**:
- Analyses microbiologiques (bactériologie & parasitologie) réalisées** : oui non

Si oui, préciser : - nombre de patients:
- résultats:



Centre Hospitalier Universitaire **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 FORMULAIRE N°3 – FICHE INDIVIDUELLE

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

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

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

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

*Cocher les cases concernées

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

5.1. PARTICIPATION AUX COMMISSIONS SPECIALISEES ET ACTIVITES D'EXPERTISE

Un point hebdomadaire avec l'InVS est effectué le mardi par rendez-vous téléphonique. Le réseau sentinelle est associé à cette réunion téléphonique.

Nos contacts à l'InVS sont Madame Nathalie JOUDAN-DA SILVA et Monsieur Gilles DELMAS. Notre interlocuteur au réseau sentinelle est Monsieur Christophe ARENA.

Haut Conseil de Santé Public (2006-mars 2011)

Le responsable du CNR des virus entériques a été membre du HCSP et à ce titre expert de dossiers dont certains concernent le domaine des gastroentérites :

- Groupe de travail sur la vaccination rotavirus (2009-2010).
- Groupe de travail « gastro-entérites et personnes âgées » (2009-2010) ayant débouché sur les recommandations relatives aux conduites à tenir devant des gastro-entérites aiguës dans les collectivités de personnes âgées

5.2. ACTIVITES DE CONSEIL

- Aides à d'autres laboratoires (transmission de souches de référence, soutien technique ou autre) :
 - Divers laboratoires d'analyses Médicales (2006-2011).
 - Divers services de longs séjours, services hospitaliers (2006-2011).
- Conseils téléphoniques destinés à des collègues biologistes, médecins hygiénistes, médecins épidémiologistes (ARS, CIRE), médecins cliniciens.

5.3. ENCADREMENT DE STAGIAIRES

- Encadrement d'étudiants en Médecine et Pharmacie, de stagiaires de l'IUT.
- **2009 – 2012** : Encadrement d'une stagiaire tunisienne en thèse en cotutelle (Madame Mouna HASSINE-ZAAFRANE)
- **Depuis 2010**, encadrement d'une étudiante tunisienne en thèse en cotutelle (Madame Siwar AYOUNI)
- **Depuis 2010** : Conseil au laboratoire CERMES (Niamey, Niger) depuis l'accueil du stagiaire nigérien (2010), Monsieur Lagare ADAMOU. Accord avec l'association à but non lucratif « Epicentre » (Paris).
- **2011** : nous avons accueilli du 1^{er} octobre au 30 décembre 2011 un étudiant du **Burkina Faso**, Monsieur Joseph MAKAYA MAKUMBU.

6. TRAVAUX DE RECHERCHE EN LIEN DIRECT AVEC L'ACTIVITE DU CNR

6.1. RECHERCHES APPLIQUEES

- **Evaluation des réactifs de diagnostic** (publication n° 17)
- **Développement de réactifs de diagnostic par immunochromatographie et PCR temps réel.** Voir les détails chapitre 8.1.3. et page 65.
- **Evaluation des procédés virucides** (publication n°16)

Le CNR a été impliqué dans des projets de l'Agence Nationale de la Recherche (programme SPICECLEAN). Ces travaux ont permis d'approfondir nos connaissances sur la survie des norovirus dans leur environnement. Le norovirus murin ou MNV a été utilisé comme substitut des norovirus humains. Le MNV a ainsi permis d'étudier les effets de l'humidité, de l'activité de l'eau et de la température sur le pouvoir infectieux des norovirus. Dans des chambres dont l'atmosphère est contrôlée, nous avons pu ainsi établir qu'une hydrométrie très faible suffisait pour maintenir infectieux le norovirus pendant plus de trois mois. Ces informations sur le pouvoir infectieux des norovirus vont permettre une meilleure compréhension de l'aspect saisonnier des gastroentérites à norovirus où l'humidité relative comme la température pourraient jouer un rôle.

6.2. RECHERCHES EPIDEMIOLOGIQUES

6.2.1. Epidémiologie moléculaire des rotavirus (publication n° 3 et 4)

Nos résultats ont été présentés dans le chapitre 3.1 et pages 15 à 24.

6.2.2. Epidémiologie moléculaire des autres virus entériques

Nos résultats ont été présentés dans les chapitres 3.2, 3.3 et 3.4 et pages 26 à 43. Ils ont également fait l'objet des publications n° 7, 10, 11, 14, 15 et 18 ; communication n°7.

Cette partie de nos travaux concerne des études épidémiologiques à partir de nos résultats de surveillance en France ou en Europe en collaboration avec nos collègues des réseaux européens (publications 1, 2, 6, 12, 14 et 18) et dans les pays du continent Africain (publications n° 7, 10, 11 et 15).

6.2.3. Diarrhées chroniques chez les immunodéprimés

Nos résultats sont présentés dans les chapitres 2.2.3.2 page 12 et 3.5.4 page 43 et la partie concernant notre collaboration avec les services de l'hôpital Necker dans la publication n°9.

Ce travail sera poursuivi dans les années à venir.

6.2.4. Caractérisation des virus entériques animaux, épidémiologie moléculaire

Nous avons poursuivi nos travaux sur l'épidémiologie des virus entériques chez les animaux afin de mieux définir le risque de transmission à l'homme de ces virus (publication n° 13). De même, nous avons cherché et caractérisé dans les selles animales de nouveaux virus. Nos résultats ont principalement porté sur les *Nebovirus* (publication n° 8).

Ces travaux se poursuivront durant les années à venir.

6.3. INTERACTIONS NOROVIRUS-RECEPTEUR

- Depuis 2002, les variants de norovirus GII.4 successifs ont circulé dans la population par cycle de 2-3 ans, ce qui suscite des interrogations quant au rôle de leurs ligands, les antigènes tissulaires de groupes sanguins (HBGA), dans leur évolution. L'analyse

de l'accroche de VLP de 6 variants isolés de 1987 à 2007 à leurs récepteurs montre que si tous ces variants peuvent s'accrocher sur les différents antigènes tissulaires de groupes sanguins, l'affinité de l'accroche est différente selon les variants et les sucres (figure 21 page 40). Deux variants récents ont pu également se lier aux sucres présents dans la salive des sujets non-sécréteurs Le(+). Ces résultats suggèrent que l'accélération évolutive des norovirus GII.4 pourrait être liée à une affinité accrue des variants pour les HBGA après 2002 (publication n° 5).

- Les recherches sur les interactions des norovirus avec leur cellule hôte se poursuivent. Les résultats ont d'ores et déjà permis d'avancer dans la compréhension des mécanismes de l'attachement des norovirus à la surface des cellules intestinales. Des résultats publiables sont envisageables pour l'année en cours.

6.4. MECANISMES DE LA REPONSE IMMUNE AU NIVEAU DIGESTIF

Nous avons analysé la distribution tissulaire et les propriétés d'adressage (« *homing* ») des cellules sécrétant des immunoglobulines de type A (*IgA antibody-secreting cells*, IgA ASC) induites par immunisation intra-rectale (i.r.), en comparaison avec celles induites par d'autres voies d'immunisation muqueuse. Nous avons montré que les IgA ASC présentent au niveau des ganglions lymphatiques mésentériques différents profils de récepteurs d'adressage selon que l'immunisation était orale ou rectale.

Les IgA ASC induites après immunisation intra-rectale ou orale expriment l'intégrine $\alpha_4\beta_7$ qui leur permet de se localiser au niveau du colon et du grêle, mais pas celle induites après immunisation intra-nasale. Nous avons montré qu'en fait cette distribution résultait d'une compétition entre les lymphocytes.

Ces résultats sont présentés dans la publication n° 19)

7. PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

7.1. PUBLICATIONS NATIONALES

1. **Pothier P.** Les virus des gastro-entérites en France et en Europe. **Bull Acad Natl Med.** 2010; 194: 1427-1438.

Sous presse

2. Lorrot M, Doit C, Dugué S, **Pothier P.** *Infections nosocomiales virales digestives en pédiatrie.* **Med Ther Pediatr.**

7.2. PUBLICATIONS INTERNATIONALES (2011)

3. **de Rougemont A, Kaplon J,** Pillet S, Mory O, Gagneur A, Minoui-Tran A, Meritet JF, Mollat C, Lorrot M, Foulongne V, Gillet Y, Nguyen-Bourgain C, Alain S, Agius G, Lazrek M, Colimon R, Fontana C, Gendrel D, **Pothier P;** the French Rotavirus Network. Molecular and Clinical Characterization of Rotavirus From Diarrheal Infants Admitted to Pediatric Emergency Units in France. **Pediatr Infect Dis J.** 2011 ; 30 : 118-24.
4. Lorrot M, **Bon F,** El Hajje MJ, Aho S, Wolfer M, **Giraudon H, Kaplon J,** Marc E, Raymond J, Lebon P, **Pothier P,** Gendrel D. Epidemiology and clinical features of gastroenteritis in hospitalised children: prospective survey during a 2-year period in a Parisian hospital, France. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** 2011 ; 30 : 361-368.
5. **de Rougemont A,** Ruvoen-Clouet N, Simon B, Estienney M, Elie-Caille C, Aho S, **Pothier P,** Le Pendu J, Boireau W, **Belliot G.** Qualitative and quantitative analysis of the binding of GII.4 norovirus variants onto human blood group antigens. **J Virol.** 2011 ; 85 : 4057-70.
6. Verhoef L, Kouyos RD, Vennema H, Kroneman A, Siebenga J, van Pelt W, Koopmans M; Foodborne Viruses in Europe Network. An integrated approach to identifying international foodborne norovirus outbreaks. **Emerg Infect Dis.** 2011; 17: 412-8. (**participation à un réseau européen/ participation in a European network**)
7. **Sdiri-Loulizi K, Hassine M,** Gharbi-Khelifi H, Aouni Z, Chouchane S, Sakly N, Neji-Guédiche M, **Pothier P,** Ambert-Balay K, Aouni M. Molecular detection of genogroup I sapovirus in Tunisian children suffering from acute gastroenteritis. **Virus Genes.** 2011; 43: 6-12.
8. **Kaplon J,** Guenau E, Asdrubal P, **Pothier P, Ambert-Balay K.** Detection of a new genotype of nebovirus during an epidemiological study on caliciviruses in French cattle. **Emerging Infectious Diseases.** 2011; 17: 1120-1123.
9. Roos-Weil D, **Ambert-Balay K,** Lanternier F, Mamzer-Bruneel MF, Nochy D, **Pothier P,** Avettand-Fenoel V, Anglicheau D, Snanoudj R, Bererhi L, Thervet E, Lecuit M, Legendre C, Lortholary O, Zuber J. Impact of Norovirus/Sapovirus-related chronic diarrhea in renal transplant recipients. **Transplantation** 2011; 92: 61-69.
10. **Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K,** Gharbi-Khelifi H, **Hassine M,** Chouchane S, Sakly N, Neji-Guédiche M, **Pothier P,** Aouni M. Molecular epidemiology and clinical characterization of group A rotavirus infections in Tunisian children with acute gastroenteritis. **Can J Microbiol.** 2011; 57: 810-819.
11. **Hassine-Zafrane M, Sdiri-Loulizi K,** Ben Salem I, Kaplon J, Ayouni S, Ambert-Balay K, Sakly N, **Pothier P,** Aouni M. The molecular epidemiology of circulating rotaviruses: three-year surveillance in the region of Monastir, Tunisia. **BMC Infect Dis.** 2011; 11: 266-271.
12. Verhoef L, Williams KP, Kroneman A, Sobral B, van Pelt W, Koopmans M; FBVE network. Selection of a phylogenetically informative region of the norovirus genome for outbreak linkage. **Virus Genes ;** 2012; 44: 8-18. (**participation à un réseau européen/ participation in a European network**)
13. Midgley SE, Bányai K, Buesa J, Halaihel N, Hjulsager CK, Jakab F, **Kaplon J,** Larsen LE, Monini M, Poljšak-Prijatelj M, **Pothier P,** Ruggeri FM, Steyer A, Koopmans M, Böttiger B. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. **Vet Microbiol.** 2012; 156: 238-245.
14. Thouillot F, Delhostal C, Edel C, Bettinger A, **Pothier P, Ambert-Balay K,** Meffre C, Alsibai S. Gastroenteritis outbreaks in elderly homes in the east of France during winter 2009/10: aetiology research for a series of 37 outbreaks. **Euro Surveill.** 2012 Mar 1;17(9). pii: 20103.

15. Hassine-Zaafraane M, **Kaplon J, Sdiri-Loulizi K**, Aouni Z, **Pothier P**, Aouni M, **Ambert-Balay K**. Molecular prevalence of bovine Noroviruses and Neboviruses detected in central-eastern of Tunisia. **Arch Virol**. Sous presse.

Soumis à publication

16. **Belliot G**, Loutreul J, **Estienney M**, Cazeaux C, Nicorescu I, Aho S, Gervais P, **Pothier P**, Morin T. Use of broad spectrum pulsed-light to inactivate enteric viruses. Soumis pour publication.
17. Evaluation of 4 immunochromatographic tests for rapid detection of norovirus in faecal samples. **Ambert-Balay K, Pothier P**. Soumis pour publication.
18. Reuter G, Baas D, **Ambert-Balay K**, Kroneman A, Vennema H, Boros Á, Pankovics P, Böttiger B, **Pothier P**, Roivainen M, Maunula L, Hoehne M, Thorhagen M, Hedlund K-O, Fernandez-Jimenez M, Buesa J, Denayer S, Botteldoorn N, Koopmans M. Emerging and epidemic spread of a novel recombinant norovirus with two capsid types (GII.g/GII.1 and GII.g/GII.12) in Europe. Soumis pour publication.
19. **Agnello D, Denimal D, Lavaux A, Blondeau-Germe L**, Craig G, **Pothier P**. Antigen-specific immunoglobulin A (IgA)-secreting cells induced by intrarectal immunization express the integrin $\alpha 4\beta 7$ and migrate into intestinal lamina propria in absence of CCL25 responsiveness. Soumis pour publication.

7.3. COMMUNICATIONS NATIONALES

1. **de Rougemont A, Kaplon J**, Pillet S, Legrand-Quillien MC, Minoui-Tran A, Meritet JF, Lebon P, Mollat C, Coste-Burel M, Lorrot M, Bingen E, Foulongne V, Lina B, Garbag-Chenon A, Alain S, Agius G, Lazrek M, Hober D, Colimon R, Vabret A, **Frémy C**, Gendrel D, **Pothier P**. Bilan de cinq ans de surveillance épidémiologique et moléculaire des gastroentérites aiguës à rotavirus chez l'enfant en France, 2006-2011. . 31^e RICAI, Paris, France. 1-2 décembre 2011.
2. Loutreul J, **Estienney M**, Cazeaux C, **Pothier P, Belliot G**, Morin T. Impact de la lumière pulsée sur le Virus de l'Hépatite A (VHA) et le bactériophage à ARN-F spécifique MS2. Journées Francophones de Virologie. Paris, 29 et 30 mars 2012.
3. **Sdiri-Loulizi K, Ambert-Balay K**, Ayouni S, **Pothier P**, Aouni M. Etude épidémiologique, présentation clinique et typage moléculaire des infections à calicivirus humains chez les enfants atteints de gastro-entérites en Tunisie. Journées Francophones de Virologie. Paris, 29-30 mars 2012.

7.4. COMMUNICATIONS INTERNATIONALES

4. **de Rougemont A, Kaplon J, Fremy C, Pothier P**, and the French rotavirus network. Molecular and clinical characterization of rotavirus from diarrheal infants admitted to pediatric emergency units in France, 2006-2010. Fourth European Rotavirus Biology Meeting. Reggio Calabria, **Italy**, 2 - 5 October, 2011.
5. **Kaplon J, Fremy C**, Bernard S, Rehby L, **Pothier P, Ambert-Balay K**. Surveillance of group A rotavirus genotypes circulating under vaccination pressure in French cattle. Fourth European Rotavirus Biology Meeting. Reggio Calabria, Italy, 2 - 5 October, 2011.
6. **Agnello D, Lavaux A, Pothier P**. Intrarectal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles as a model to investigate lymphocyte homing to mucosal surfaces. Fourth European Rotavirus Biology Meeting. Reggio Calabria, **Italy**, 2 - 5 October, 2011.
7. Page AL, Jusot V, Mamaty AA, Adamou L, **Kaplon J, Pothier P**, Djibo A, Laouali Manzo M, Toure B, Langendorf C, Collard JM, Grais RF. "Burden and epidemiology of rotavirus diarrhea: results of a prevalence study in Niger", journée scientifique MSF-UK, 1er juillet 2011, **Londres**, Royaume-Uni. et 60th annual meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 4-8 décembre 2011, Philadelphie, **Etats-Unis**
8. **de Rougemont. A, Kaplon J**, Pillet S, Mory O, Gagneur A, Payan C, Meritet J-f, Mollat C, Coste-Burel M, Lorrot M, Bingen E, Foulongne V, Rodiere M, Gillet Y, Lina B, Parez N, Garbag-Chenon A, Languépin J, Alain S, Agius G, Oriot D, Dubos F, Hober D, Colimon R, Vabret A, Freymuth F, Huet F, Aho S, **Frémy C**, Gendrel D, **Pothier P**, and the French Rotavirus Network Molecular and clinical characterization of rotavirus acute gastroenteritis in French infants over 5 epidemic seasons, 2006-2011. 30th Annual Meeting of the European Symposium of Paediatric Infectious Diseases, ESPID 2012, 8-12 May, Thessaloniki, Greece

7.5. CONFERENCES SUR INVITATIONS

1. Les virus des Gastro-entérites virales en France et en Europe. Séance thématique de l'**Académie de Médecine, 9 novembre 2010, Paris, France.**
2. Diversités des norovirus. Infectiologie et Pédiatrie Générale, Diarrhées virales, **Hôpital Necker, 15 mars 2011, Paris, France.**
3. Risque viral digestif. Congrès national de la Société Française d'Hygiène Hospitalière. **8 juin 2012, Lille, France**

7.6. CONTRATS DE RECHERCHE EN COURS ET LIES AUX ACTIVITES DU CNR

1. *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.*
2. *Contrats européens : EuroRotaNet: Contrat Health Protection Agency : épidémiologie des rotavirus en Europe.*
3. *Contrat ANR-PRNA : SPICECLEAN, 2008-2011. Evaluation de l'efficacité microbicide et du bénéfice 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*
4. *Partenariat Hubert Curien, programme Gundishapur Franco-Iranien : 2007-2011.*
5. *Contrat d'étude Sanofi-Pasteur-MSD : épidémiologie des rotavirus en France (2006-2012).*

8. PROGRAMME D'ACTIVITE 2012 ET 2013

8.1. EN TERMES D'EXPERTISE

8.1.1. Participation aux réseaux européens et mondiaux (FBVE et NoroNet, EuroRotaNet)

Notre participation aux réseaux européens FBVE-Net et EuroRotaNet se poursuivra durant toute la période du contrat, c'est-à-dire au moins jusqu'en 2016. Il en est de même pour notre participation au réseau mondial « NoroNet ».

Ces participations nous donne l'accès à une base de données incomparable et la possibilité de comparer et évaluer nos protocoles et techniques.

8.1.2. Mise à disposition des protocoles de diagnostic et contrôles externes.

Les protocoles de diagnostic des virus entériques utilisés au CNR des virus entériques sont mis à la disposition des laboratoires souhaitant développer ces techniques *in situ*. Cette mise à disposition peut s'accompagner de la formation d'un technicien ou biologiste.

En collaboration avec l'AFSSAPS, nous envisageons pour les prochaines années la mise à disposition de contrôle de qualité externe pour les réactifs de diagnostic des rotavirus.

8.1.3. Développement et diffusion des méthodes de diagnostic des norovirus

Durant les années à venir, le diagnostic des norovirus se réalisera soit par des méthodes de biologie moléculaire soit par immunodiagnostic.

- **Les méthodes de biologie moléculaire :**

Les méthodes de biologie moléculaire sont plus adaptées aux laboratoires spécialisés en microbiologie. Pour répondre à leurs demandes de rationalisation des procédures et assurer la plus large diffusion de ces techniques dans les laboratoires de virologie, nous avons conclu un contrat de collaboration avec un industriel du diagnostic virologique pour la réalisation d'une méthode de PCR temps réel compatible avec celles utilisées pour d'autres virus. Cette nouvelle méthode sera mise au point dans notre laboratoire et sera commercialisée par l'industriel. Ce projet devrait atteindre ses premiers objectifs dans le courant de l'année 2012. Nous aurons ensuite à suivre ce réactif afin de l'adapter à l'évolution des norovirus.

- **Méthode d'analyse par immunochromatographie.**

Les méthodes d'analyse par immunochromatographie sont les plus adaptées aux laboratoires non spécialisés voire même à une utilisation « au lit du patient ». A ce jour, les tests disponibles ne donnent pas entière satisfaction quant à leur sensibilité.

A partir des pseudo-particules virales de différents génotypes de norovirus nous disposons d'une collection d'anticorps monoclonaux qui seront les réactifs de base pour la mise au point de méthodes en immunochromatographie.

Nous avons conclu un contrat de collaboration avec un industriel du diagnostic microbiologique pour l'élaboration de ce test. Ce réactif devrait être opérationnel pour 2012 ou 2013. Comme pour le précédent réactif, le CNR aura à suivre ce test afin de vérifier qu'il conserve ses performances vis-à-vis des nouvelles souches.

8.1.4. Diarrhées chroniques chez les transplantés

En collaboration avec les équipes de transplantation de l'hôpital Necker, nous avons montré l'importance de la surveillance des norovirus chez les immunodéprimés, notamment les

transplantés d'organes. Depuis, nous travaillons régulièrement avec plusieurs centres de transplantation. Notre objectif pour les années à venir est de collaborer avec tous les centres français de transplantations afin qu'ils puissent réaliser ces diagnostics, soit par des détections faites localement, soit en leur assurant ces diagnostics. **La caractérisation des génotypes pouvant être faite au CNR des virus entériques.**

Notre objectif est **d'initier un suivi épidémiologique** de ces infections afin d'en préciser l'importance, les particularités et les conséquences pour les patients. Notamment nous chercherons à déterminer si les conditions de restriction d'hôte liées aux antigènes des groupes sanguins ABO sont applicables à cette population d'immunodéprimés ou si la sensibilité déterminée par ce système antigénique influence la gravité ou la chronicité de la diarrhée. Notre second objectif est **d'accompagner les projets de recherche des cliniciens.**

8.2. CONTRIBUTION A LA SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE

8.2.1. Partenariat et collaborations (InVS, IFREMER, ANSES, CNR hépatites A et E):

InVS, délégations territoriales des ARS, CIRE,

IFREMER (Dr S LE GUYADER),

ANSES (Dr S PERELLE et B GASSILLOUD),

CNR des hépatites A et E (Pr AM ROQUE AFONSO et Pr J ISOPET).

Les précédentes années, nous avons étendu notre recrutement sur l'ensemble du territoire métropolitain et en Outre-mer. Aujourd'hui, le CNR des virus entériques est parfaitement connu de l'ensemble des CIRE, délégations territoriales des ARS ou des autres administrations locales.

8.2.2. Surveillance des gastroentérites à rotavirus

La vaccination contre les rotavirus concerne actuellement environ 8% de la population infantile. La prise en charge ou non de cette vaccination fait encore débat en France. Nous **poursuivons la surveillance épidémiologique des rotavirus en milieu pédiatrique en** collaboration avec les réseaux français et européen EuroRotaNet.

Nous surveillerons la circulation des génotypes « classiques » G1 à 4 et G9 et les variations de leur fréquence. Mais nous **surveillerons également les souches inhabituelles** qui représentent un risque d'émergence pour le futur. Pour mieux surveiller et comprendre ces phénomènes le risque de transmission de l'animal à l'homme, nous avons couplé à cette surveillance chez l'homme une surveillance chez les bovins. Pour cela, nous collaborons avec plusieurs laboratoires départementaux des services vétérinaires (Dijon / Côte d'Or ; Limoges / Haute-Vienne ; Niort / Deux-Sèvres et Rennes / Ile et Vilaine)

8.2.3. Investigations des cas groupés de gastroentérites

– La surveillance des souches de norovirus et l'étude de leur évolution est **un de nos objectifs prioritaire pour les années à venir.** Pour atteindre cet objectif, nous comptons sur le l'analyse des épidémies qui nous parviennent de l'ensemble du territoire grâce à nos collaborations avec les délégations territoriales des ARS et des CIRE. Le recrutement actuel nous permet d'avoir une vision représentative de la circulation des souches virales en France.

– Nous poursuivons notre étroite collaboration avec nos partenaires IFREMER, ANSES et CNR hépatites A et E pour toutes les investigations de cas groupés de gastroentérites lorsqu'une origine alimentaire ou hydrique est suspectée.

– Procédures d’investigation et bilans hebdomadaires

La transmission des données à l’InVS continuera d’être effectuée via la base de données partagée **Voozanoo**.

Les bilans hebdomadaires instaurés lors des précédentes années seront poursuivis.

– Logistique, transport des échantillons

Aujourd’hui, les échantillons nous sont adressés soit par l’intermédiaire d’un laboratoire de proximité soit directement par l’établissement concerné par l’épidémie de gastroentérites. Lorsque le laboratoire se charge du transport il utilise le plus souvent ses propres procédures. Le CNR des virus entériques de Dijon rembourse les frais de transport soit à l’établissement soit au laboratoire de proximité. Nous recherchons à intégrer notre **logistique de transport dans nos procédures élaborées dans le cadre de notre accréditation**.

8.3. CONTRIBUTION A L’ALERTE DE L’INVS

Les procédures d’alerte de l’InVS seront poursuivies.

L’InVS est informée d’une nouvelle épidémie selon une procédure formalisée. Cette procédure formalisée concerne également les épidémies d’origine alimentaire avérée qui nous parviendraient directement. L’InVS est également informée lors des réunions téléphoniques hebdomadaires.

Tout événement apparaissant anormal ou nécessitant une discussion avec les épidémiologistes est transmis à l’InVS via nos contacts.

Toute modification de la répartition des souches virales ou l’apparition de nouvelles souches est transmises à l’InVS soit via nos contacts lors des réunions hebdomadaires, soit immédiatement si l’importance de l’information le nécessite.

Les alertes européennes concernant les risques alimentaires sont diffusées par internet par le réseau FBVE-Net. L’InVS, ANSES et IFREMER sont informés de ces alertes en même temps et par les mêmes voies que le CNR des virus entériques.

8.4. ACTIVITE D’INFORMATION, FORMATION, CONSEIL

8.4.1. Site web

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

Il sera dans les années à venir un de nos moyens de communication les plus importants.

Lien web :

<http://www.chu-dijon.fr/page.php?url=directory/centre-national-de-referance-des-virus-enteriques%20>

Accessible à l’aide des moteurs de recherche – Google et autres - avec les mots clés

« CNR des virus entériques »

8.4.2. Activité de conseil

Le CNR des virus entériques répondra à la demande des autorités lorsque le sujet concernera son domaine de compétence.

Comme par le passé, le CNR des virus entériques apportera son aide ou ses conseils aux établissements publics, aux établissements de soins ou d’hébergement (publics ou privés), aux administrations qui lui en feraient la demande.

Sous certaines conditions, nos conseils peuvent être dispensés aux entreprises privées.

8.4.3. Activité de formation

L'activité de formation se fera essentiellement par l'accueil et l'encadrement de stagiaires. Une formation par séminaire, enseignement postuniversitaire, publications didactiques est également envisagée.

8.4.4. Colloques et réunions scientifiques

Nous participerons régulièrement aux diverses réunions scientifiques organisées par les cliniciens, pédiatres et hygiénistes.