

## Restitution projet OXYVIR 2

Contrôle du danger à norovirus dans les  
coquillages bivalves et leur environnement

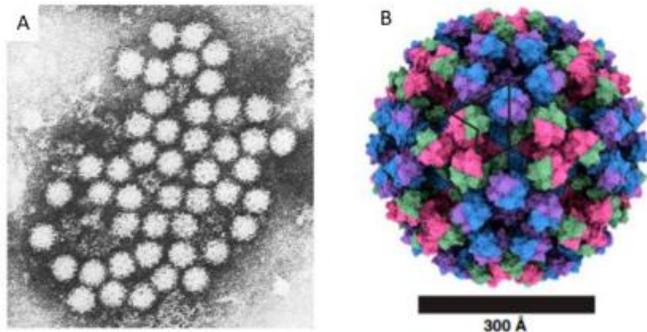
N. Boudaud (PhD-HDR, Actalia) et C. Gantzer (Pr, LCPME)

**27 mars 2023**

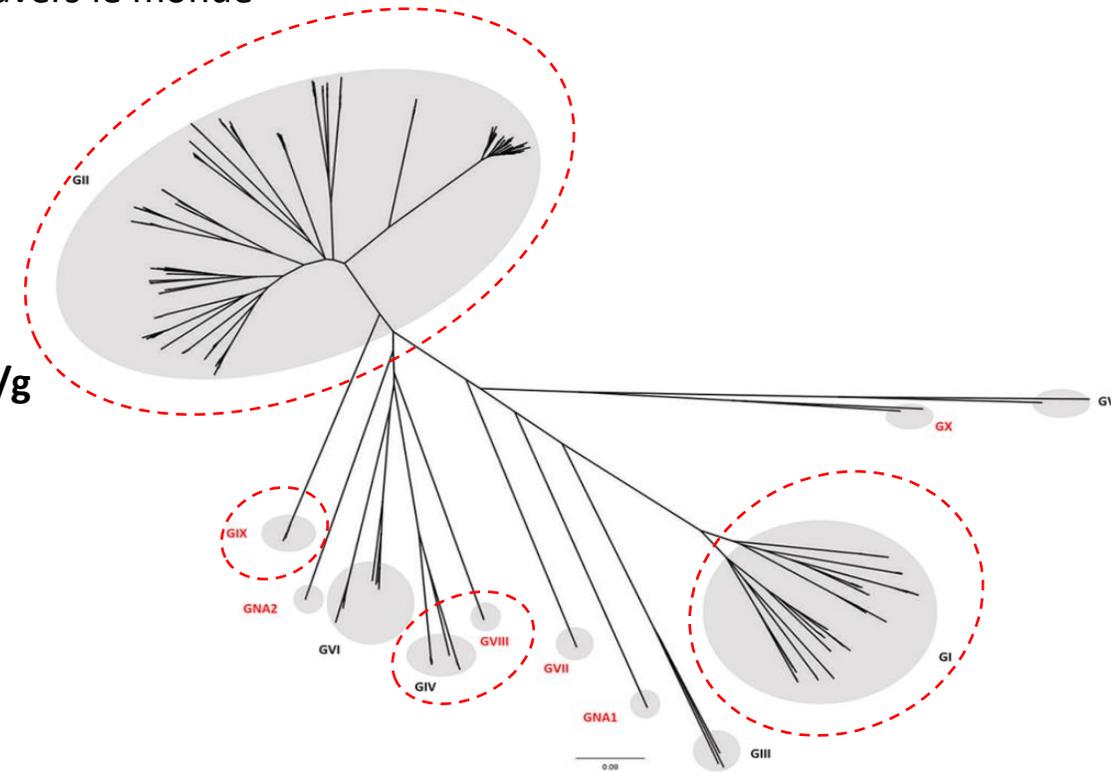
Conseil de Filière Coquillages 2023 (Nantes)

# Les norovirus : classification et importance

- **Norovirus humains (NoV)** : ~ 20% de toutes les gastro-entérites aiguës à travers le monde
- Réplication des NoV uniquement chez l'Homme pour certains génogroupes
- Particule icosaédrique (~ **40 nm**) ayant un génome à **ARN** (~ 7,5 kb)
- $DI_{50}$  faible : ~**10-100 particules** par analogie à d'autres virus entériques
- Excrétion dans l'environnement (selles, vomissures) : ~  **$10^6$  à  $10^9$  particules/g**
- **Virus nus** : plus résistants que les virus enveloppés dans l'environnement

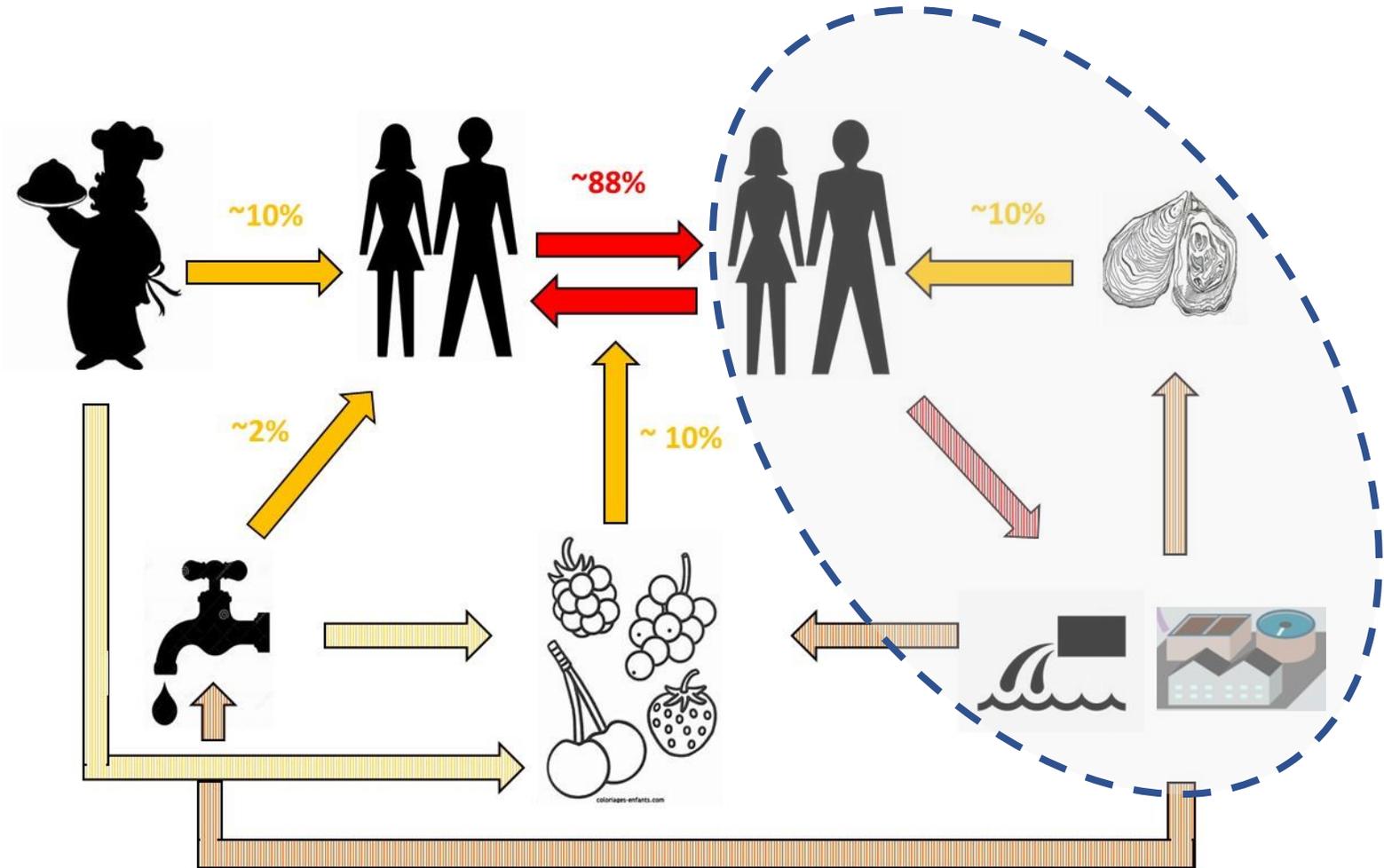


**Figure 1.** Electron microscopy images of Noroviruses. (A). Original image of small round structured viruses, visualized by Kapikian in stool samples from acute gastroenteritis cases, by immune electron microscopy [7]. (B). High resolution cryo-electron microscopy of a GII.4 Norovirus particle [9].



Classification phylogénétique des NoV

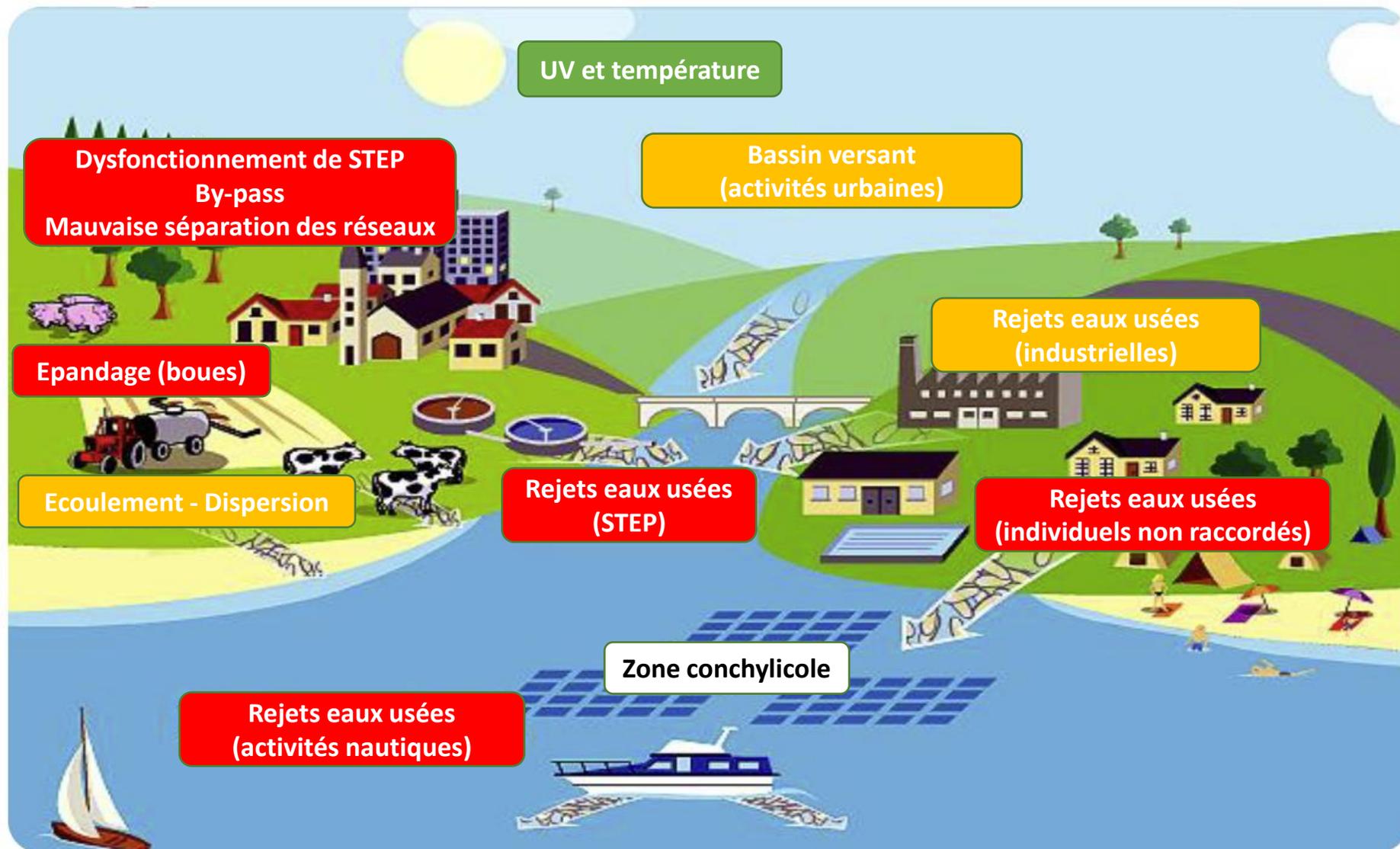
# Cycle de transmission des NoV



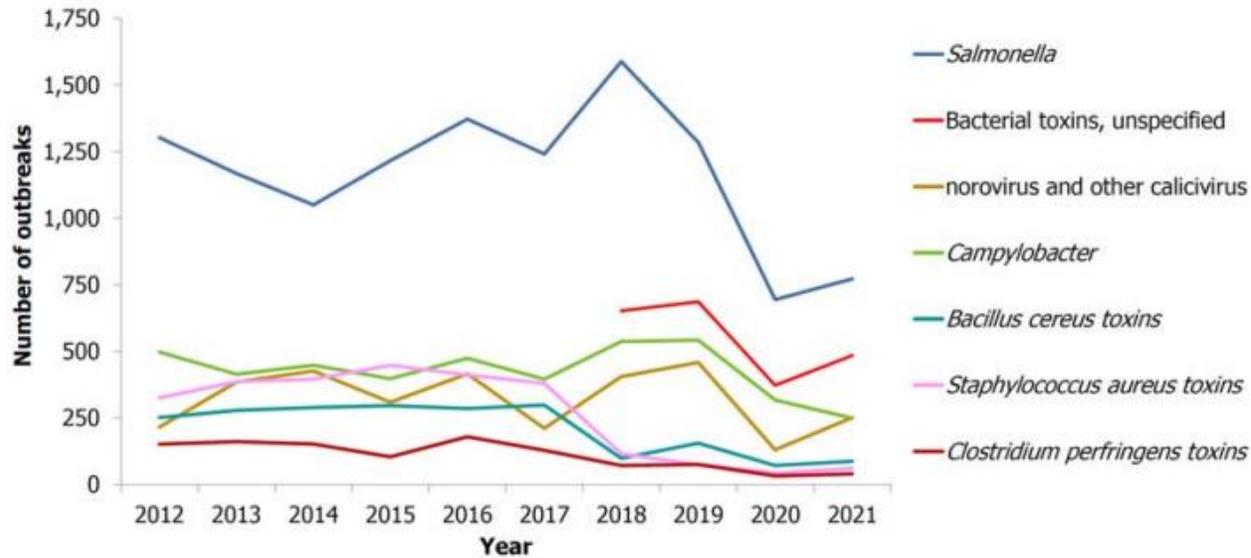
Transmission par voie féco-orale (directe ou indirecte) des NoV à l'Homme

(inspiré de Kroneman et al., 2008)

# Voies de contamination et d'inactivation des NoV en zone côtière



# Epidémies alimentaires à NoV en Europe



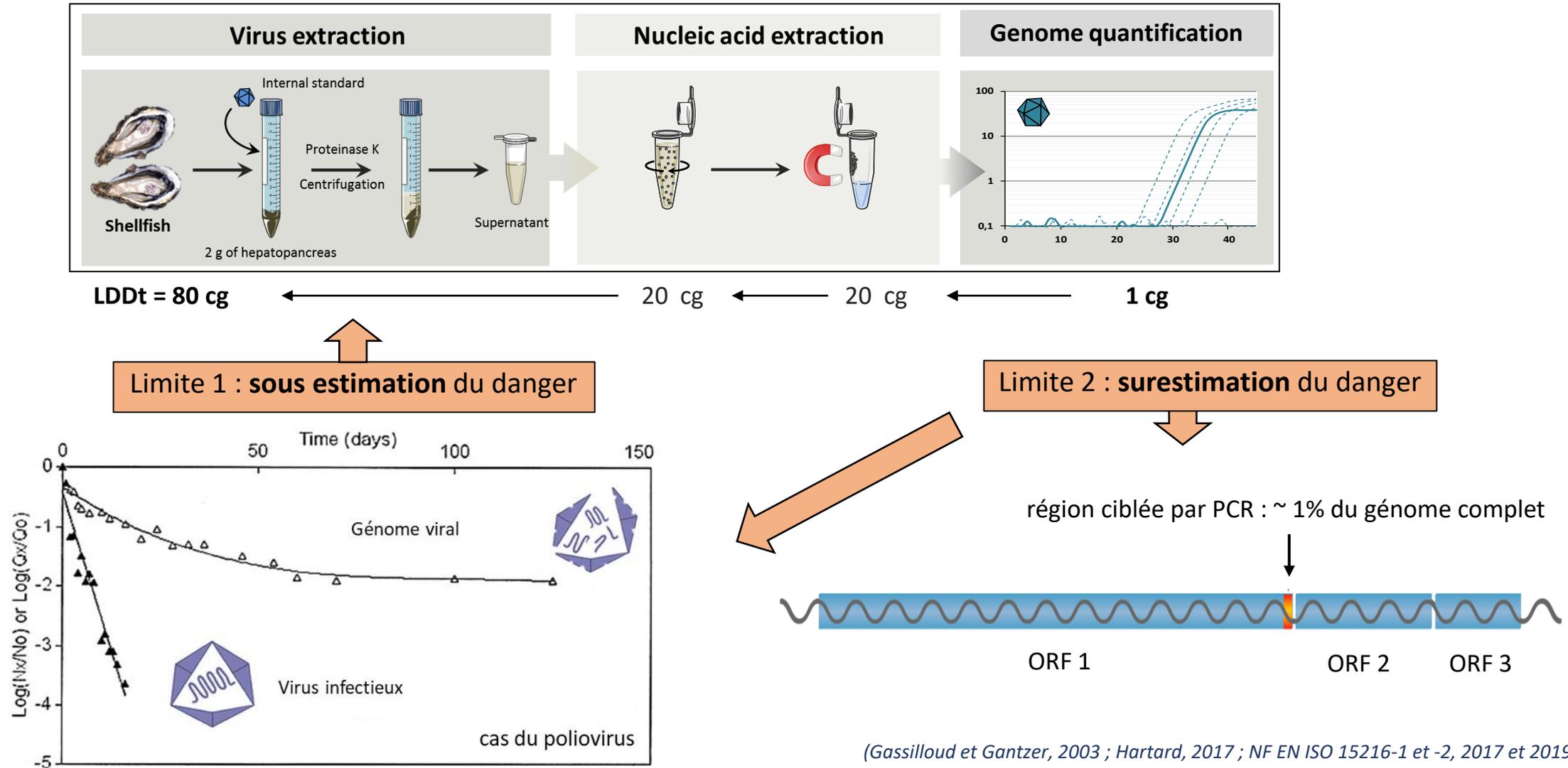
**Table 67:** Top 10 pathogen/food vehicle pairs causing the highest number of strong-evidence outbreaks in reporting EU MS, 2020

2020					2010-2019 <sup>(b)</sup>		
Rank <sup>(a)</sup>	Causative agent	Food vehicle	Outbreaks (N)	Reporting MS (N outbreaks)	Rank <sup>(a)</sup>	Outbreaks (N/year) (range)	Reporting MS (N/year)
1	<i>Salmonella</i>	Eggs and egg products <sup>(d)</sup>	37	France (15), Poland (15), Spain (5) Italy (1), Slovakia (1)	1	104.5 (77-141)	10.0
2	Norovirus and other calicivirus	Crustaceans, shellfish, molluscs and products thereof <sup>(e)</sup>	28	France (16), Sweden (9), Denmark (2), Spain (1)	2	36.2 (8-144)	6.1
3	Histamine/scombrototoxin	Fish and fish products	14	Sweden (7), France (4), Germany (2), Belgium (1)	3	31.5 (14-55)	6.9
4	<i>Salmonella</i>	Pig meat and products thereof <sup>(f)</sup>	11	France (4), Italy (3), Poland (1), Hungary (1), Belgium (1), Croatia (1)	6	18.9 (9-28)	7.3
5	<i>Salmonella</i>	Bakery products <sup>(g)</sup>	9	Poland (9)	4	25.7 (5-45)	4.5
6	<i>Clostridium perfringens</i> toxins	Mixed food <sup>(h)</sup>	8	France (2), Denmark (2), Finland (1), Germany (1), Italy (1), Portugal (1)	13	10.3 (3-23)	4.5
7	<i>Bacillus cereus</i> toxins	Mixed food <sup>(i)</sup>	6	France (2), Belgium (1), Germany (1), Poland (1), Spain (1)	12	10.9 (7-16)	4.7
7	<i>Listeria monocytogenes</i>	Fish and fish products <sup>(j)</sup>	6	Netherlands (2), Denmark (2), Germany (1), Austria (1)	135	0.5 (0-2)	0.4
8	Flavivirus including Tick-borne encephalitis virus	Milk <sup>(k)</sup>	5	Slovakia (4), Austria (1)	65	1.7 (0-3)	1.2
8	Norovirus and other calicivirus	Mixed food <sup>(l)</sup>	5	Denmark (3), Finland (2)	7	14.6 (3-9)	6.3

- ~150 à 500 épidémies alimentaires à NoV chaque année depuis 2012 (~ 4% à 20% du total des épidémies)
- Fréquence des épidémies : 2<sup>ème</sup> position du couple « NoV + coquillages bivalves »

## Contexte normatif : avantages et limites

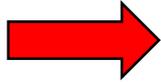
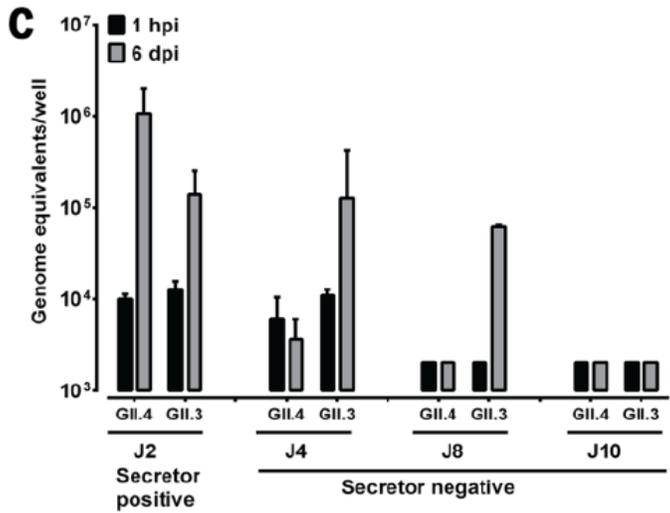
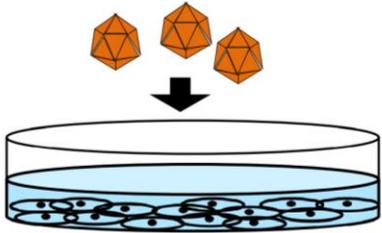
- Norme ISO 15216 : détection / quantification du génome NoV dans les coquillages bivalves
- Prévalence NoV : 34,5% sur zone de production (n= 2 180) ; 10,8% en centre d'expédition (n= 2 129)



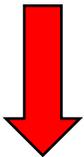
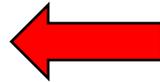
# Approches actuelles pour détecter les NoV infectieux

2016

Réplication *in vitro* (entéroïdes)



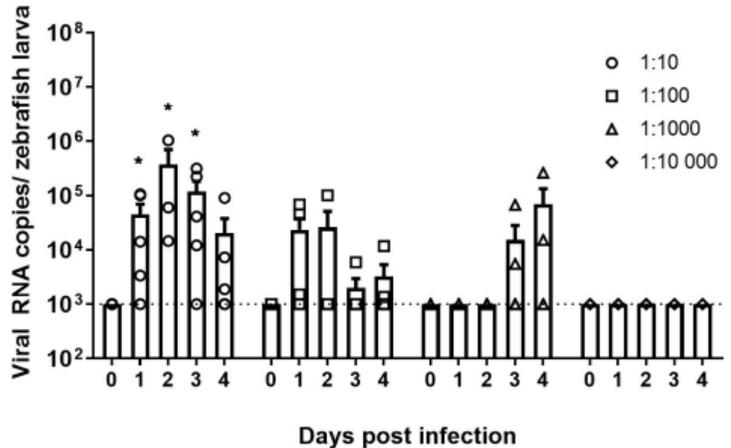
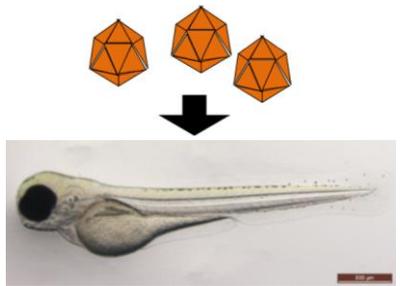
Complexe  
Peu sensible et spécifique  
Qualitative



Non adaptées aux aliments en routine

2019

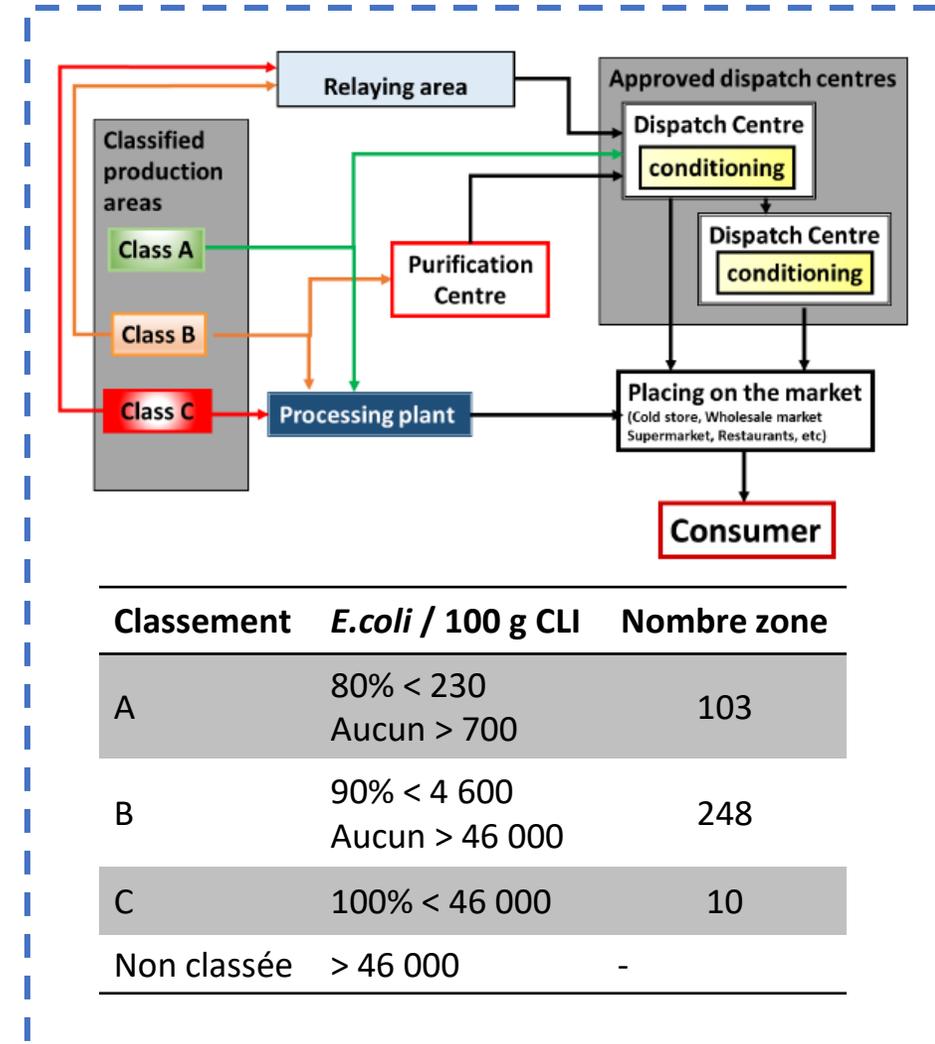
Réplication *in vivo* (*Danio rerio*)



(Ettayebi et al., 2016 et 2019 ; Van Dycke et al., 2019 et 2021)

# Contexte réglementaire en Europe

- Règlements UE 2015/2285 et CE 854/2004 : classement des zones
- Aucun critère réglementaire à ce jour pour les NoV dans les coquillages
- Instruction technique DGAL « NoV – coquillages » depuis 2013
  - Si épidémie alimentaire + contamination de la zone => fermeture +/- 28 jours
- Discussions européennes : évolution du règlement 853/2004 (2023)
  - Intégration des NoV dans les PMS
  - Etudes sanitaires de zones conchylicoles / surveillance



(Commission Européenne, 2015 ; DGAL, 2022 ; ESFA, 2016 ; Parlement Européen, 2004)

Ordre de méthode

Direction générale de l'alimentation  
 Service de l'alimentation  
 Sous-direction de la sécurité sanitaire des aliments  
 Bureau des produits de la mer et d'eau douce  
 251 rue de Vaugirard  
 75 732 PARIS CEDEX 15  
 0149554955

Instruction technique  
 DGAL/SDSSA/2021-990  
 28/12/2021

Date de mise en application : Immédiate  
 Diffusion : Tout public

Cette instruction abroge :  
 DGAL/SDSSA/2020-785 du 18/12/2020 : Gestion du risque norovirus en lien avec la consommation de coquillages (mise à jour de l'instruction DGAL/SDSSA/2019-855 du 25/12/2019)

30.4.2004 FR Journal officiel de l'Union européenne L 139/55

**RÈGLEMENT (CE) N°853/2004**  
**DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL**  
 du 29 avril 2004

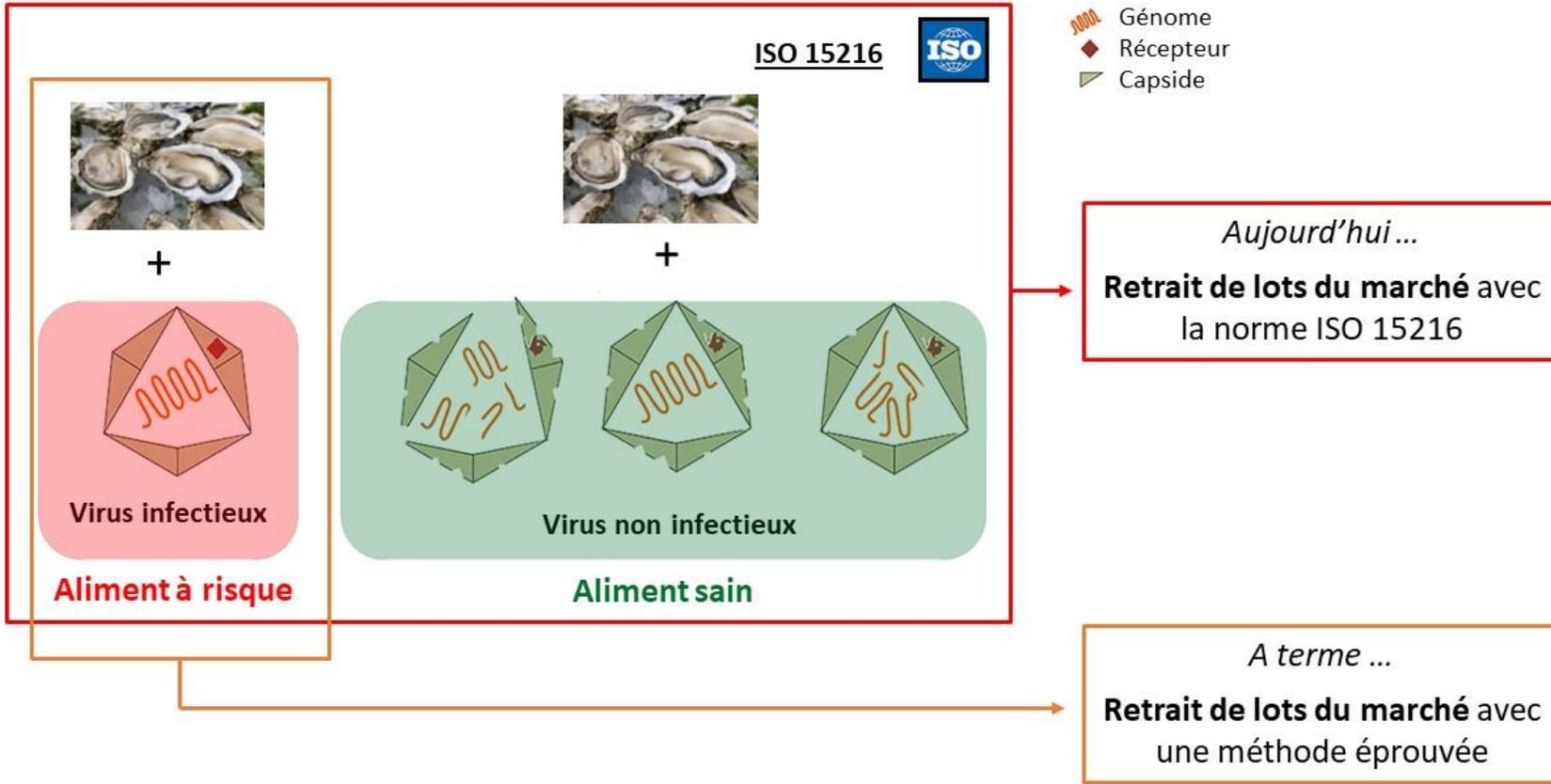
fixant des règles spécifiques d'hygiène applicables aux denrées alimentaires d'origine animale

L 139/206 FR Journal officiel de l'Union européenne 30.4.2004

**RÈGLEMENT (CE) N° 854/2004 DU PARLEMENT EUROPÉEN ET DU CONSEIL**  
 du 29 avril 2004

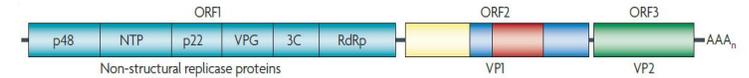
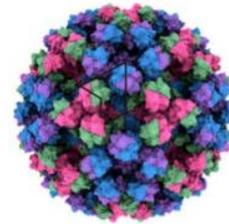
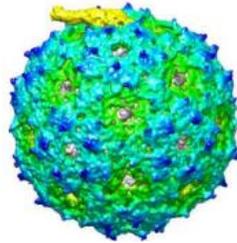
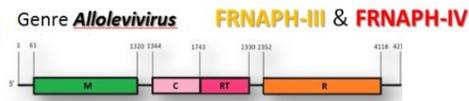
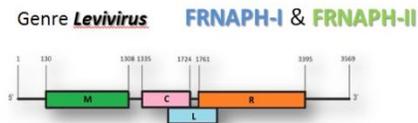
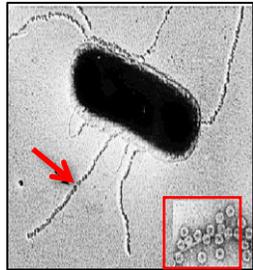
fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine

# Objectif du projet OXYVIR 2



(Boudaud et Gantzer, 2015)

# Discrimination des NoV infectieux et non infectieux : évaluation et validation d'un indicateur de nature virale



## Structure des bactériophages ARN F-spécifiques

~ 3,5 à 4,2 kb  
~ 30 nm  
90 dimères + protéine A2



## Structure des NoV

**Génome ARN à polarité +**  
**Virus nus**  
**capside icosaédrique**

~ 7,5 kb  
~ 40 nm  
90 dimères VP1 + quelques copies VP2

- A l'instar d'*E. coli*, application du **concept de Mossel (1983)** pour valider cet indicateur :
  1. « doit toujours être détecté lorsque le pathogène est présent »
  2. « peut être détecté en absence du pathogène »

Marker (index and indicator) organisms in food and drinking water.  
Semantics, ecology, taxonomy and enumeration

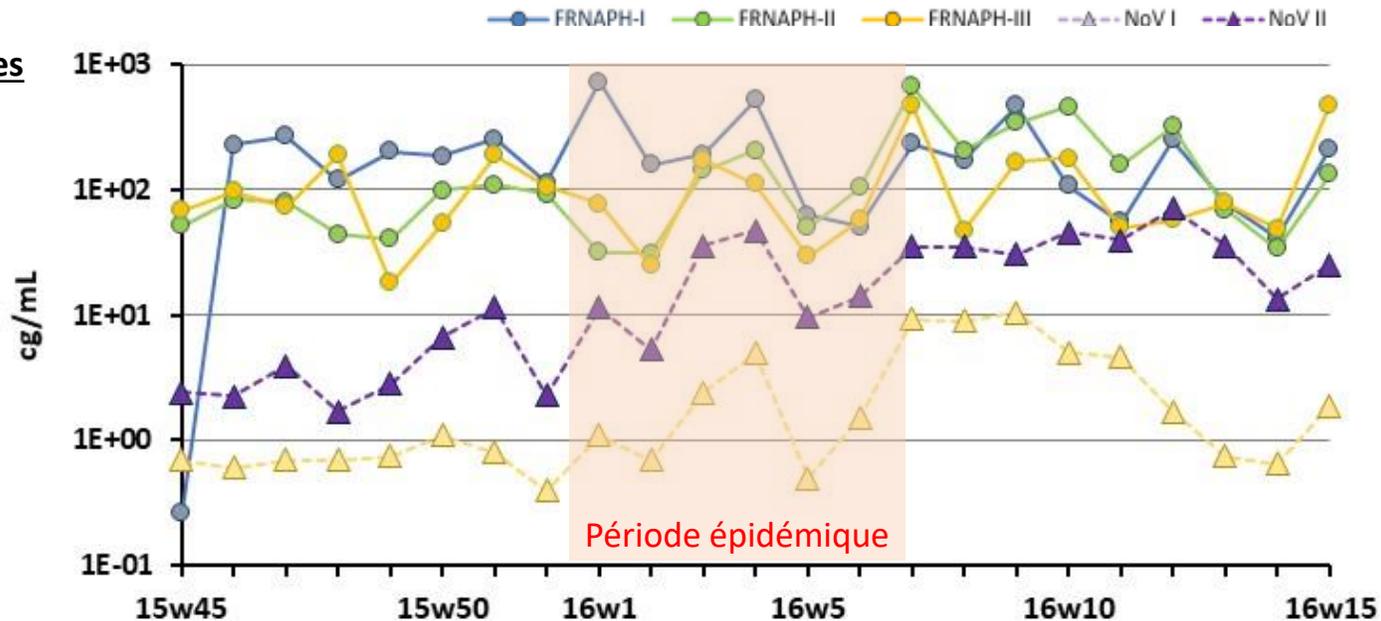
D. A. A. MOSSEL

# Caractéristiques des bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH)

## Indicateurs de pollution virale :

- Abondants dans les eaux usées brutes urbaines ( $\sim 10^{6-7}$  UFP/L), malgré une faible prévalence dans les selles humaines (< 26%)
- Survie dans l'environnement : FRNAPH-I > **FRNAPH-II** >> FRNAPH-III > FRNAPH-IV
- Origine plutôt humaine des **FRNAPH-II** et -III
- Inclus dans les **réglementations australienne** et **américaine** pour contrôler la qualité microbiologique des coquillages (seuil à 50 UFP/100 g CLI)
- Génomes **FRNAPH-II** ( $10^{7-8}$  copies/L) > **génomés NoV** ( $10^{4-7}$  copies/L) dans les **eaux usées brutes** urbaines

### Eaux usées traitées

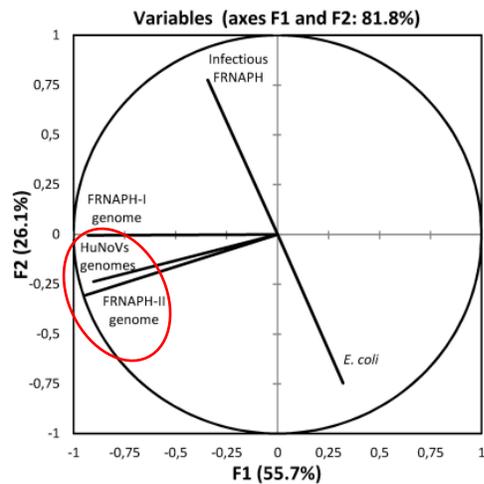


# Validation de l'indicateur OXYVIR : comparaison des génomes de FRNAPH-II et de NoV dans les huîtres

Dans le cadre d'études de prévalence

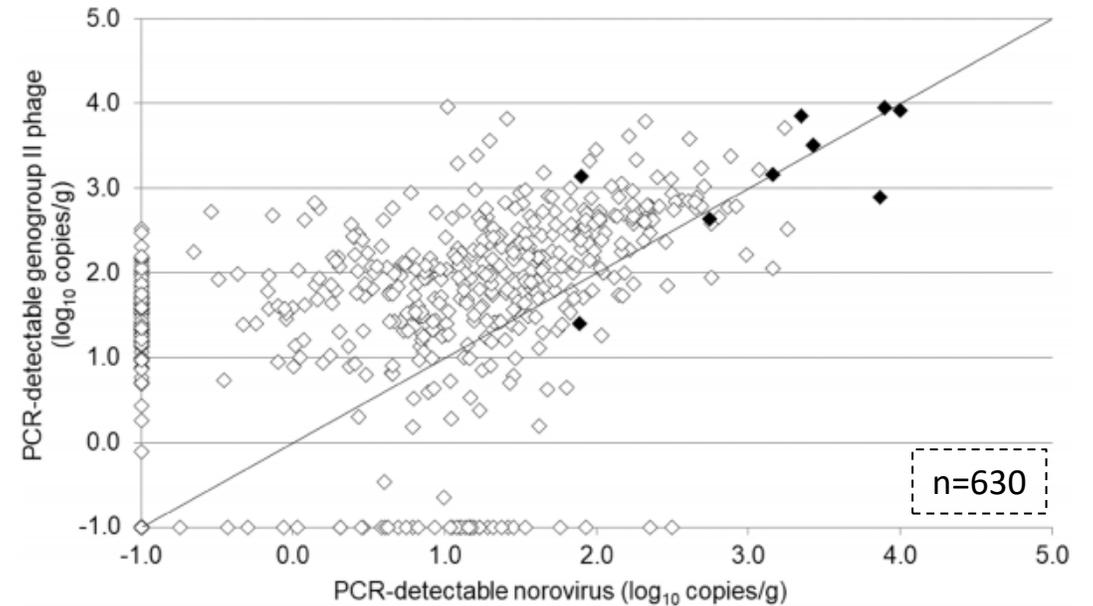
**TABLE 3** Contingency table for detection of FRNAPH-II and NoV GII genomes in oyster batches

FRNAPH-II genome detection	No. of samples with the following result for NoV GII genome detection:		
	-	+	++
-	49	9	1
+	11	13	7
++	5	7	9



n=111

FIG 4 Principal-component analysis of parameters targeted in shellfish collected from the local harvesting area.



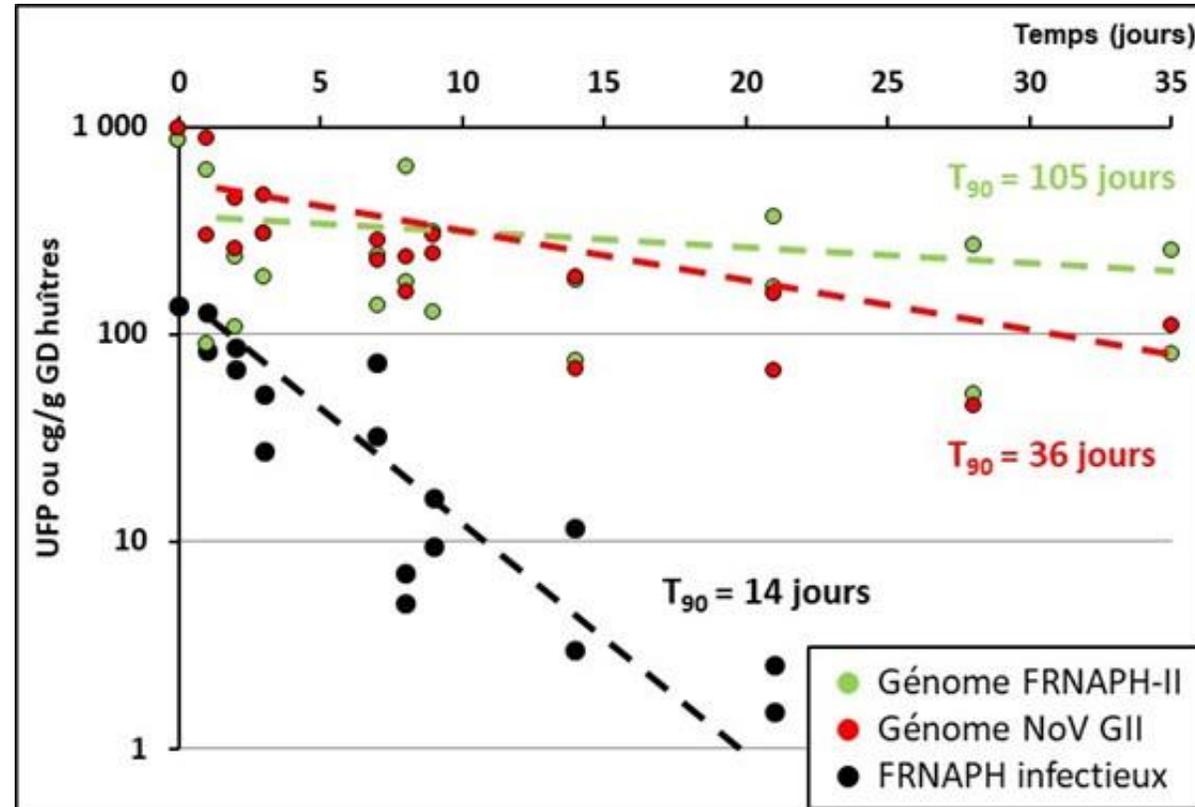
n=630

- Confirmé par le CEFAS (ex-EURL « NoV – coquillages ») et d'autres études

- **Corrélation significative** entre FRNAPH-II et NoV GII ( $p < 10^{-4}$ )

# Validation de l'indicateur OXYVIR : comparaison des NoV (génomme) et FRNAPH (infectieux et génomme) dans les huîtres

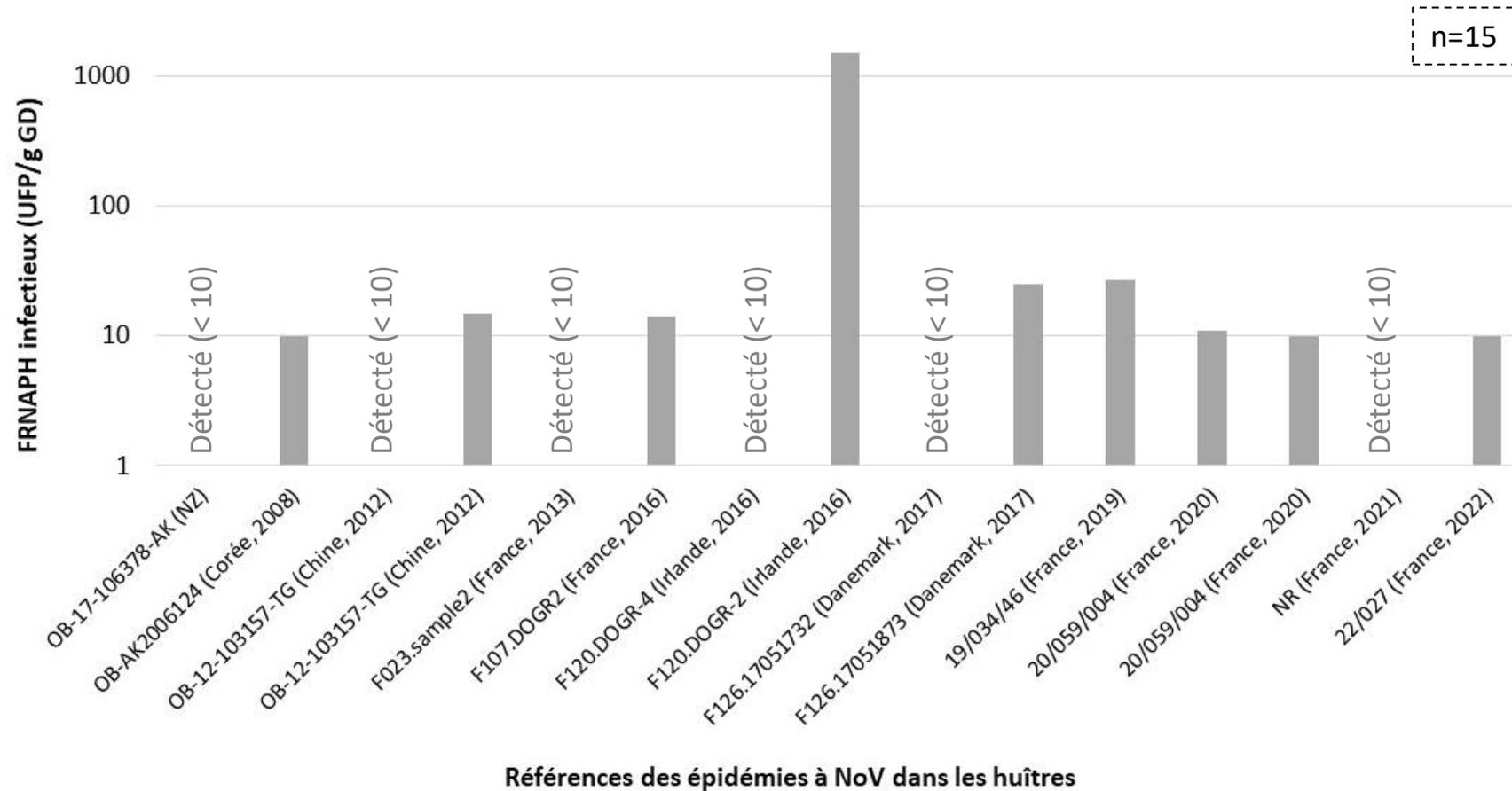
Dans le cadre de la **dépuration des huîtres à échelle industrielle**



n=6

- La détection du génome viral ne peut pas toujours prédire la présence de particules infectieuses pour un seul et même virus
- Résultats confirmés par d'autres études publiées

## Validation de l'indicateur OXYVIR : comparaison des FRNAPH infectieux et NoV infectieux dans les huîtres (TIAC)

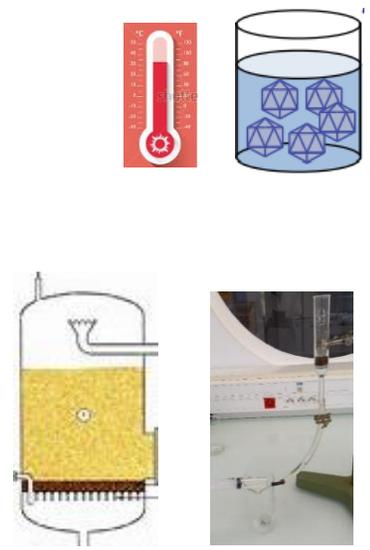


- Détection de FRNAPH infectieux dans **100%** des huîtres responsables de gastro-entérites à NoV

# Validation de l'indicateur OXYVIR : comparaison des FRNAPH et NoV infectieux à échelle laboratoire

10 à 20°C en solution PBS 150 mM (120 jours)

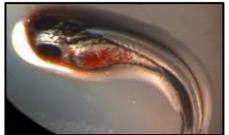
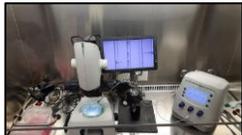
Eau à 20 et 35 g/L NaCl à 20°C (120 jours)



**Filtration sur sable** (eau à 35 g/L) :  
vitesse entre 5 et 56 m/h

**UV<sub>254nm</sub> statique** (eau à 35 g/L) :  
6 doses entre 0 et 60 mJ/cm<sup>2</sup>

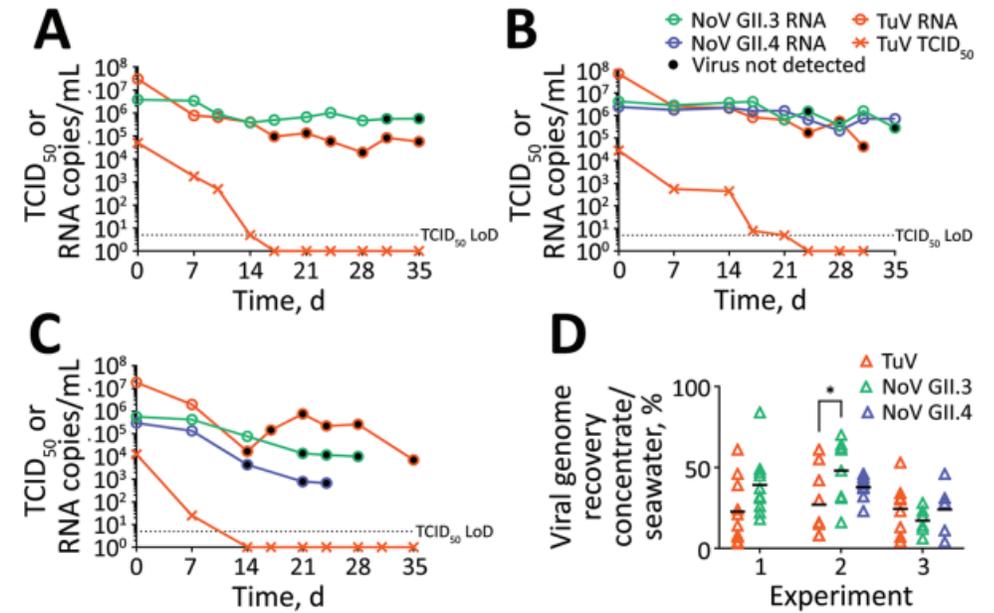
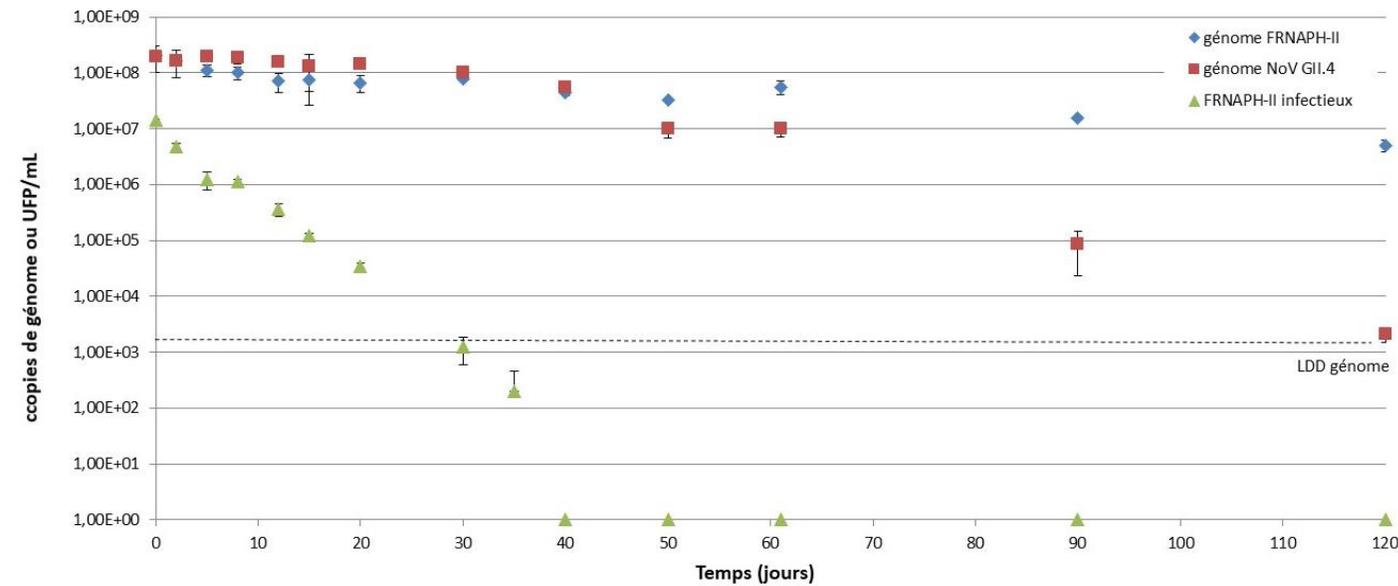
**Validation de l'indicateur si survie FRNAPH infectieux ≥ NoV infectieux**



# Survie des FRNAPH et NoV infectieux à échelle laboratoire

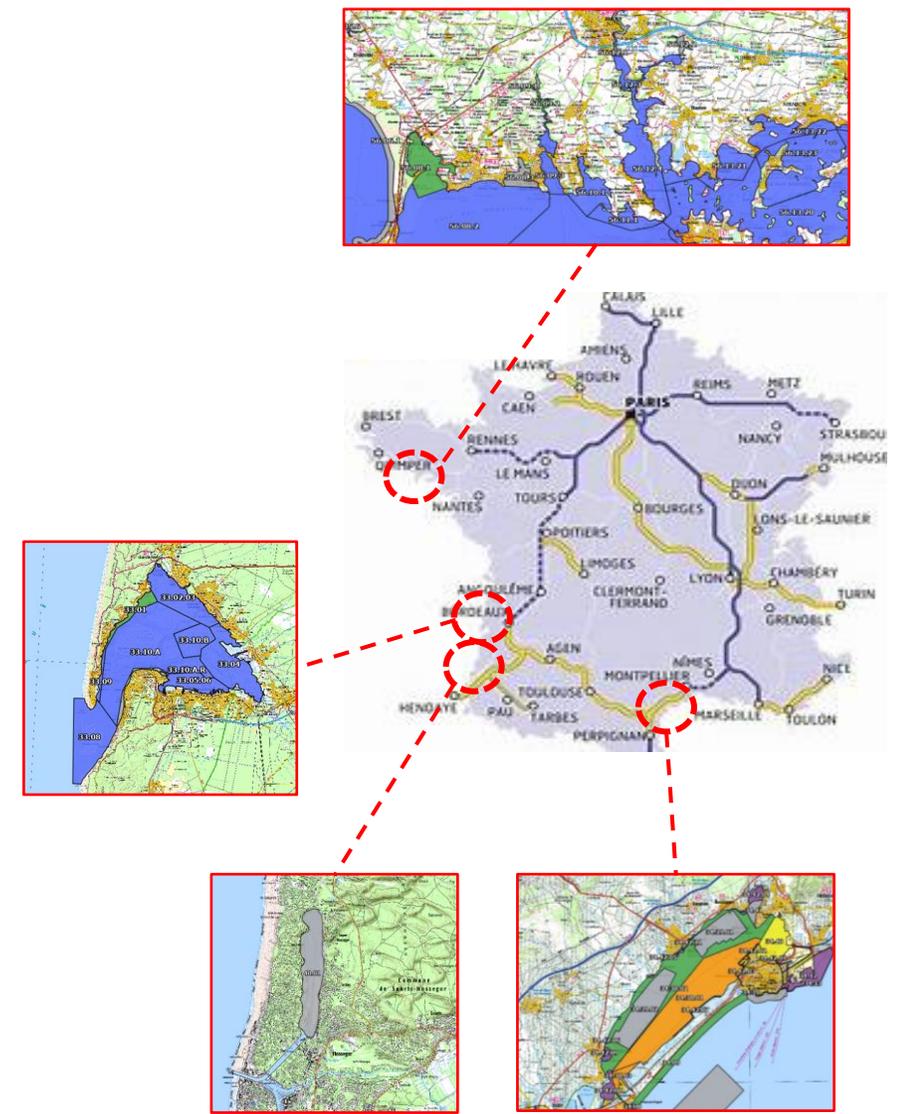
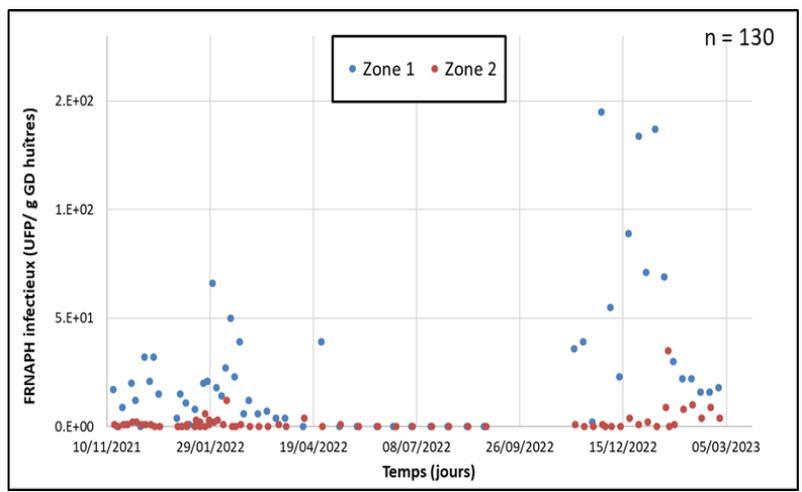
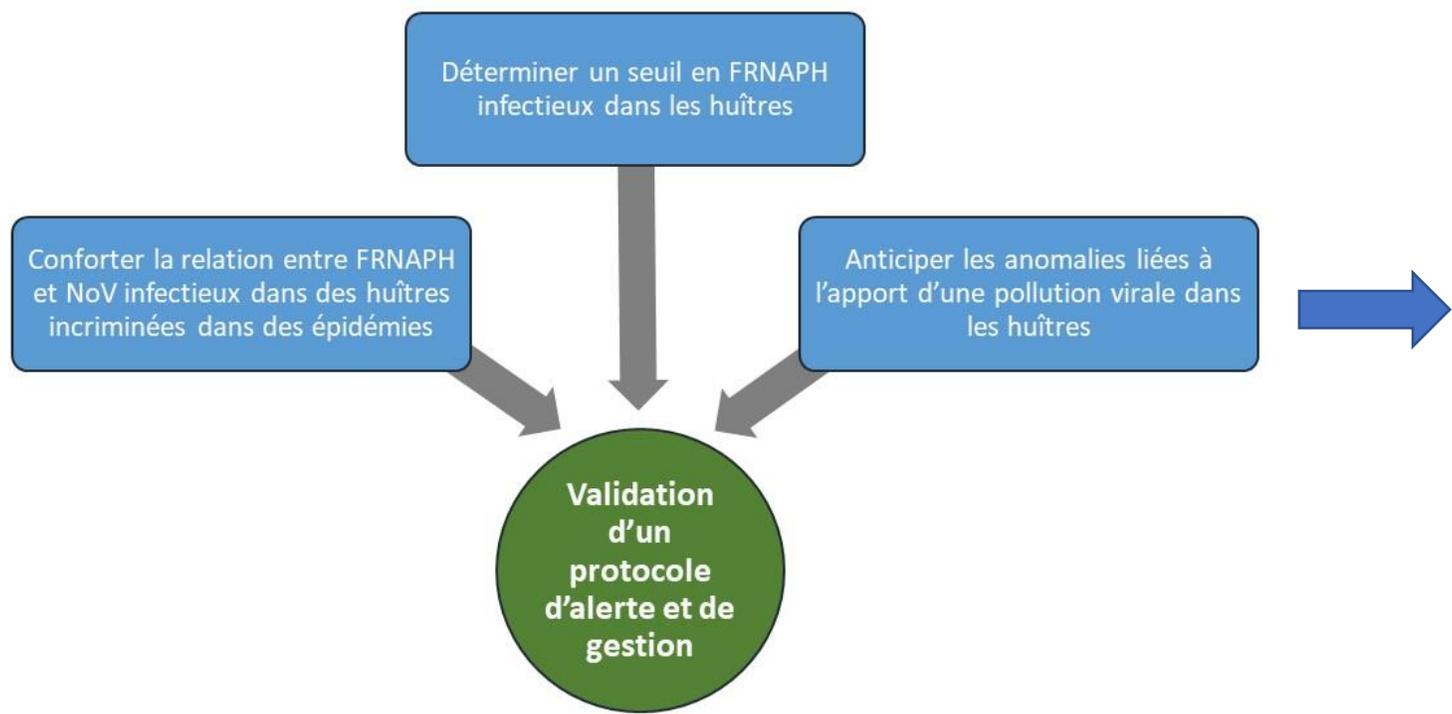
20°C ; solution PBS 150 mM

12°C ; eau de mer (3 conditions)



- Inactivations FRNAPH-II et NoV infectieux similaires ?

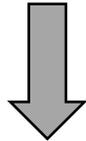
# Validation *in situ* de l'indicateur OXYVIR



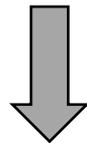
Positionnement seuil FRNAPH en cours...

# Validation *in situ* de l'indicateur OXYVIR

interactions spécifiques / non spécifiques des particules virales avec les tissus digestifs d'huîtres

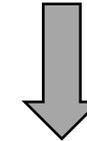


	NoV	FRNAPH-II
Spécifiques	A-like HBGA, acides sialiques	Aucune
Non spécifiques	Charge, hydrophobie de surface	

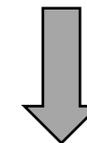


**Dissémination et comportement des virus dans les huîtres**

Prévalence de FRNAPH infectieux à l'échelle de l'individu humain



	FRNAPH (infectieux et génome)
Etude clinique PRI-3 (100 selles fraîches)	Proportions et teneurs




**CHU**  
BIOER RECHERCHE

**Soumission d'un projet de Recherche**

Vous souhaitez mener une recherche. Merci de compléter ce document et l'envoyer à l'adresse suivante : [secretariat.DRC@chu-rouen.fr](mailto:secretariat.DRC@chu-rouen.fr)

<b>Porteur du projet</b>	
Nom / Prénom	Favennec Loïc
Etablissement :	CHU de Rouen
Service	Parasitologie mycologie
Téléphone :	0232881455
Mail :	loic.favennec@chu-rouen.fr
<b>Titre (même provisoire)</b>	
<small>Évaluation de la prévalence du portage de phages locaux (bactériophages ARN F-spécifiques et coliphages non-spécifiques) dans les selles de patients sans pathologie infectieuse</small>	

## Conclusions

- **Origine entérique et structures similaires** des FRNAPH et NoV
- Génome FRNAPH-II > génome NoV dans les **eaux usées**
- **Dégradation** des génomes de FRNAPH et NoV faible et similaire dans l'**environnement** et lors de la **dépuración des huîtres**
- **Corrélation** démontrée entre génome FRNAPH-II et génome NoV dans les **huîtres**
- **Survie similaire** des FRNAPH infectieux et NoV infectieux dans les huîtres partiellement démontrée :
  1. Résultats des 15 restes de repas incriminés dans des épidémies à NoV
  2. Critère FRNAPH infectieux utilisé en routine par des ostréiculteurs (pas de retours clients négatifs)
  3. Données bibliographiques
  4. Etudes laboratoires en cours de finalisation...

# Bilan – Perspectives : contrôle du danger à NoV dans les huîtres *via* l'indicateur OXYVIR

