

**VIRUS HUMAINS ET SANTE PUBLIQUE :
CONSEQUENCES DE L'UTILISATION DES EAUX
USEES ET DES BOUES EN AGRICULTURE ET
CONCHYLICULTURE**

Professeur Louis SCHWARTZBROD
Centre Collaborateur OMS
pour les Microorganismes dans les Eaux Usées
UNIVERSITE DE NANCY (France)

Juillet 2000

**VIRUS HUMAINS ET SANTE PUBLIQUE :
CONSEQUENCES DE L'UTILISATION DES EAUX USEES
ET DES BOUES EN AGRICULTURE ET CONCHYLICULTURE**

Par

Professeur Louis SCHWARTZBROD
CENTRE COLLABORATEUR OMS
POUR LES MICROORGANISMES DANS LES EAUX USEES
UNIVERSITE DE NANCY
Faculté de Pharmacie
54000 Nancy, France

Juillet 2000

SOMMAIRE

CHAPITRE 1

LES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE	1
1. LES VIRUS PATHOGENES	1
1.1. Les Entérovirus	1
1.2. Les virus des hépatites	2
1.3. Virus des gastro-entérites	5
1.3.1. Rotavirus et Réovirus	5
1.3.2. Norwalk-like virus et Sapporo-like virus	7
1.3.3. Astrovirus	7
1.3.4. Adénovirus	8
1.3.5. Coronavirus	8
1.3.6. Torovirus	9
2. LES BACTERIOPHAGES	9
2.1. Coliphages somatiques	10
2.2. Phages à ARN F-spécifiques	10
2.3. Phages de Bactéroïdes fragilis	10

CHAPITRE 2

CONTAMINATION VIRALE DU MILIEU HYDRIQUE	14
1. - EXCRETION VIRALE DANS LES FECES	15
2. - PRESENCE VIRALE DANS LES EAUX	18
3. - PRESENCE VIRALE DANS LES COQUILLAGES	28

CHAPITRE 3

DETECTION DES VIRUS DANS LE MILIEU HYDRIQUE	40
1. CONCENTRATION DES VIRUS	41
1.1. Concentration des virus entériques à partir des eaux	42
1.1.1. Concentration primaire	45
1.1.1.1. Adsorption-élution sur différents supports	45
1.1.1.2. Ultrafiltration tangentielle	50
1.1.2. Concentration secondaire	53
1.1.2.1. Flocculation organique	53
1.1.2.2. Précipitation par le polyéthylèneglycol (PEG)	54
1.1.2.3. Ultrafiltration tangentielle	54
1.1.2.4. Ultracentrifugation	55
1.1.2.5. Séparation immunomagnétique	56
1.2. Extraction-concentration des virus entériques à partir des boues	56
1.3. Extraction-concentration des virus entériques à partir des fruits de mer	60
1.3.1. Extraction des virus	60
1.3.2. Clarification de l'éluat	62
1.3.3. Concentration des virus	63
1.4. Concentration des bactériophages	64
1.4.1. Concentration par filtration sur membrane inorganique	65

1.4.2. Concentration par filtration sur membrane en esters de cellulose	65
1.4.3. Concentration par filtration sur filtres chargés positivement	66
1.4.4. Concentration par adsorption-élution sur laine de verre	67
2. DETECTION DES VIRUS ENTERIQUES.....	68
2.1. Isolement sur cultures cellulaires in vitro.....	68
2.1.1. Détoxification des concentrats ou extraits.....	70
2.1.1.1. Centrifugation	70
2.1.1.2. Filtration sur gel de Séphadex LH20.....	70
2.1.2. Décontamination bactérienne et fongique	70
2.1.2.1. Traitement par le chloroforme.....	71
2.1.2.2. Traitement par antibiotiques.....	71
2.1.3. Isolement des virus provoquant un effet cytopathogène	71
2.1.4. Isolement des virus se multipliant sur cultures cellulaires sans provoquer d'effet cytopathogène.....	73
2.1.4.1. Mise en évidence par Immunofluorescence in situ (IF)	73
2.1.4.2. Mise en évidence par Radio-Immuno Focalisation Assay (RIFA).....	74
2.1.4.3. Mise en évidence par biologie moléculaire	74
2.2. Détection par biologie moléculaire	74
2.2.1. Principe.....	74
2.2.1.1. Hybridation moléculaire.....	75
2.2.1.2. Amplification par Polymerisation en Chaîne (APC) ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR).....	75
2.2.2. Détection du génome des virus entériques par RT-PCR	79
2.2.2.1. Extraction-purification	80
2.2.2.2. RT-PCR et détection des fragments amplifiés	82
2.3. Détection par technique immunologique	86
2.4. Détection par microscopie et immunomicroscopie électronique	86
3. DETECTION DES BACTERIOPHAGES	87
 ANNEXES	 90

CHAPITRE 4

DEVENIR DES VIRUS DANS LES EAUX	133
1. INACTIVATION NATURELLE.....	133
2. - DEVENIR DES VIRUS AU COURS DES TRAITEMENTS D'EPURATION DES EAUX USEES	142
2.1. - Epuration.....	142
2.2. - Désinfection.....	145
 ANNEXES	 163

CHAPITRE 5

DEVENIR DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES BOUES	167
1. STOCKAGE DES BOUES ET VIRUS ENTERIQUES.....	167
2. MODE DE TRAITEMENT DES BOUES.....	169
2.1. La stabilisation	170
2.2. La Pasteurisation	170
2.3. Réduction de la teneur en eau	171
2.3.1. Conditionnement	171
2.3.2. Epaissement.....	171
2.3.3. Déshydratation par évaporation naturelle (lits de séchage).....	171

2.3.4. Déshydratation mécanique	171
2.3.5. Déshydratation par séchage thermique.....	172
2.4. Post traitement des boues	172
2.4.1. Compostage	172
2.4.2. Chaulage.....	173
2.4.3. Irradiation	173
3. INACTIVATION DES VIRUS ENTERIQUES AU COURS DES TRAITEMENTS	175
3.1. Pasteurisation	176
3.2. Digestions psychrophiles	176
3.3. Digestions mésophiles.....	176
2.4. Digestion thermophile.....	178
2.5. Déshydratation	180
2.6. Compostage.....	180
2.7. Chaulage.....	182
2.8. Traitement par irradiation.....	183

CHAPITRE 6

DEVENIR DES VIRUS ENTERIQUES SUR LES SOLS ET LES CULTURES MARAICHERES	191
1. DEVENIR DES VIRUS DANS LES SOLS.....	191
1.1. Survie	191
1.2. Adsorption des virus sur les sols.....	194
1.3. Migration des virus dans les sols.....	197
2. DEVENIR DES VIRUS ENTERIQUES SUR LES VEGETAUX.....	204

CHAPITRE 7

VIRUS ET COQUILLAGES	216
1. CONTAMINATION DES COQUILLAGES	216
2. PERSISTANCE DES VIRUS DANS LES COQUILLAGES	225
3. DECONTAMINATION DES COQUILLAGES.....	226

CHAPITRE 8

EPIDEMIOLOGIE DES MALADIES VIRALES A TRANSMISSION HYDRIQUE	237
1. TRANSMISSION PAR LES EAUX.....	237
2. TRANSMISSION CONSECUTIVE A L'IRRIGATION AVEC DES EAUX USEES ET A L'UTILISATION AGRICOLE DE BOUES D'EPURATION.....	239
3. TRANSMISSION PAR LES COQUILLAGES.....	244
4. TRANSMISSION PAR DES VEGETAUX SUSCEPTIBLES D'AVOIR ETE IRRIGUES AVEC DES EAUX USEES.	246

CHAPITRE 9

EVALUATION DU RISQUE VIRAL D'ORIGINE HYDRIQUE POUR LA SANTE HUMAINE	255
1. CONTROLE VIROLOGIQUE DES EAUX USEES, DES BOUES ET DES COQUILLAGES	256
2. INDICATEURS DE CONTAMINATION VIRALE	261
2.1. Indicateurs bactériens.....	262
2.2. Indicateurs viraux.....	264
2.2.1. Les Entérovirus.....	264

2.2.2. Le génome des virus entériques.....	265
2.2.3. Les bactériophages	266
2.2.3.1 Coliphages somatiques.....	266
2.2.3.2. Bactériophages à ARN F-spécifiques.....	267
2.2.3.3. Phages de Bacteroides fragilis.....	269
3. INDICATEUR D'EFFICACITE DE TRAITEMENT SUR LE PLAN VIROLOGIQUE	271
3.1. Entérovirus	271
3.2. Génome viral.....	272
3.4. Bactériophages	272
4. DOSE MINIMALE INFECTIEUSE, INFECTION ET MALADIE	276
5. EVALUATION DU RISQUE.....	278

RECOMMANDATIONS ET RECHERCHES PRECONISEES

Chapitre 1

LES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE

Les virus abondent dans le milieu aquatique aussi bien dans les eaux douces que marines (BERGH *et al.*, 1989). Cependant, les virus du milieu hydrique présentant un intérêt direct en santé humaine et capables de provoquer des infections chez l'homme sont ceux qui sont excrétés dans les selles d'individus infectés. Plus de 140 virus pathogènes peuvent être éliminés dans les fèces humaines (Tableau 1). Regroupés sous le nom de virus entériques, ils appartiennent à plusieurs familles et genres. Des bactériophages, non pathogènes pour l'homme mais susceptibles de constituer des indicateurs de contamination virale, sont aussi excrétés dans les selles.

1. Les Virus pathogènes

1.1. Les Entérovirus

Membres de la famille des *Picornaviridae*, ce sont des virus à ARN monocaténaire, nus, à capsidie icosaédrique, dont la taille varie de 20 à 30 nm, ils sont résistants dans le milieu extérieur et sont susceptibles de persister pendant longtemps dans l'environnement.

Leur transmission est soit directe soit indirecte par des eaux souillées ou des aliments contaminés. La plupart des infections provoquées par ces virus sont inapparentes et se produisent pendant l'enfance. Leur domaine pathologique est très étendu car ils sont capables de provoquer des lésions du système nerveux, du tractus gastro-intestinal, de l'appareil respiratoire, des muscles, de la peau et des yeux. Mis à part certains virus *Coxsackie A*, ils sont cultivables sur cultures cellulaires *in vitro*.

Le genre *Entérovirus* comprend :

- *Poliovirus*

L'infection par les *Poliovirus* est inapparente dans plus de 90 % des cas. Les manifestations cliniques se traduisent le plus souvent par une hyperthermie voire quelques réactions méningées ; exceptionnellement elles caractérisent la poliomyélite antérieure aiguë

(PAA) avec atteinte des neurones des cornes antérieures de la moelle. Celle-ci peut être fatale par paralysie du diaphragme et des muscles intercostaux. En général la PAA se traduit par des paralysies dont les séquelles sont plus ou moins invalidantes. Cependant des dizaines d'année après la maladie certains patients développent de nouveaux symptômes regroupés sous le nom de syndrome post-poliomyélitique (SPP) qui pourrait être dû à une infection persistante par le *Poliovirus* (LEPARC-GOFFART et al., 1996).

Sont rencontrées dans l'environnement des souches sauvages, des souches vaccinales (Sabin) et des souches atténuées (Sabin-like).

- *Coxsackievirus* A et B

Ces virus peuvent provoquer des affections neurologiques (méningites lymphocytaires), digestives, respiratoires et cutanéomuqueuses. Les *Coxsackievirus* du groupe A sont plus particulièrement responsables de l'herpangine alors que les *Coxsackievirus* du groupe B provoquent plus spécifiquement la myalgie épidémique et des lésions cardiovasculaires (myocardites). De plus, il y a un certain nombre d'arguments en faveur de l'association des *Coxsackievirus* B avec le diabète insulino-dépendant.

- *Echovirus*

Les *Echovirus* sont responsables de méningites lymphocytaires, d'infections respiratoires, de fièvre et d'éruptions cutanées.

- *Entérovirus* 68 à 71

Ces *Entérovirus* provoquent essentiellement des affections respiratoires, des méningites, des encéphalites et des conjonctivites hémorragiques.

1.2. Les virus des hépatites

Deux types de virus responsables de la survenue d'hépatite sont excrétés dans les selles et sont susceptibles d'être transmis par la voie hydrique. Ce sont le virus de l'hépatite A (HAV) et le virus de l'hépatite E (HEV). Les symptômes observés sont : ictère accompagné d'asthénie, anorexie, nausées, vomissements et fièvre.

- Virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A (HAV) appartient à la famille des *Picornaviridae* et au genre *Hepatovirus*. C'est un virus à ARN monocaténaire, nu à capsidie icosaédrique de 27 nm de diamètre. Un seul sérotype a été identifié. La durée moyenne d'incubation est de 30 jours. L'évolution vers la guérison est favorable en 2 à 4 semaines. 90 % des enfants de moins de 6 ans infectés par le HAV développent une forme subclinique anictérique alors que 50 % à 75 % des adultes infectés présentent une forme clinique ictérique (HOLLINGER and TICEHURST, 1990). Il n'y a jamais d'évolution vers la chronicité. Des formes fulminantes peuvent être observées essentiellement chez l'adulte. Le taux de létalité globale est de 0,1 à 0,6%, cependant il augmente avec l'âge des patients. Ainsi, pour les individus de plus de 49 ans le taux est de 2,7 % (HADLER,1991). Sa transmission est directe ou indirecte par consommation d'eau ou d'aliments souillés en particulier les coquillages.

Tableau 1 : Virus pathogènes pour l'homme susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique

Familles	Nature de l'acide nucléique	Genres	Taille	Espèces	Sérotypes	Maladie provoquée
<i>Picornaviridae</i>	ARN	<i>Entérovirus</i>	20 à 30 nm	Virus Poliomyélitique	3	Paralysie, méningite, fièvre, poliomyélite.
				Virus <i>Coxsackie</i> A	23	Méningite, infection respiratoire, herpangine.
				Virus <i>Coxsackie</i> B	6	Myocardite, éruption cutanée, fièvre, méningite, infection respiratoire, pleurodynie.
				Echovirus	30	Méningite, infection respiratoire, éruption cutanée, fièvre, diarrhée.
		<i>Entérovirus</i> 68 à 71	4	Méningite, encéphalite, atteinte des voies respiratoires, conjonctivite hémorragique.		
		<i>Hépatovirus</i>	27 nm	Virus de l'hépatite A	1	Hépatite infectieuse.
<i>Reoviridae</i>	ARN (bicaténaire et fragmenté)	<i>Réovirus</i> <i>Rotavirus</i>	75 nm	Réovirus humains <i>Rotavirus</i> humains	3 6 (groupes)	Non établie. Gastro-entérite.
<i>Caliciviridae</i>	ARN	<i>Norwalk-like virus</i> (NLV) <i>Sapporo-like virus</i> (SLV)	20 à 35 nm	Genogroupes I et II	> 15	Gastro-entérite.
				Genogroupe III	> 3	Gastro-entérite.
<i>Astroviridae</i>	ARN	<i>Astrovirus</i>	27 à 30 nm	Astrovirus humains	7	Gastro-entérite.
<i>Coronaviridae</i>	ARN	<i>Coronavirus</i>	120 nm	Coronavirus humains	2	Entérocolite.
	ARN	<i>Torovirus</i>	120 nm	Torovirus	?	Gastro-entérite.
<i>Adenoviridae</i>	ADN	<i>Mastadénovirus</i>	70 à 90 nm	Adénovirus humains	49	Infection respiratoire, conjonctivite et gastro-entérite.
?	ARN	?	20 à 35 nm	Virus de l'hépatite E	1	Hépatite infectieuse.

- Virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (HEV) est un virus à ARN, non enveloppé, à capsidie icosaedrique, d'un diamètre de 27 à 34 nm. Il a d'abord été rattaché à la famille des *Caliciviridae* mais actuellement il n'en fait plus partie et est considéré comme "unassigned". La durée moyenne d'incubation est de 40 jours, l'évolution est favorable en 2 à 4 semaines. Il n'y a pas de passage à la chronicité. Le taux de létalité est compris entre 1 % et 3 % mais il atteint 20 % chez les femmes enceintes au cours du troisième trimestre de la grossesse.

1.3. Virus des gastro-entérites

Sont rassemblés dans ce cadre plusieurs groupes de virus à excrétion fécale ayant pour point commun de provoquer des diarrhées épidémiques et des vomissements. Les aspects cliniques des principales gastroentérites virales transmises par le milieu hydrique sont rassemblés dans le tableau 2.

1.3.1. Rotavirus et Réovirus

Les *Rotavirus* et les *Réovirus* appartiennent à la famille des *Réoviridae*. Leur génome est constitué d'ARN bicaténaire segmenté respectivement en 11 et 10 fragments. Ces virus, de symétrie icosaedrique, ne possèdent pas d'enveloppe mais deux capsides distinctes, l'une interne, l'autre externe. Ils présentent un aspect de roue en microscopie électronique et leur taille est de 75 nm.

Les *Rotavirus* se répartissent en 6 groupes distincts (A à F) (BRIDGER, 1987). Les *Rotavirus* des groupes A B C peuvent infecter les humains alors que ceux des groupes D E et F atteignent les animaux. Le groupe A est nettement le plus important en pathologie humaine, il comprend les *Rotavirus* responsables des gastroentérites de l'enfant et des personnes âgées. Les *Rotavirus* du groupe A peuvent être différenciés en sérotypes en fonction de la réactivité antigénique des 2 protéines de la capsidie externe (VP7 et VP4). La protéine VP4 définit les types P et la protéine VP7 les types G (ESTES et COHEN, 1989). L'appartenance à l'un des sérotypes P

et G se fait de façon indépendante (HOSHINO et KAPIKIAN, 1994). Le nombre des sérotypes est en constante évolution et au moins 14 sérotypes G et 11 sérotypes P ont été identifiés.

Les *Rotavirus* sont considérés comme les agents majeurs des gastro-entérites aiguës sporadiques chez le jeune enfant âgé de 6 mois à 2 ans (50 % des enfants hospitalisés pour gastroentérites pendant la période hivernale). Ils provoquent, après une incubation de 24 à 48 heures, des vomissements et une diarrhée associée à de la fièvre. La guérison survient en général après 5 à 6 jours. Chez l'adulte l'infection est souvent inapparente, alors que, chez l'enfant, des manifestations cliniques s'observent dans plus de 60 % des cas. On constate une nette prédominance hivernale dans les pays tempérés.

Dans les pays en voie de développement on estime que, par an, 125 millions de cas de gastroentérites du jeune enfant sont provoqués par les *Rotavirus* et que près de 18 millions de ces cas sont considérés comme sévères ou modérément sévères.

Le taux annuel d'hospitalisation pour diarrhées sévères à *Rotavirus* varie de 30/1000 enfants en Amérique du Sud (PEREZ-SCHAEL, 1996) à 3,5/1000 enfants sur le continent Nord Américain (GLASS *et al.*, 1996). D'après certains auteurs les *Rotavirus* pourraient être responsables de la mort de 4 millions de personnes par an dans le monde.

Les *Réovirus* sont isolés du tractus respiratoire et entérique d'individus le plus souvent bien portants mais parfois atteints d'infections respiratoires ou digestives. En fait, la relation entre la présence des *Réovirus* et la survenue de maladie chez l'homme n'est actuellement pas établie.

Tableau 2 : Aspects cliniques des principales gastroentérites virales
(d'après NICAND *et al.*, 1998)

Virus	Symptomatologie	Durée moyenne d'incubation	Durée des signes cliniques	Principaux signes cliniques (% : valeurs moyennes)
<i>Rotavirus</i>	gastroentérites	1-3 jours	5-7 jours	- diarrhée aqueuse : 98 % - fièvre : 86 % - vomissements : 51 % - déshydratation : 72 % des hospitalisations

<i>Norwalk-like virus</i> (NLV) <i>Sapporo-like virus</i> (SLV)	gastroentérites	12-48 h	24-48 h	- diarrhée : 66 % - fièvre : 37 % - vomissements : 69 % - guérison sans séquelles
<i>Astrovirus</i>	gastroentérites	24-36 h	2-3 jours	- diarrhée : 73 % - fièvre : 46 % - vomissement : 46 %
<i>Adénovirus</i> 40 et 41	gastroentérites	8-10 jours	5 jours-2 semaines	- diarrhée : 45-75 % - fièvre : 40 à 75 % - vomissements : 59 %
<i>Coronavirus</i> humains et <i>Torovirus</i>	gastroentérites ?			- 90 % des cas sont asymptomatiques

1.3.2. *Norwalk-like virus* et *Sapporo-like virus*

Les genres *Norwalk-like virus* (NLV) et *Sapporo-like virus* (SLV) appartiennent à la famille des *Caliciviridae* et comprennent un certain nombre de sérotypes viraux appartenant aux génogroupes I et II (NLV) et au génogroupe III (SLV) (Tableau 1).

Ce sont des virus nus, à ARN monocaténaire dont la capsid est de symétrie cubique. Leur taille se situe entre 27 et 38 nm. Ils ne sont pas cultivables sur cultures cellulaires.

Ils sont responsables de gastroentérites qui surviennent sous forme sporadique mais le plus souvent sous forme épidémique chez les enfants et les adultes. Les manifestations cliniques sont caractérisées, après une incubation de 12 à 48 heures, par des vomissements et une diarrhée pendant 24 à 72 heures. La transmission s'effectue par voie oro-fécale d'individu à individu mais aussi par l'intermédiaire du milieu hydrique en particulier des coquillages.

1.3.3. *Astrovirus*

Les *Astrovirus* constituent le seul genre de la famille des *Astroviridae*. Ce sont des virus nus à ARN monocaténaire entouré par une capsid icosaédrique d'un diamètre de 28 nm. En microscopie électronique, ils se présentent sous forme d'une étoile à 5 ou 6 branches.

Il existe 7 sérotypes (LEE et KURTZ, 1994) humains, le sérotype 1 est nettement prédominant (KRISTON *et al.*, 1996). L'incidence réelle des infections à *Astrovirus* est difficile à évaluer car les symptômes des gastroentérites qu'ils provoquent sont généralement modérés et entraînent rarement une hospitalisation (TRAORE *et al.*, 1998). Cependant, MONROE *et al.* (1991) ont montré que sur 741 selles contenant des *Astrovirus*, 90 % provenaient d'enfants de moins de 5 ans. Par ailleurs une étude menée en Thaïlande sur une population d'enfants diarrhéiques, a montré que, un *Astrovirus* était isolé des selles dans 8,6 % des cas alors que *Rotavirus* et *Adénovirus* l'étaient respectivement dans 19 % et 2,6 % des cas (HERMANN *et al.*, 1991).

Sur le plan clinique, après une incubation de 24 à 36 heures, survient une diarrhée accompagnée dans environ 1 cas sur 2, de fièvre et/ou de vomissements. La guérison apparaît après 2 à 3 jours. A l'instar des infections à *Rotavirus* et à NLV et SLV on observe un pic saisonnier durant les mois d'hiver dans les régions tempérées et durant la saison des pluies en climat tropical (MONROE *et al.*, 1991).

1.3.4. Adénovirus

Les *Adénovirus* humains appartiennent au genre *Mastadénovirus* et à la famille des *Adenoviridae*. Ce sont des virus à ADN bicaténaire non enveloppés à capsidie icosaédrique qui porte des fibres d'hémagglutinine. Leur taille est de 70 à 80 nm. Les *Adénovirus* humains "classiques" appartenant aux sous-genres A, B, C, D, E, provoquent pour la plupart des infections respiratoires et conjonctivales et certains sérotypes possèdent un pouvoir oncogène. Ils sont facilement cultivables sur cultures cellulaires in vitro. Les *Adénovirus* entériques (40 et 41) appartenant au sous-genre F ont été décrits par FLEWETT *et al.*, (1975) dans des selles de nourrissons atteints de gastro-entérites. Il a été montré que ces virus, dits "fastidieux" parce qu'ils se multiplient très mal sur cultures cellulaires (GRABOW *et al.*, 1993), sont responsables, la plupart du temps chez des enfants de moins de 2 ans, d'épisodes gastro-entéritiques marqués, après une incubation de 8 à 10 jours, par de la diarrhée et/ou de la fièvre, et/ou des vomissements pendant en moyenne 6 à 8 jours. Ils seraient responsables de 4 à 8 % des gastro-entérites infantiles (SIMON and MATA, 1985 ; ADRIAN *et al.*, 1987).

1.3.5. Coronavirus

Les *Coronavirus* (famille des *Coronaviridae*) sont des virus à ARN monocaténaire à capsidie tubulaire possédant une enveloppe hérissée de larges spicules ce qui donne au virion un

aspect de couronne. Leur diamètre est d'environ 120 nm. Ils ont été associés à des gastro-entérites chez l'homme (MORTENSEN *et al.*, 1985), à des cas d'entérocolite sclérosante chez les nouveaux-nés (CHANY *et al.*, 1982) et à des cas de gastroentérite fulminante fatale chez le nouveau-né (VAUCHER *et al.*, 1982). Cependant il semble que dans près de 90 % des cas l'infection soit asymptomatique.

1.3.6. Torovirus

Ces virus parfois dénommés *Coronavirus-like* ou agent de Breda ou agent de Berne (WEISS *et al.*, 1983 ; BEARDS *et al.*, 1984) sont actuellement classés dans la famille des *Coronaviridae* genre *Torovirus*. Ce sont des virus à ARN à capsid à symétrie hélicoïdale (structure en torus) et enveloppés. Ils ont été retrouvés dans des selles d'hommes atteints de gastro-entérites et seraient responsables de gastro-entérites du nouveau-né et de "gripes intestinales" chez l'adulte.

Le pronostic des gastroentérites à virus est en général favorable, les manifestations cliniques s'estompent après 48 à 72 heures lorsque le virus appartient à la famille des *Caliciviridae* (NLV et SLV), au bout d'une semaine s'il s'agit d'un *Rotavirus* ou d'un *Adénovirus* 40 ou 41. Cependant les formes graves avec déshydratation sévère sont observées notamment au cours des rotaviroses chez l'enfant ou l'adulte immunodéprimé.

2. Les bactériophages

Les bactériophages susceptibles d'être excrétés dans les selles et d'être retrouvés dans le milieu hydrique sont très nombreux et appartiennent à 9 familles (Figure 1) :

Parmi ces bactériophages, certains sont susceptibles d'être utilisés au titre d'indicateurs de contamination virale. Ils sont regroupés classiquement en 3 catégories :

Coliphages somatiques,

Phages à ARN F-spécifiques,

Phages de *Bacteroides fragilis*.

2.1. Coliphages somatiques

Ils constituent un groupe hétérogène appartenant aux familles des *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae*. Ils sont capables d'infecter *E. coli*.

2.2. Phages à ARN F-spécifiques

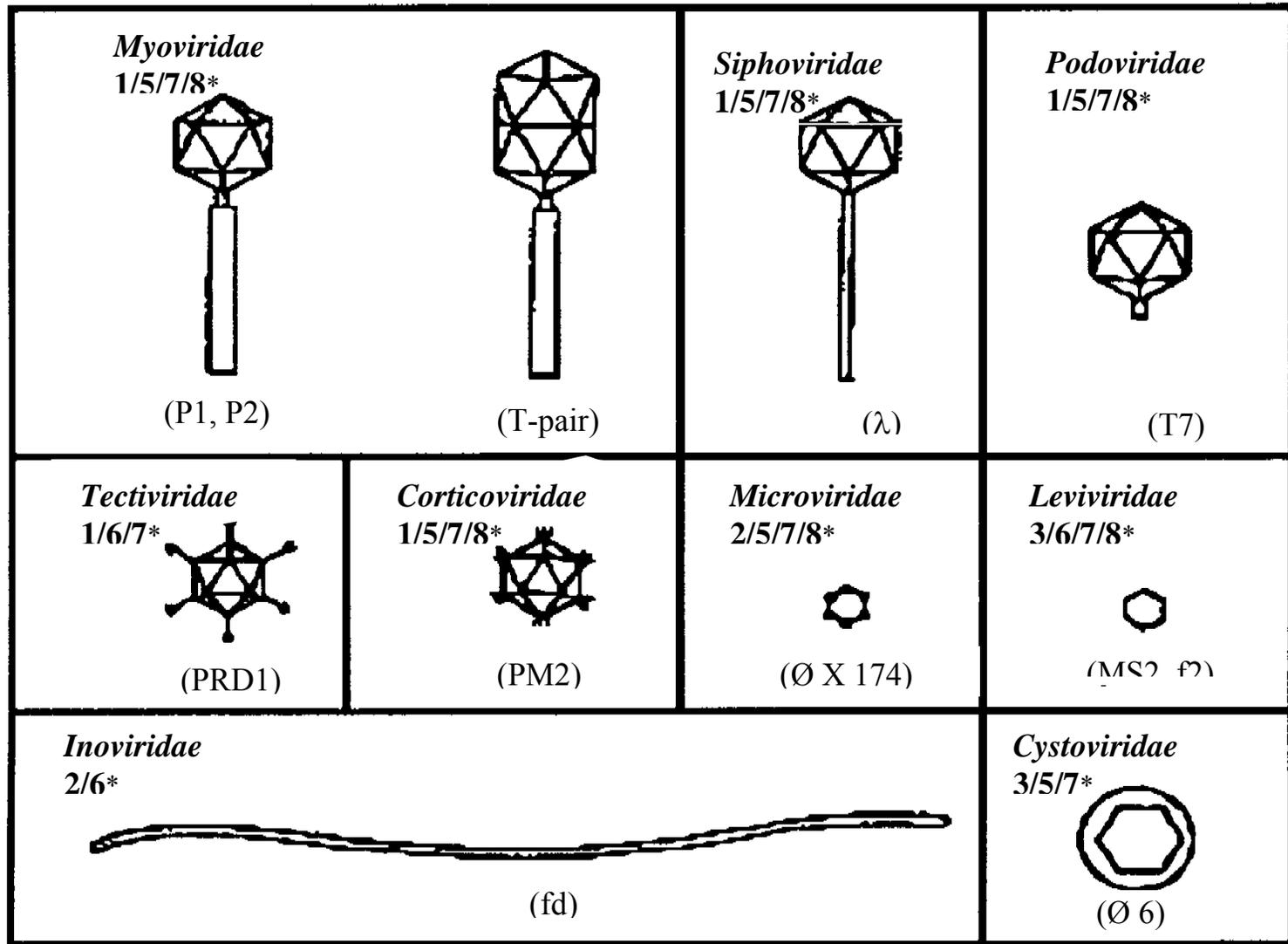
Ces bactériophages présentent la particularité d'infecter les entérobactéries dont ils sont les hôtes par l'intermédiaire de leurs pili sexuels. Ils appartiennent à la famille des *Leviviridae*.

2.3. Phages de *Bactéroides fragilis*

Ils infectent une bactérie anaérobie dont la niche écologique est constituée par le tractus intestinal humain. Ils appartiennent en majorité à la famille des *Siphoviridae*.

Remarque :

Le terme de "Virus entériques" (Enteric Viruses) recouvre tous les virus excrétés dans les selles. Il ne doit pas être confondu avec le terme "*Entérovirus*" qui désigne le genre *Entérovirus* (famille des *Picornaviridae*) qui rassemble seulement : *Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus* et *Entérovirus* 68 à 71.



- * 1 ADN bicaténaire
- * 2 ADN monocaténaire
- * 3 ARN monocaténaire
- * 4 ARN bicaténaire

- * 5 Récepteurs spécifiques situés au niveau de la paroi bactérienne
- * 6 Récepteurs spécifiques situés au niveau des pili sexuels
- * 7 Libération par lyse de la bactérie-hôte
- * 8 Absence de lipides dans la structure virale

Figure 1 - Classification et caractéristiques des principaux groupes de bactériophages rencontrés dans le milieu hydrique

Références

ADRIAN T., WIGAND R. and RICHTER J. (1987). Gastroenteritis in infants associated with genome type of *Adénovirus* 41 and with combined *Rotavirus* and *Adénovirus* 41 infection. Eur. J. Pediatr., **146**, 38-40.

BEARDS G.M., GREEN J., HALL C., FLEWETT T.H., LAMOULIATTE F. and DU PASQUIER P. (1984). An enveloped virus in stools of children and adults with gastroenteritis that resembles the Breda virus of calves. Lancet, **1**, 1050-1052.

BERGH O., BORSHEIM K.Y., BRATBAK G. and HELDAL M. (1989). High abundance of viruses found in aquatic environment. Nature, **340**, 467-468.

BRIDGER J.C., (1987). Novel *Rotaviruses* in animals and men. Novel diarrhoea viruses. Wiley edt. Ciba foundation symposium.

CHANY C., MOSCOVICI O., LEBON P. and ROUSSET S. (1982). Association of *Coronavirus* infection with neonatal necrotizing enterocolitis. Pediatrics, **69**, 209-214.

ESTES M.K. and COHEN J. (1989). *Rotavirus* gene structure and function. Microbiol. Rev., **53**, 410-449.

FLEWETT T.H., BRYDEN A.S., DAVIES H. and MORRIS C.A. (1975). Epidemic viral enteritis in a long-stay children's ward. Lancet, **2**, 8-11.

GLASS R.I., KILGORE P.E., HOLMAN R.C. *et al.* (1996). The epidemiology of *Rotavirus* diarrhea in the united states : surveillance and estimates of disease burden. J. Infect. Dis., **174** (suppl 1), 55-11.

GRABOW W.O.K., PUTTERGILL D.L. and BOSCH A. (1993). Plaque assay for *Adénovirus* type 41 using the PLC/PRF/5 liver cell line. Wat. Sci. Tech., **27**, 321-327.

HADLER S.C. (1991). Global impact of hepatitis A infection changing patterns, in : Viral hepatitis and liver disease. HOLLINGER F.B., LEMON S.M., MARGOLIS H., eds, WILLIAMS and WILKINS.

HERMANN J.E., TAYLOR D.N., ECHEVARRIA P. and BLACKLOW N.R. (1991). *Astrovirus* as a cause of gastroenteritis in children. N. Engl. J. Med., **324**, 1757-1760.

HOLLINGER F.B. and TICEHURST (1990). Hepatitis A virus, in : Virology. FIELDS B.N., KNIPE D.M. *et al.*, : eds Raven Press Ltd New-York.

HOSHINO Y. and KAPIKIAN A.K. (1994). *Rotavirus* vaccine development for the prevention of severe diarrhea in infant and young children. Trends Microbiol., **7**, 242-249.

KRISTON S., WILLCOCKS M.M., CARTER M.J. and CUBITT W.D. (1996). Seroprevalence of *Astrovirus* types 1 and 6 in London, determined using recombinant virus

antigen. Epidemiol. Infect., **11**, 159-164.

LEE T.W. and KURTZ J.B. (1994). Prevalence of human *Astrovirus* serotypes in the oxford region 1976-1992 with evidence for two new serotypes. Epidemiol. Infect. **112**, 187-193.

LEPARC-GOFFART I., JULIEN J., FUCHS F., JANATOVA I., AYMARD M. and KOPECKA H. (1996). Evidence for the presence of *Poliovirus* genomic sequences in the CSF of patients with post-polio syndrome. J. Clin. Microbiol., **34**, 2023-2026.

MONROE S.S., GLASS R.I., NOAHN., FLEWETT T.H., CAUL E.O., ASHTON C.I., CURRY A., FIELD A.M., MADELEY R. and PEAD P.J. (1991). Electron microscopic reporting of gastrointestinal viruses in the United Kingdom. J. Med. Virol., **33**, 193-198.

MORTENSEN M.L., RAY C.G., PAYNE C.M., FRIEDMAN A.D., MINNICH L.L. and ROUSSEAU C. (1985). *Coronavirus-like* particles in human gastrointestinal disease : epidemiologic, clinical and laboratory observations. Am. J. Dis. Child. **139**, 928-934.

NICAND E., TEYSSOU R. et BUISSON Y. (1998). Le risque fécal viral en 1998. Virologie, **2**, 103-116.

PEREZ-SCHAEEL I. (1996). The impact of *Rotavirus* disease in Venezuela. J. Inf. Dis., **174** (suppl 1) : 519-21.

SIMON A. and MATA L. (1985). Fecal *Rotaviruses*, *Adenoviruses*, *Coronaviruses-like* particles and small round viruses in a cohort of rural Costa Rican children. Am. J. Trop. Med. Hyg., **34**, 931-934.

TRAORE O., BELLIOU G., MONROE S. et LAVERAN H. (1998). Les *Astrovirus* humains. Virologie , **2**, 33-39.

VAUCHER Y.F., RAY C.G., MINNICH L.L., PAYNE C.M., BECK D. and LOWE P. (1982). Pleomorphic enveloped virus-like particles associated with gastrointestinal illness in neonates. J. Infect. Dis., **145**, 27-35.

WEISS M., STECK F. and HORZINEK M. (1983). Purification and partial characterization of a new enveloped RNA virus (Berne virus). J. Gen. Virol., **64**, 1849- 1858.

Chapitre 2

CONTAMINATION VIRALE DU MILIEU HYDRIQUE

L'évaluation de la contamination virale dans l'environnement est difficile et sujette à une grande variabilité car elle dépend d'un certain nombre de paramètres.

En particulier, elle dépend de la nature du matériel viral recherché. Les résultats sont en effet extrêmement différents selon que l'on recherche des virus infectieux par inoculation sur cultures cellulaires ou leur génome par des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR). Par exemple, PUIG *et al.*, (1994) travaillant sur les mêmes échantillons d'eau trouvent que 75 % des échantillons contiennent du génome d'*Entérovirus* alors que des *Entérovirus* infectieux ne sont rencontrés que dans 31 % des échantillons.

Elle dépend aussi du type de méthodologie utilisée pour concentrer les virus. Ainsi, HUGUES *et al.*, (1993) ont montré que selon la technique utilisée pour concentrer les *Entérovirus* infectieux d'eaux usées traitées (adsorption-élution sur laine de verre ou poudre de verre) ils obtenaient 94 % ou 46 % d'échantillons positifs et des concentrations virales variant de 6 à 19 NPPUC L⁻¹.

Un autre facteur de variation est constitué par le mode de détection des particules virales infectieuses. Ainsi selon que la preuve de la multiplication virale sur cultures cellulaires est apportée par la constatation d'un effet cytopathogène ou par la détection du génome viral les résultats sont extrêmement différents. Ainsi, GRABOW *et al.*, (1999) analysant par inoculation sur cultures cellulaires des échantillons de l'environnement (rivière, eaux usées) a obtenu des résultats positifs en PCR *Entérovirus* à partir de 263 cultures cellulaires qui n'avaient pas présenté d'effet cytopathogène (ECP).

De même YATES *et al.*, (1999) travaillant sur des eaux souterraines observe 5/310 (1,6 %) échantillons présentant un ECP sur cellules BGM et 11/320 (3,4%) positifs en PCR *Entérovirus* à partir des mêmes cultures cellulaires.

A l'origine de la contamination virale du milieu hydrique se trouve l'homme infecté par des virus entériques et qui rejette dans ses selles des quantités très importantes de particules virales qui se retrouvent ensuite au niveau des eaux usées. (Figure 2).

1. - Excrétion virale dans les fèces

Les selles d'une personne infectée par un virus entérique, qu'elle présente ou non des signes cliniques, peuvent contenir pour certains virus entériques jusqu'à 10^{11} particules virales par gramme de selles.

La période et la durée d'excrétion virale ainsi que la quantité de virus excrétés varient considérablement en fonction du virus en cause (Tableau 3).

Ainsi, pour les *Entérovirus* la durée moyenne d'excrétion virale est de 1 mois mais souvent elle persiste pendant plusieurs mois. Elle débute 5 à 6 jours avant l'apparition des signes cliniques et se situe entre 10^3 et 10^6 par gramme de selles (MELNICK, 1996).

En ce qui concerne le virus de l'hépatite A, son excrétion dans les selles commence au moins une semaine avant l'ictère, elle est maximale pendant la phase prodromique et décroît très rapidement après l'apparition de l'ictère (COURSAGET *et al.*, 1980). Sa durée moyenne d'excrétion est de 3 semaines et la concentration par gramme de selles atteint 10^9 .

Les *Rotavirus* sont excrétés pendant 10 jours, l'élimination est maximale (10^{10} à 10^{11} par gramme de selles) pendant les 3 à 4 premiers jours de l'infection (BLACKLOW and GREENBERG, 1991).

L'élimination fécale du virus de l'hépatite E débute dès l'apparition de l'ictère à un taux de 10^9 par grammes de selles et persiste pendant environ 2 semaines (CLAYTON *et al.*, 1995).

Les *Norwalk-like virus* et les *Sapporo-like virus* apparaissent dans les selles en même temps que les premiers symptômes et ils sont présents pendant 3 jours à un taux de 10^6 par gramme de selles.

Quant aux *Adénovirus* entériques, ils sont excrétés pendant 7 à 14 jours à raison de 10^6 à 10^7 par gramme de selles.

Tableau 3
Excrétion virale dans les fèces
(d'après NICAND *et al.*, 1998)

Virus	Durée moyenne d'excrétion fécale	Concentration virale par gramme de selles
<i>Rotavirus</i>	10 jours	10^{10}
<i>Norwalk-like virus</i> et <i>Sapporo-like virus</i>	3 jours	$> 10^6$
<i>Astrovirus</i>	12 jours	$> 10^6$
<i>Entérovirus</i>	1 mois	$10^3 - 10^6$
Virus de l'hépatite A	3 semaines	10^9
Virus de l'hépatite E	2 semaines	10^9
<i>Adénovirus</i>	10 jours	$> 10^6$

Les quantités de selles excrétées par une population varient considérablement en fonction de la nature de l'alimentation, du climat et de l'état de santé. Des valeurs extrêmes d'excrétion fécale de 50 à 1060 g par jour et par individu ont été rapportées par TANDON et TANDON, (1975) mais l'excrétion moyenne journalière peut être estimée à 200 - 300 g.

Compte-tenu de ces éléments CLARKE (1961), considérant une population constituée de 70 % d'adultes et de 30 % d'enfants a calculé que 60 000 virus entériques étaient éliminés en moyenne par jour et par habitant de cette communauté urbaine.

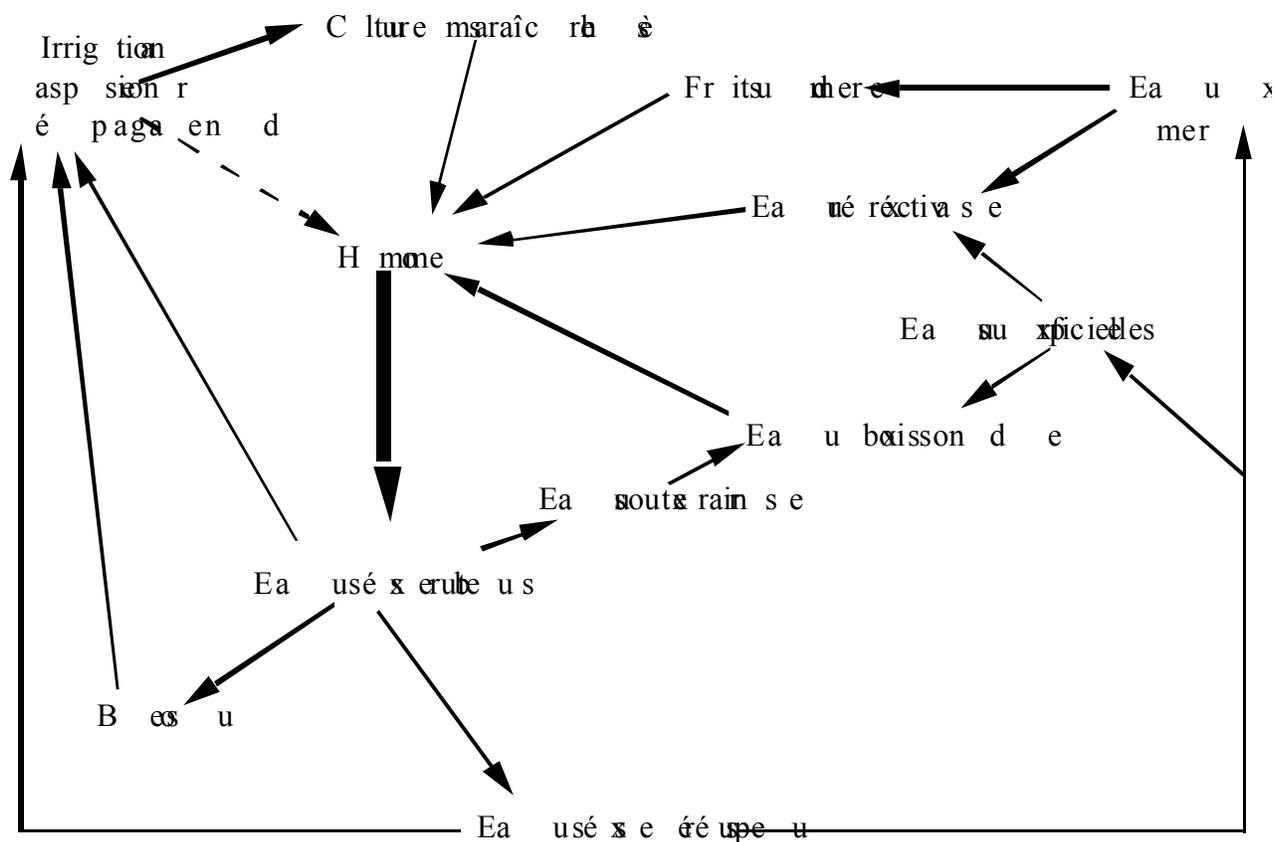


Figure 2

Schéma du cycle de contamination virale du milieu hydrique
(d'après SCHWARTZBROD, 1991)

2. - Présence virale dans les eaux

Les virus ainsi éliminés dans les selles se retrouvent dans les eaux usées dont le volume dépend de la quantité d'eau utilisée par les habitants.

Les eaux usées constituent ainsi le premier maillon d'un cycle de l'eau au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau. (Figure 2).

La concentration virale des eaux usées est sujette à des variations en fonction de nombreux facteurs géographiques, socio-économiques, saisonniers mais surtout sanitaires. Ainsi, plus le niveau d'hygiène est faible et plus la proportion d'enfants est grande dans une

communauté, plus la quantité de virus retrouvée dans les eaux usées est importante. Ainsi, DAHLING *et al.*, (1989) ont constaté que la contamination par les *Entérovirus* est beaucoup plus élevée à Porto-Rico, région à forte densité de population et à niveau socio-économique plus bas que dans les autres états des USA. La concentration virale dans les eaux usées y atteignait 10^5 UFP par litre dans les eaux usées brutes. En pratique, 80 à 100 % des eaux usées brutes contiennent des virus entériques à une concentration moyenne de 10^2 à 10^3 par litre. Par ailleurs, les sérotypes de virus isolés sont dans certains cas, très nombreux (Tableau 4).

Dans de nombreuses parties du monde, ces eaux sont rejetées dans le milieu naturel sans traitement. Cependant, dans d'autres pays, elles subissent un traitement préalable par des techniques physico-chimiques ou biologiques. Cette épuration a deux conséquences pratiques. D'une part elle permet de rejeter dans le milieu extérieur des eaux de meilleure qualité, d'autre part, il y a production de sous produits de l'épuration qui sont constitués par de très grands volumes de boues riches en virus entériques (Tableau 5). La densité de ces boues est très variable mais les boues primaires contiennent en moyenne 10^3 à 10^4 virus entériques par Kg (Matières sèches). Ces boues sont soit utilisées en amendement agricole, soit mises en décharge soit incinérées.

Après épuration les virus entériques infectieux sont très souvent encore présents dans les eaux épurées. La quantité de virus présents dépend évidemment du niveau de contamination de l'eau usée brute et du type de traitement. En moyenne après un traitement biologique la concentration moyenne se situe entre 0 et 10^2 UFP par litre (Tableau 6). Dans ces conditions, la quantité de virus rejetée dans les eaux superficielles est loin d'être négligeable puisque, pour une agglomération de 300 000 habitants, elle a pu être évaluée à plus de 10^9 virus entériques par 24 heures (SCHWARTZBROD *et al.*, 1979).

Les eaux superficielles (fleuves, rivières, lacs, mers) sont donc susceptibles de recevoir ainsi des virus entériques, leur densité dans ces milieux est en général beaucoup moins élevée (Tableaux 7 et 8). Il faut d'ailleurs bien préciser que, la plupart du temps, les virus sont recherchés dans des zones susceptibles d'être contaminées par les résidus de l'activité humaine et que ces zones ne sont pas représentatives de l'ensemble des eaux superficielles. Cependant, de nombreux virus, adsorbés sur des particules, sont susceptibles de sédimenter et de se déposer au

niveau des sédiments fluviaux ou marins. Or, la couche superficielle de sédiment qui est très légère, est facilement remise en suspension et constitue ainsi une source de contamination à distance. Les quantités de virus retrouvées à ce niveau sont variables comme l'indiquent les valeurs rassemblées dans le tableau 9.

Enfin, les eaux livrées à la consommation humaine ne sont pas exemptes de contamination virale et des virus pathogènes pour l'homme ont été retrouvés dans l'eau d'alimentation dans de nombreux pays (Tableau 10).

Tableau 4
Virus et eaux usées brutes

ORIGINE DE L'ECHANTILLON	TYPE DE VIRUS	QUANTITE DE VIRUS	ECHANTILLONS POSITIFS (%)	AUTEURS
ISRAEL	<i>Entérovirus</i>	7364 UFP.L ⁻¹		FATTAL and NISHMI (1977)
FRANCE	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i> <i>Adénovirus</i>		60 %	OUVRARD <i>et al.</i> , (1982)
TCHECOSLOVAQUIE	<i>Entérovirus</i>		56 %	ZDRAZILEK <i>et al.</i> , (1982)
BRESIL	<i>Entérovirus</i>	0 à 3300 UFP.L ⁻¹		MARTINS <i>et al.</i> , (1983)
FRANCE	<i>Rotavirus</i>			SCHWARTZBROD <i>et al.</i> , (1983)
GRANDE BRETAGNE	<i>Entérovirus</i>	57500 UFP.L ⁻¹	80 %	MORRIS, (1984)
CANADA	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>	95 NPPUC.L ⁻¹	100 %	PAYMENT <i>et al.</i> , (1986)
ESPAGNE	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>	267 UFP.L ⁻¹ 237 FF.L ⁻¹	100 % 100 %	BOSCH <i>et al.</i> , (1986)
NOUVELLE ZELANDE	<i>Entérovirus</i>	50 à 479 UFP.L ⁻¹	67,5 %	LEWIS <i>et al.</i> , (1986)
GRECE	<i>Entérovirus</i>	32 à 700 CPU.L ⁻¹	100 %	KRIKELIS <i>et al.</i> , (1988)
ESPAGNE	<i>Rotavirus</i>	666 à 95000 FF.L ⁻¹	100 %	BOSCH <i>et al.</i> , (1988b)
ETATS UNIS	<i>Entérovirus</i>	100 à 242500 UFP.L ⁻¹		DAHLING <i>et al.</i> , (1989)
ITALIE	<i>Entérovirus</i>		25 %	CARDUCCI <i>et al.</i> , (1995)
ITALIE	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>	10 ² à 10 ⁴ MPNCU.L ⁻¹	83 % 100 %	AULICINO <i>et al.</i> , (1995)
ITALIE	<i>Entérovirus</i>		58 %	CARDUCCI <i>et al.</i> , (1995)
FRANCE	<i>Entérovirus</i>	3,45 UFP.L ⁻¹	94,7 %	VILAGINES <i>et al.</i> , (1997)
ITALIE	<i>Entérovirus</i>		80 %	CABRIELLI <i>et al.</i> , (1997)
ITALIE	VHA	Génome	80 %	DIVIZIA <i>et al.</i> , (1998)
ESPAGNE	VHA	Génome	100 %	ESPIGARES <i>et al.</i> , (1999)
PAYS-BAS	NLV	9.10 ⁴ RCP.L ⁻¹		LODDER <i>et al.</i> , (2000)
	<i>Rotavirus</i>	7,6.10 ² RCP.L ⁻¹		

NPPUC : Nombre le plus probable d'unités cytopathiques
CPU: Cytopathic Unit
RCP : RNA containing particles

UFP: Unité Formant Plage
VHA : Virus de l'hépatite A

FF : Foyer de fluorescence
N.L.V. : *Norwalk-like virus*

Tableau 5
Virus et Boues primaires

VIRUS	DENSITE VIRALE	REFERENCES
<i>Rotavirus</i>	$1,1 \times 10^2 \text{UFP} \cdot 10\text{g}^{-1}$ (MS)	BOSCH <i>et al.</i> , (1986)
<i>Entérovirus</i>	$7,7 \times 10^2 \text{UFP} \cdot 10\text{g}^{-1}$ (MS)	SCHWARTZBROD <i>et al.</i> , (1987b)
	3×10^2 à $5,2 \times 10^2 \text{UFP} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (MH)	BERG and SULLIVAN, (1988)
	<1 à $5,3 \times 10^3 \text{UFP} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (MH)	PIKE <i>et al.</i> , (1988)
	$9,8 \times 10^2$ à $1,2 \times 10^4 \text{UFP} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (MH)	RAO <i>et al.</i> , (1988)
	$9,7$ à $1,2 \times 10^2 \text{UFP} \cdot 100 \text{mL}^{-1}$ (MH)	ALBERT <i>et al.</i> , (1990)
	$1,5 \times 10^0$ à $1,3 \times 10^1 \text{UFP} \cdot 10\text{g}^{-1}$ (MS)	MARTIN <i>et al.</i> , (1990)
	$2,5 \times 10^3 \text{UFP} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (MH)	CARRINGTON <i>et al.</i> , (1991)
	$4,4 \times 10^1$ à $7 \times 10^3 \text{NPPUC} \cdot 10\text{g}^{-1}$ (MS)	SOARES <i>et al.</i> , (1994)
	10^2 à $10^4 \text{UI} \cdot 100\text{mL}^{-1}$ (MH)	FAYOUX, (1995)
	$1,6 \times 10^4 \text{UI} \cdot 10\text{g}^{-1}$ (MS)	HU <i>et al.</i> , (1995)

MS : Matière sèche

MH : Matière Humide

UI : Unité Infectieuse

Tableau 6
Virus et eaux usées épurées

NATURE DU TRAITEMENT	TYPE DE VIRUS	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANTILLONS POSITIFS	AUTEURS
Traitement biologique	<i>Entérovirus</i>	0,5 à 14 NPPUC.L ⁻¹		HUGUES <i>et al.</i> , (1985)
Sédimentation primaire	<i>Entérovirus</i> <i>Rotavirus</i>	4 UFP.L ⁻¹ 10 FF.L ⁻¹	87 % 75 %	BOSCH <i>et al.</i> , (1986)
Sédimentation primaire	<i>Adénovirus</i> <i>Entérovirus</i>	50 à 700 UFP.L ⁻¹ 120 à 580 UFP.L ⁻¹		KRIKELIS <i>et al.</i> , (1986)
Boues activées	<i>Entérovirus</i> et <i>Adénovirus</i>	1,4 NPPUC.L ⁻¹	79 %	PAYMENT <i>et al.</i> , (1986)
Traitement biologique	<i>Entérovirus</i>	72 à 457 UFP.L ⁻¹	100 %	LEWIS <i>et al.</i> , (1986)
Boues activées	<i>Entérovirus</i>	2 à 5500 UFP.L ⁻¹		DAHLING <i>et al.</i> , (1989)
?	<i>Poliovirus</i> <i>Coxsackie B5</i> <i>Adénovirus</i>		100 %	KUEH and GROHMAN (1989)
Boues activées	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>	0 à 10 ² MPNCU.L ⁻¹	27 % 100 %	AULICINO <i>et al.</i> , (1995)
Sédimentation primaire	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>	0 à 10 ³ MPNCU.L ⁻¹	75 % 100 %	AULICINO <i>et al.</i> , (1996)
Boues activées	<i>Entérovirus</i>	0,14 UFP.L ⁻¹	45 %	VILAGINES <i>et al.</i> , (1997)
Boues activées	<i>Entérovirus</i>		30 %	GABRIELLI <i>et al.</i> , (1997)
Boues activées	<i>Entérovirus</i>	Génome	84 %	GANTZER <i>et al.</i> , (1997)
Boues activées + chlorination 0,2 mg.L ⁻¹	VHA	Génome	30 %	DIVIZIA <i>et al.</i> , (1998)
Boues activées	VHA	Génome	100 %	ESPIGARES <i>et al.</i> , (1999)
Traitement biologique	NLV	1,1 10 ⁴ RCP.L ⁻¹		LODDER <i>et al.</i> , (2000)

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques

FF : Foyers de Fluorescence

NLV : Norwalk-like virus

UFP : Unité Formant Plage

VHA : Virus de l'hépatite A

RCP : RNA containing particles

Tableau 7 - Virus et eaux de rivières et de lacs

LOCALISATION DE LA RIVIERE	TYPE DE VIRUS	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANTILLONS POSITIFS	AUTEURS
Rio Ripoll Espagne	<i>Entérovirus</i>	15,5 NPPUC.L ⁻¹	68 %	BOSCH <i>et al.</i> , (1986)
Rio Besos Espagne	<i>Entérovirus</i>	14 UFP.L ⁻¹	100 %	SCHWARTZBROD <i>et al.</i> , (1987b)
Tibre Italie	Virus de l'hépatite A		80 %	DIVIZIA <i>et al.</i> , (1989)
Rivière S RDA	<i>Entérovirus</i>	2 à 56 NPPUC.L ⁻¹	82 %	WALTER <i>et al.</i> , (1989)
Lac majeur Italie	<i>Entérovirus</i>	Virus infectieux	12 %	AULICINO <i>et al.</i> , (1991)
Lac Hollande	<i>Entérovirus</i>	Virus infectieux	10 %	VAN OLPHEN <i>et al.</i> , (1991)
Lac Maracaibo Venezuela	<i>Entérovirus</i>	Virus infectieux	50 %	BOTERO <i>et al.</i> , (1992)
River Lagan Ireland	<i>Entérovirus</i>	0,5 à 59 UFP.L ⁻¹	100 %	HUGUES <i>et al.</i> , (1992)
Safo river Japon	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i> <i>Adénovirus</i>	0 à 190 UFP.L ⁻¹ 0 à 325 UFP.L ⁻¹ 0 à 25 UFP.L ⁻¹		TANI <i>et al.</i> , (1995)
Rivières et lacs Suisse	<i>Entérovirus</i>	Génome	17,5 %	GILGEN <i>et al.</i> , (1995)
Rivière Fort de France Martinique	<i>Entérovirus</i>	Génome	32 %	POMMEPUY <i>et al.</i> , (1995)
Rivière Pays-Bas	NLV	1,1 10 ³	83 %	LODDER <i>et al.</i> , (2000)
Lac Floride -USA	<i>Entérovirus</i>		40 %	QUINTERO-BETTENCOURT <i>et al.</i> , (2000)

NPPUC: Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques
UFP : Unité Formant Plage

RCP : RNA containing particles
NLV : *Norwalk-like virus*

Tableau 8
Virus et eaux de mer

LIEU DE PRELEVEMENT	TYPE DE VIRUS	QUANTITE DE VIRUS	% d'échantillons positifs	AUTEURS
Méditerranée	<i>Entérovirus</i> et <i>Adénovirus</i>	0,05 à 6,5 NPPUC.L ⁻¹		HUGUES <i>et al.</i> , (1980)
Océan Atlantique (Miami)	<i>Entérovirus</i>	0,05 à 0,14 UFP.L ⁻¹		SCHAEIBERGER <i>et al.</i> , (1982)
Mer d'Irlande	<i>Entérovirus</i>	0,1 à 0,8 UFP.L ⁻¹		TYLER, (1982)
Méditerranée (Tel-Aviv)	<i>Entérovirus</i>	1 à 85 UFP.L ⁻¹		FATTAL <i>et al.</i> , (1983)
Océan Atlantique	<i>Entérovirus</i>	0,05 à 1,35 UFP.L ⁻¹		MARQUES et MARTINS, (1983)
Golfe du Texas	<i>Rotavirus</i> <i>Entérovirus</i>	0,007 à 0,03 UFP.L ⁻¹ 0,3 à 2,6 UFP.L ⁻¹		RAO <i>et al.</i> , (1984) et (1986b) RAO <i>et al.</i> , (1986 (b))
Méditerranée	<i>Entérovirus</i>	5 à 145 CPU.L ⁻¹	87,5 %	KRIKELIS <i>et al.</i> , (1988)
Océan Pacifique (Australie)	<i>Poliovirus</i> <i>Adénovirus</i>		60 %	KUEH and GROHMANN (1989)
Mer des Caraïbes	<i>Poliovirus</i> <i>Echovirus</i>		50 %	BOTERO <i>et al.</i> , (1992)
Irlande	<i>Entérovirus</i>	0 à 182 UFP.L ⁻¹	43 %	HUGUES <i>et al.</i> , (1992)
Mer Tyrrhénienne (Italie)	<i>Entérovirus</i> <i>Réovirus</i>		30 %	PATTI <i>et al.</i> , (1996)
Mer Tyrrhénienne Eaux d'estuaires (Italie)	<i>Réovirus</i> <i>Entérovirus</i>		100 %	PATTI <i>et al.</i> , (1996)
Mer du Nord	<i>Entérovirus</i>		58 %	PALLIN <i>et al.</i> , (1997)
Océan Atlantique	<i>Entérovirus</i>		50 %	QUINTERO-BETTENCOURT <i>et al.</i> , (2000)

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques
CPU : Cytopathic Units

UFP : Unité Formant Plage

Tableau 9 - Virus et Sédiments

NATURE DES SEDIMENTS	TYPE DE VIRUS	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANTILLONS POSITIFS	AUTEURS
Sédiments marins Etats Unis	<i>Entérovirus</i>	39 à 398 UFP.kg ⁻¹ (MH)	47 %	RAO <i>et al.</i> , (1984)
Sédiments marins Etats Unis	<i>Rotavirus</i>	800 à 3800 UFP.kg ⁻¹ (MH)	40 %	RAO <i>et al.</i> , (1984)
Sédiments estuariens Etats Unis	<i>Entérovirus</i>	2000 à 2800 UFP.L ⁻¹		RAO <i>et al.</i> , (1986)
Sédiments marins Etats Unis	<i>Entérovirus</i>	2160 à 9830 UFP.L ⁻¹		RAO <i>et al.</i> , (1986)
Sédiments fluviaux Espagne	<i>Entérovirus</i>	440 à 100000 UFP.kg ⁻¹ (MH)	100 %	SCHWARTZBROD <i>et al.</i> , (1988)
Sédiments marins Espagne	<i>Entérovirus</i>	5 à 73 UFP.kg ⁻¹ (MH)	25 à 100 %	BOSCH <i>et al.</i> , (1988- a)
Sédiments marins	<i>Coxsackie B₅</i>		50 %	KUEH and GROHMANN, (1989)
Sédiments marins Espagne	<i>Rotavirus</i>	140 FF.kg ⁻¹ (MH)	57 %	JOFRE <i>et al.</i> , (1989)
Sédiments fluviaux France	<i>Entérovirus</i>	7 à 90 UFP.kg ⁻¹ (MH)		ALBERT, (1989)
Sédiments estuariens France	<i>Entérovirus</i>	25 à 203 UFP.kg ⁻¹ (MH)		ALBERT, (1989)
Sédiments lacustres	<i>Entérovirus</i>		80 %	BOTERO <i>et al.</i> ,, (1992)

UFP : Unité Formant Plage
FF : Foyers de Fluorescence

MH : Matières Humides

Tableau 10 - Virus isolés dans les eaux utilisées pour l'alimentation humaine

PAYS D'ISOLEMENT	TYPE DE VIRUS ISOLES	AUTEURS
ISRAEL	P1 ; E7	MARZOUK <i>et al.</i> , (1980)
CANADA	P1, 2, 3	SEKLA <i>et al.</i> , (1980)
ETATS UNIS	CB3	HEJKAL <i>et al.</i> , (1982)
GRANDE BRETAGNE	P1, 2, 3 ; CB3, 5 E7, 11, 22	TAYLOR, (1982)
MEXIQUE	Rota, Entéro CB3, 4, 5, 6	DEETZ <i>et al.</i> , (1984)
FRANCE	P1, 3, CA CB4 ; E11	FESTY, (1984)
MEXIQUE	Rota, Adéno, Entéro	KESWICK <i>et al.</i> , (1984)
GRANDE BRETAGNE	P1	SLADE, (1984)
CHINE	Adéno, CB1, 5	ZHANG <i>et al.</i> , (1984)
ISRAEL	Entéro	GUTTMAN-BASS et FATTAL, (1985)
CANADA	P3, CB5	PAYMENT <i>et al.</i> , (1985)
FRANCE	Réo	SCHWARTZBROD <i>et al.</i> , (1985)
AFRIQUE DU SUD	Entéro (17 %) Adéno (4%) VHA (3 %)	GRABOW <i>et al.</i> , (1999)

Entéro : *Entérovirus*
 CB : *Coxsackie B virus*
 Réo : *Réovirus*

CA : *Coxsackie A virus*
 Adéno : *Adénovirus*
 P : *Poliovirus*

Rota : *Rotavirus*
 E : *Echovirus*
 VHA : *Virus de l'hépatite A*

3. - Présence virale dans les coquillages

Les coquillages, de par leur mode d'alimentation par filtration de grandes quantités d'eau de mer, sont susceptibles non seulement de retenir mais aussi d'accumuler des virus au niveau de leur appareil digestif voire de leurs tissus. Cette bioaccumulation est un phénomène très rapide (\leq 1 heure) et très important puisque des facteurs de concentration $\left(\frac{\text{UFP g}^{-1} \text{ de tissus}}{\text{UFP ml}^{-1} \text{ d'eau}} \right)$ de 1,5 à 32 ont été rapportés par MITCHELL *et al.*, (1966) et DIGIROLAMO *et al.*, (1975) pour le *Poliovirus* de type 1 et les huîtres.

L'importance de ces taux de bioaccumulation virale dépend du type de coquillage, de son état physiologique, du type de virus, de sa quantité et surtout de son état libre ou adsorbé sur des particules. Il a en effet été montré notamment par METCALF *et al.* (1979) et BARON (1986) que la fixation des virus sur des supports tels que fèces, kaolinite ou algues unicellulaires augmentait le taux d'accumulation dans de grandes proportions.

Tableau 11

Virus isolés à partir de coquillages placés en milieu naturel

COQUILLAGES	POURCENTAGE DE PRELEVEMENTS POSITIFS	VIRUS	QUANTITE DE VIRUS (UFP)	REFERENCES
Huîtres	20%	<i>Poliovirus 1</i> <i>Echovirus 1</i>	0,17 à 0,59.g ⁻¹	GOYAL <i>et al.</i> (1979)
	40%	<i>Poliovirus 1</i> <i>Echovirus 1</i>	0,06 à 2,24.g ⁻¹	
Huîtres	9%	<i>Poliovirus 1</i>	0,12.g ⁻¹	ELLENDER <i>et al.</i> (1980)
	34%	<i>Poliovirus 1-2</i> <i>Echovirus 24</i>	1,46.g ⁻¹	
Clams	29%	<i>Echovirus 20-23</i> <i>Poliovirus 1</i>	0,1 à 0,16.g ⁻¹ 0,1 à 0,3.g ⁻¹	VAUGHN <i>et al.</i> (1980)
	40%			
Huîtres	38%	<i>Echovirus 15-2</i> <i>Coxsackie B3</i>	0,08 à 0,48.g ⁻¹ 0,48 à 2.g ⁻¹	
	25%			
Huîtres	13%			SOBSEY <i>et al.</i> (1980)
Clams	40%	<i>Poliovirus 1</i> <i>Echovirus 7-27</i>	0,008 à 0,7.g ⁻¹	WAIT <i>et al.</i> (1983)
	23%	<i>Poliovirus 1</i>	0,008 à 0,48.g ⁻¹	
Moules, Huîtres, Coques	2%	Virus de l'hépatite A		PIETRI et MUNRO (1989)
Coquillages		<i>Entérovirus</i>		CHUNG <i>et al.</i> , (1996)
Huîtres	40%	<i>Virus entériques</i>	7,3 NPPUC 100 g ⁻¹	CHUNG <i>et al.</i> , (1996)
	32%	<i>Virus entériques</i> <i>genome</i>		
Moules	26%	<i>Entérovirus</i> génome		LE GUYADER <i>et al.</i> , (1998)
Huîtres	20%	<i>Entérovirus</i> génome		LE GUYADER <i>et al.</i> , (1998)
Huîtres	56%	SRSV génome		HENSILWOOD <i>et al.</i> , (1998)
Moules	13%	Virus de l'hépatite A	Génome	CROCI <i>et al.</i> , (1999)
Moules	12%	Virus de l'hépatite A	Génome	LEE <i>et al.</i> , (1999)
Huîtres	6%	Virus de l'hépatite A		CHUNG <i>et al.</i> , (1996)
Coques et Moules	72 %	Virus de l'hépatite A		CRANCE <i>et al.</i> , (1995)
Coquillages	21%	<i>Norwalk-like virus</i>		LEES <i>et al.</i> , (1995)
Moules	35%	<i>Norwalk-like virus</i>		LE GUYADER <i>et al.</i> , (2000)
Huîtres	23%	<i>Norwalk-like virus</i>		
Coquillages		<i>Adénovirus</i>		PINA <i>et al.</i> , (1998)

N.D. : Non déterminé

SRSV : Small Round Structured Virus

Enfin, il a été prouvé que les virus adsorbés par les coquillages étaient susceptibles d'être rejetés dans le milieu extérieur et qu'il existait un véritable cycle de bioaccumulation-relargage (LANDRY *et al.*, 1982 ; GAILLOT *et al.*, 1988).

Des virus pathogènes pour l'homme ont ainsi été isolés à partir de coquillages à la fois dans des zones autorisées et interdites à la production et au ramassage (Tableau 11).

En conclusion et en considérant à titre d'exemple uniquement le cas des *Entérovirus*, les densités virales moyennes dans le milieu hydrique sont estimées dans le tableau 12.

Tableau 12
Contamination moyenne du milieu hydrique par des *Entérovirus*

	<i>Entérovirus</i> infectieux (culture cellulaire)	
	Densité moyenne (UFP.L ⁻¹)	Pourcentage moyen d'échantillons positifs
Eau usée brute	10-10 ²	80-100%
Eau usée traitée	1-10	50-80%
Eau de rivière	0,1-1	20-50%
Eau de mer	0,01-1	10-30%
Eau d'alimentation	0,001	

Références

ALBERT M. (1989). Extraction des virus entériques des boues résiduelles et des sédiments. Thèse université de Metz (France). 181 pages.

ALBERT M., BIZIAGOS E., CRANCE J.M., DELOINCE R. et SCHWARTZBROD L. (1990). Détection des virus entériques cultivables in vitro et de l'antigène du virus de l'hépatite A dans des boues primaires de station d'épuration. J. Fr. Hydrol. **2**, 275-283.

AULICINO F.A., MASTRANTONIO A., ORSINI P., BELLUCCI C., MUSCILLO M. and LAROSA G. (1996). Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome. Water, Air, Soil pollut., **91**, 327-334.

AULICINO F.A., PATTI A.M., MUSCILLO M., GABRIELI R., DE FILIPPIS P. and ORSINI P. (1991). Viruses in marine waters. L'Igiene Moderna, **96**, 583-592.

BARON D. (1986). Etude des problèmes méthodologiques posés par la mise en évidence d'une contamination virale des coquillages comestibles, cas de l'huître. Rap. Minist. Environnement, n°85166, PARIS

BERG G. and SULLIVAN G. 1988. Optimum pH levels for eluting *Entéroviruses* from sludge solids with beef extract. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1880-1881

BLACKLOW N.R. and GREENBERG H.B. (1991). Viral gastroenteritis. N. Engl. J. Med., **325**, 252-264.

BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and JOFRE J. (1986). Survey of viral pollution in Besos river. J. Wat. Poll. Control Fed., **58**, 87-91.

BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and JOFRE J. (1988-a). Occurrence of *Entérovirus* on marine sediment along the coast of Barcelone (Spain). Can. J. Microbiol., **34**, 921-924.

BOSCH A., PINTO R.M., BLANCH A.R. and JOFRE J. (1988-b). Detection of human *Rotavirus* in sewage through two concentrations procedures. Wat. Res., **22**, 343-348.

BOTERO L., MONTIEL M. and PORTO L. (1992). Recovery of *Entéroviruses* from water and sediment of lake Maracaibo, Venezuela. J. Environ. Sci. Health, **A27**, 2213-2226.

CARDUCCI A., ARRIGHI S. and RUSCHI A. (1995). Detection of coliphages and *Entéroviruses* in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. Letters Appl. Microbiol., **21**, 207-209.

CARRINGTON E.G., PIKE E.B., AUTY D. and MORRIS R. (1991). Destruction of faecal bacteria, *Entéroviruses* and ova of parasites in wastewater sludge by aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic digestion. Wat. Sci. Technol. **24**, 377-380

CHUNG H., JAYKUS L.A. and SOBSEY M.D. (1996). Detection of human enteric viruses in

oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 3772-3778.

CLARKE N.A. (1961). Removal of *Enteric viruses* from sewage by activated sludge treatment. Amer. J. Publ. Hlth, **51**, 1118-1120.

CLAYTON E.T., MYINT K.S. and SNITBHAN R. (1995). Viremia, fecal shedding and IgM and IgG responses. J. Infect. Dis., **172**, 927-933.

COURSAGET P., MAUPAS P., HIBON P., LESAGE G. and HUBERT M. (1980). Hepatitis A diagnosis in man : radioimmuno assay for hepatitis A antigen detection in faeces. J. Med. Virol., **6**, 53-60.

CRANCE J.M., APAIRE-MARCHAIS V., LEVEQUE F., BERIL C., LE GUYADER F., JOUAN F., SCHWARTZBROD L. and BILLAUDEL S. (1995). Detection of hepatitis A virus in wild shellfish. Mar. Poll. Bull., **30**, 372-375.

CROCI L., DE MEDICI G., MORACE G. *et al.*, (1999). Detection of hepatitis virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. Int. J. Food. Microbiol., **48**, 67-71.

DAHLING D.R., SAFFERMANN R.S. and WRIGHT B.A. (1989). Isolation of *Entérovirus* and *Réovirus* from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 503-506.

DEETZ T.R., SMITH E.M., GOYAL S.M., GERBA C.P., VOLLET J.J., TSAI L., DUPONT H.L. and KESWICK B.H. (1984). Occurrence of *Rota* and *Entéroviruses* in drinking and environmental waters in a developing nation. Wat. Res., **18**, 567-572.

DI GIROLAMO R., LISTON J. and MATCHES J. (1975). Uptake and elimination of *Poliovirus* by west coast oysters. Appl. Microbiol., **29**, 260-264.

DIVIZIA M., DE FILIPPIS P., DI NAPOLI A., VENUTI A., PERES B. and PANA A. (1989). Isolation of wild type hepatitis A virus from the environment. Wat. Res., **23**, 1155-1160.

DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M. and PANA A. (1998). Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. Microbiologica, **21**, 161-167.

ELLENDER R.D., MAPP J.B., MIDDLEBROOKS B.L., COOK D.W. and CAKE E.W. (1980). Natural *Entérovirus* and faecal coliform contamination of gulf coast oysters. J. Food Prot., **43**, 105-110.

ESPIGARES M., GARCIA F., FERNANDES-CREHUET M., ALVAREZ A. and GALVEZ R. (1999). Detection of hepatitis A virus in wastewater. Environ. Tex., **14**, 391-396.

FATTAL B. and NISHMI M. (1977). *Entérovirus* types in Israel sewage. Wat. Res., **11**, 393-396.

FATTAL B., VASL R.J., KATZENELSON E. and SHUVAL H.I. (1983). Survival of bacterial indicator organisms and *Enteric viruses* in the mediterranean coastal waters of Tel-Aviv. Wat. Res., **17**, 397-402.

FAYOUX C. (1995). Valorisation des boues et des déchets : les approches européennes "Les législations concernant le traitement et l'élimination des boues", séminaire C.I.R.S.E.E., 8-9 juin 1995, Paris, Vol 2

FESTY B. (1984). In "Survey of virus isolation data from environmental samples". BITTON G. *et al.*, eds. Health effects research laboratory. US Environmental Protection Agency, Cincinnati OH.

GABRIELLI R., DIVIZIA M., DONIA D., RUSCIO V., BONADONNA L., DIOTALLEVI C., VILLA L., MANZONE G. and PANA A. (1997). Evaluation of the wastewater treatment plant of Rome Airport. Wat. Sci. Tech., **35**, 193-196.

GAILLOT D., TERVER D., FINANCE C. and SCHWARTZBROD L. (1988). Improved method for contamination of mussels by *Poliovirus*. Int. J. Food Microbiol., **6**, 333-339.

GANTZER C., SENOUCI S., MAUL A., LEVY Y. and SCHWARTZBROD L. (1997). *Entérovirus* genomes in wastewater : concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. J. Virol. Met., **65**, 265-271.

GILGEN M., WEGMULLER B., BURKHALTER P., BUHLER H.P., MULLER V., LUTHY J. and CANDRIAN V. (1995). Reverse transcription PCR to detect *Entéroviruses* in surface water. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 1226-1231.

GOYAL S.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1979). Human *Entéroviruses* in oysters and their overlaying waters. Appl. Environ. Microbiol., **37**, 572-581.

GRABOW WOK, BOTMA K.L., DE VILLIERS J.C., CLAY C.J. and ERASMUS B. (1999). Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of *Poliovirus* in wastewater. Bull. WHO, **77**, 973-978.

GRABOW WOK, TAYLOR M.B., CLAY C.G. and DE VILLIERS J.C. (1999). Molecular detection of viruses in drinking water. Implications for safety and disinfection. Second conference International life sciences institute « The safety of water disinfection » Miami Beach. USA, November 1999.

GRIMWOOD K., CARZINO R., BARNES G.L. and BISHOP R.F. (1995). Patients with enteric *Adénovirus* gastroenteritis admitted to an Australian pediatric teaching hospital from 1981 to 1992. J. Clin. Microbiol., **33**, 131-136.

GUTTMANN-BASS N. and FATTAL B. (1985). Analysis of tapwater for viruses : results of a survey. Wat. Sci. Tech., **17**, 89-94.

HEJKAL T., KESWICK B. LABELLE R., GERBA C.P., SANCHEZ Y., DREESMAN G., HAFKIN B. and MELNICK J.L. (1982). Viruses in a community water supply associated

with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. J. Am. Water Works Assoc., **74**, 318-321.

HENSHILWOOD K., GREEN J. and LEES D.N. (1998). Monitoring the marine environment for small round structured viruses (SRSVS) : A new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish. Wat. Sci. Tech., **38**, 51-56.

HU C.J., GIBBS R.A., HO G.E., PHILLIPS P. and UNKOVICH I. (1995). Pathogen densities in wastewater sludge treated by anaerobic digestion and dewatering 3rd Intl Conf. Appropriate Waste Mgmt Technologies for developing Countries, NEERI, Nagpur 23-31

HUGUES B., ANDRE M., PLANTAT J.L. and CHAMPSAUR H. (1993). Comparison of glass wool and glass powder methods for concentration of viruses from treated waters. Zentral. Hyg. Umweltmed., **193**, 440-449.

HUGUES B., CINI A., PLISSIER M. et LEFEBVRE J.R. (1980). Recherche des virus dans le milieu marin à partir d'échantillons de volumes différents. Eau Quebec, **13**, 199-203.

HUGUES B., PIETRI C. and ANDRE M. (1985). Estimation of virus density in sewage effluents by two counting techniques : comparison of precisions as a function of inoculum volume. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B **181**, 409-417.

HUGUES M.S., COYLE P.U. and CONNOLLY J.H. (1992). *Entéroviruses* in recreational waters of Northern Ireland. Epidemiol. Infect. **108**, 529-536.

JOFRE J., BLASI M., BOSCH A. and LUCENA F. (1989). Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments. Wat. Sci. Tech., **21**, 15-19.

KESWICK B.H., GERBA C.P., DUPONT H.L. and ROSE J.B. (1984). Detection of *Enteric viruses* in treated drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1290-1294.

KRIKELIS V., MARKOULATOS P. and SPYROU N. (1986). Viral pollution of coastal waters resulting from the disposal of untreated sewage effluent. Wat. Sci. Tech., **18**, 43-48.

KUEH C.S.W. and GROHMANN G.S. (1989). Recovery of viruses and bacteria in waters off Bondi Beach : a pilot study. Med. J. Austr., **151**, 632-638.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M., VICALE T.J. and MANN R. (1982). Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated *Poliovirus* in oysters. Appl. Environ. Microbiol., **44**, 1362-1369.

LE GUYADER F., ESTES M.K., KOPECKA H., LECANN P. et POMMEPUY M. (2000). Apport de la biologie moléculaire pour détecter les virus entériques humains dans les coquillages. Virologie, **4**, 241-247.

LE GUYADER F., MIOSSEC L., HAUGARREAU L., DUBOIS E., KOPECKA H. and POMMEPUY M. (1998). RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds

over a 21 month period. Wat. Sci. Tech., **38**, 45-50.

LEE T., YAM W.C., TAM T.Y., HO B.S.W. and BROOM M.J. (1999). Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (*Perna viridis*). Wat. Res., **33**, 885-889.

LEES D.N., HENSILWOOD K., GALLIMORE C.L. and BROWN D.W.G. (1995). Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 4418-4424.

LEWIS G.D., AUSTIN F.J., LOUTIT M.W. and SHARPLES K. (1986). *Entérovirus* removal from sewage : the effectiveness of four different treatment plants. Wat. Res., **20**, 1291-1297.

LODDER W.J., NIJST A., HOLWERDA A., LEENEN E.J. and DE RODA HUSMA A.M. (2000). Presence of Norwalk-like Caliciviruses in Dutch surface waters. 1st world water congress of the International Water Association 5IWA), Paris, Juillet 2000.

MARQUES E. and MARTINS M.T. (1983). *Entérovirus* isolation from seawater from beaches of Baixada Santista. Ninth Latin American Congress for Microbiology, Sao Paulo, Brazil.

MARTIN J.H., BOSTIAN H.E. and STERN G. (1990). Reductions of enteric microorganisms during aerobic sludge digestion Water Res. **24**,1377-1385.

MARTINS M.T., SOARES L.A., MARQUES E. and MOLINA A.G. (1983). Human *Enteric viruses* isolated from influents of sewage treatment plants in Sao Paulo, Brazil. Wat. Sci. Tech., **15**, 69-73.

MARZOUK Y., GOYAL S.M. and GERBA C.P. (1980). Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israël. Wat. Res., **14**, 1585-1590.

MELNICK J.L. (1996). *Entérovirus, Poliovirus, Coxsackieviruses, Echoviruses* and newer *Entéroviruses*. In FIELDS B.N., KNIPE D.M., eds Virology, New-York : Lippincott Raven Publishers, 655-712.

METCALF T.G., MULLIN B., ECKERSON D., MOULTON E. and LARKIN E.P. (1979). Bioaccumulation and depuration of *Entéroviruses* by the soft shelled clam, *Mya arenaria*. Appl. Environ. Microbiol., **38**, 275-282.

MITCHELL J.R., PRESNELL M.W., AKIN E., CUMMINS J.M. and LIU O.C. (1966). Accumulation and elimination of *Poliovirus* by the eastern oyster. Amer. J. Epid., **84**, 40-50.

MORRIS R. (1984). Reduction of naturally occurring *Entéroviruses* by wastewater treatment processes. J. Hyg. Camb., **92**, 97-103.

NICAND E., TEYSSOU R. et BUISSON Y. (1998). Le risque fécal viral en 1998. Virologie, **2**, 103-116.

OUVRARD S., COIRON C., PREVOT J. et FESTY B. (1982). Bilan d'une surveillance virologique systématique des eaux résiduaires en région parisienne. Tech. Sci. Munic. L'Eau, **8-9**, 427-433.

PALLIN R., WYN-JONES A.P., PLACE B.M. and LIGHTFOOT N.F. (1997). The detection of *Entérovirus* in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. J. Virol. Met, **67**, 57-67.

PATTI A.M., AULICINO F.A., SANTI A.L., MUSCILLO M., ORSINI P., BELLUCINI C., LA ROSA G., MASTROENI I. and VOLTERA L. (1996). Enteric virus pollution of tyrrhenian areas. Water, Air and Soil pollut, **88**, 261-267.

PAYMENT P., FORTIN S. and TRUDEL M. (1986). Elimination of human *Enteric viruses* during conventional wastewater treatment by activated sludge. Can. J. Microbiol., **32**, 922-925.

PAYMENT P., TRUDEL M. and PLANTE R. (1985). Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 1418-1428.

PIETRI C. et MUNRO J. (1989). Recherche de la contamination virale des coquillages. Rapport contrat INSERM-IFREMER - n° 875580385.

PIKE E. B., CARRINGTON E. G. and HARMAN S. A. (1988). Destruction of salmonellas, *Entéroviruses* and ova of parasites in wastewater sludge by pasteurisation and anaerobic digestion. Wat. Sci. Technol. **20**,337-343

PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J. and GIRONES R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish : Human *Adénovirus* detection by PCR as an index of human viruses. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 3376-3382.

POMMEPUY M., DERRIEN A., LE GUYADER F., MENARD D., CAPRAIS M.P., DUBOIS E., DUPRAY E. and GOURMELON M. (1995). Microbial water quality on a Caribbean island (Martinique). Small Islands : Marine Sciences and sustainable development coastal and estuarine studies, **51**, 284-297.

PUIG M., JOFRE J., LUCENA F., ALLARD A., WADELL G. and GIRONES R. (1994). Detection of *Adénoviruses* and *Entéroviruses* in polluted waters by nested PCR amplification. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2963-2970.

QUINTERO-BETANCOURT W., LIPP E., Mc LAUGHLIN M., CALLAHAN M., HUFFMAN D. and ROSE J.B. (2000). Pathogen specific monitoring of ground water surface and reclaimed effluents in the state of Florida. 1st world water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

RAO C., METCALF T. G. and MELNICK J. L. (1988). Virus humains dans les sédiments, les boues et les sols. Bull. OMS **64**, 341-356.

RAO V.C., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1986a). Development of a method for concentration of *Rotavirus* and its application to recovery of *Rotaviruses* from estuarine waters. Appl. Environ. Microbiol., **52**, 484-488.

RAO V.C., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1986b). Human viruses in sediments, sludges, and soils. W.H.O. Bull., **64**, 1-14.

RAO V.C., SEIDEL K.M., GOYAL S.M., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1984). Isolation of *Entéroviruses* from water suspended solids and sediments from Galveston Bay : survival of *Poliovirus* and *Rotavirus* adsorbed to sediments. Appl. Environ. Microbiol., **48**, 404-409.

SCHAIBERGER G.E., EDMOND T.D. and GERBA C.P. (1982). Distribution of *Entéroviruses* in sediments contiguous with a deep marine sewage outfall. Wat. Res., **16**, 1425-1428.

SCHWARTZBROD J., LUCENA F., BOSCH A., BERIL C., SCHWARTZBROD L. et PARES R. (1987-a). Influence des eaux continentales et des eaux usées sur la contamination microbiologique des sédiments marins. J. Fr. Hydrol., **18**, 141-156.

SCHWARTZBROD J., MATHIEU C., THEVENOT M.T., BARADEL J.M. and SCHWARTZBROD L. (1987-b). Wastewater sludge : parasitological and virological contamination. Wat. Sci. Tech., **19**, 33-40.

SCHWARTZBROD L. (1991). Virus et milieux hydriques. In "Virologie des milieux hydriques." SCHWARTZBROD L., ed. Tech. et Doc., Paris.

SCHWARTZBROD L., BENNANI A., DE LAVERGNE E. et SCHWARTZBROD J. (1983). Détection des *Rotavirus* dans les eaux usées par immuno-enzymologie. Rev. Fr. Sciences Eau, **2**, 145-152.

SCHWARTZBROD L., FINANCE C., AYMARD M., BRIGAUD M. and LUCENA F. (1985). Recovery of *Réovirus* from tapwater. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig., B., **181**, 383-389.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F. and FINANCE C. (1979). Etude quantitative de la pollution virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires. J. Fr. Hydrol., **10**, 7-20.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F., BOSCH A. et SCHWARTZBROD J. (1988). Microorganismes, eau de mer et sédiments : étude du site de Barcelone. Océanis, **14**, 51-59.

SCHWARTZBROD L. and MATHIEU C. (1986). Virus recovery from wastewater treatment plant sludge. Wat. Res., **8**, 1011-1013.

SEKLA L. STACKIW W., KAY C. and VAN BUCKENHOUT L. (1980). *Enteric viruses* in renovated water in Manitoba. Can. J. Microbiol., **26**, 518-523.

SLADE J.S. (1984). Viruses and bacteria in a chalk well. Wat. Sci. Tech., **17**, 111-121.

- SOARES A.C., STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994). Effect of anaerobic digestion on the occurrence of *Entéroviruses* and giardia cysts in sewage sludge. *Journal of Environmental Science and Health Part A - Environmental Science and Engineering* 29 : 1887-1897
- SOBSEY M.D., HACKNEY C.R., CARRICK R.J., RAY B. and SPECK M.L. (1980). Occurrence of *Enteric* bacteria and viruses in oysters. *J. Food Prot.*, **43**, 111-113.
- TANDON R.K. and TANDON B.N. (1975). Stool weights in north Indians. *Lancet*, **2**, 560-561.
- TANI N., DOHI Y., KURUMATANI N. and YONEMASU K. (1995). Seasonal distribution of *Adénoviruses*, *Entéroviruses* and *Réovirus* in urban river water. *Microbiol. Immunol.*, **39**, 577-580.
- TAYLOR J.M. (1982). Viruses in fresh and saline waters. In "Viruses and disinfection of water and wastewater". BUTLER, ed. University of Surrey. Surrey Press. Surrey, U.K.
- TYLER J.M. (1982). Virus in fresh and saline waters. In "Viruses and disinfection of water and wastewater". BUTLER M., ed. University of Surrey Press. Surrey, U.K.
- VAN OLPHEN M., DE BRUIN H.A.M., HAVELAAR A.H. and SCHIJVEN J.F. (1991). The virological quality of recreational waters in the netherlands. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 209-212.
- VAUGHN J.M., LANDRY E.F., VICALE T.J. and DAHL M.C. (1980). Isolation of naturally occurring *Entéroviruses* from a variety of shellfish species residing in Long-Island and New Jersey marine embayments. *J. Food Prot.*, **43**, 95-98.
- VILAGINES Ph., SARRETTE B., LE GUYADER M., CUN C. and VILAGINES R. (1997). Relationship between cultivable viruses, F-specific RNA phages and the principal fecal bacterial indicators in raw waters, treated wastewaters and surface water. *Eur. J. Water Qual.*, **28**, 201-222.
- WAIT D.A., HACKNEY C.R., CARRICK R.J., LOVELACE G. and SOBSEY M.D. (1983). *Enteric* bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Prot.*, **46**, 493-496.
- WALTER R., MACHT W., DURKOP J., HECHT R., HORNIG U. and SCHULZE P. (1989). Virus levels in river waters. *Wat. Res.*, **23**, 133-138.
- YATES M.V., CITEK R.W., KAMPER M.F. and SALAZAR A.M. (1999). Detecting *Entéroviruses* in water : comparing infectivity, molecular and combination methods. Intern. Symposium on waterborne pathogens. A.W.WA. 29 August 1999.

ZDRAZILEK J., DRASNAR M., HLAVOVA H., JADRNICKOVA E., JANDAZEK L., KASOVA V., KOZA J., MATYASOVA L., UVIZL M., WALIHRACH J. and WEIGENDOVA J. (1982). Presence of *Polioviruses* and other enteral viruses in sewage : a survey in the CZECH Socialistic republic 1969-1976. J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol., **26**, 1-14.

ZHANG C., LI P. and WANG Z. (1984). A preliminary study of the virus contamination in tapwater. J. Environ. Sci., (China), **5**, 29-33.

Chapitre 3

Détection des virus dans le milieu hydrique

Dans le milieu hydrique, la densité apparente des virus entériques est généralement faible et il est difficile de détecter les virus directement. Seules les eaux usées brutes très riches peuvent être inoculées directement sur des cultures cellulaires. Ainsi le préalable indispensable à la mise en évidence des virus est une concentration des particules virales présentes dans un échantillon sous un très faible volume. De plus, pour la recherche des virus dans les boues ou dans les coquillages, il est d'abord nécessaire d'extraire les virus associés aux particules de boues ou aux tissus des coquillages.

Dans ces conditions, l'analyse virologique comporte systématiquement trois étapes :

- Une première étape de concentration pour les eaux ou d'extraction-concentration pour les boues ou les coquillages.

Au cours de cette phase, s'il s'agit d'eau les virus seront concentrés sous un faible volume à partir d'un échantillon de volume important (Figure 3), s'il s'agit de boues ou de coquillages les virus seront d'abord extraits de la gangue de boue ou des tissus des coquillages puis concentrés (extraction-concentration).

- **Volume initial de concentration**

Eau épurée: 1-20 L

Eau usée traitée : 20 L

Eau de rivière ou de mer : 20 – 100 L

Eau d'alimentation : 1000 L

- **Volume final après concentration**

Culture cellulaire : 10 mL max.

Biologie moléculaire : 500 µL max.

Figure 3

Volumes d'eaux à concentrer

- Une deuxième étape de décontamination, et éventuellement de détoxification au cours de laquelle le concentrat ou l'extrait obtenu précédemment est traité de façon à éliminer les bactéries, les fungi et dans la mesure du possible des substances toxiques.
- Une troisième étape, qui est consacrée à la détection proprement dite et à l'identification des virus.

1. Concentration des virus

La plupart des méthodes de concentration et d'extraction des virus entériques mettent à profit les propriétés des macromolécules protéiques constitutives de la capsid virale. En effet, certaines structures protéiques confèrent aux virus placés en milieu aqueux, les propriétés d'un colloïde hydrophile à caractère amphotère dont la charge électrique varie en fonction du pH et de la force ionique du milieu environnant. Ainsi, les virus sont susceptibles de s'adsorber puis de se détacher de différents supports chargés positivement ou négativement en fonction du pH. Les virus peuvent aussi être sédimentés en fonction de leur poids moléculaire ce qui est mis à profit dans certaines méthodes de concentration comme l'ultracentrifugation.

La méthode de concentration idéale doit répondre à plusieurs critères :

- simplicité
- rapidité
- rendement élevé
- sensibilité
- taux de concentration élevé
- application à tous les types de virus
- production d'un concentrat utilisable pour tous les systèmes de révélation virale
- coût le plus bas possible.

Une méthode de concentration devra être choisie en fonction de multiples facteurs :

- la densité virale : elle varie considérablement selon le type d'échantillon, les espèces

virales ou les saisons. La quantité de virus présents dépend aussi de facteurs géographiques et climatiques.

- le type d'échantillon (eaux, boues, coquillages) : les conditions de détection des virus sont modifiées en fonction de la concentration en matière organique et en ions. Ces facteurs jouent un rôle dans l'agrégation et l'inactivation des virus ainsi que dans le colmatage des supports utilisés pour leur concentration. Ils seront déterminants pour le choix de la méthodologie à suivre.
- le type de virus : certaines méthodes de concentration peuvent être drastiques et inactiver des virus.

1.1. Concentration des virus entériques à partir des eaux

Les méthodes de concentration des virus de l'eau font appel à différents procédés et d'excellentes revues de synthèse les recensent en présentant leur principe, leur méthodologie et leur efficacité selon le type de virus et la nature de l'eau (WALLIS *et al.*, 1979 ; BITTON *et al.*, 1982 ; GERBA et GOYAL, 1982 ; GUTTMAN-BASS et ARMON, 1983 ; BOSCH *et al.*, 1991).

Plus de trente méthodes de concentration, sans compter les variantes, ont déjà été proposées. Cela indique qu'il n'existe pas de méthode universelle et que l'analyste est confronté à des problèmes spécifiques en fonction du type et de la nature du milieu à analyser, des espèces virales recherchées et des moyens techniques disponibles.

Ces méthodes peuvent être classées en sept grands groupes en fonction de leur principe :

La méthode des gazes

Elle utilise la propriété que possède la gaze hydrophile de retenir les matériaux en suspension dans l'eau, lorsqu'elle est traversée par un courant d'eau. Elle consiste à immerger dans le milieu à analyser pendant 24 heures, des tampons de gaze stérile, puis à recueillir le liquide d'expression de la gaze qui constitue le concentrat. Simple et économique, cette méthode ne permet pas une approche quantitative et ne s'applique qu'aux eaux très chargées en matières

en suspension.

Les méthodes d'ultracentrifugation

Une force gravitationnelle supérieure à 100.000 g pendant 1 heure permet de concentrer en un culot les particules virales. Il est possible d'ajouter dans les tubes un coussin de sucrose ou bien d'y former un gradient de densité, afin que la centrifugation altère le moins possible les virus fragiles. Cette méthode, par définition, nécessite un appareillage lourd et coûteux. De plus, elle sera toujours limitée par le volume (faible) pouvant être concentré. Elle est donc réservée à la concentration secondaire.

Les méthodes d'électrophorèse et d'électro-osmose.

Leur mécanisme repose sur la capacité de migration des virus dans un champ électrique. La mise en place d'une membrane de dialyse (BIER *et al.*, 1967) permet l'adsorption des virus qui sont récupérés par inversion du courant. L'addition d'une solution de polyélectrolyte de haut poids moléculaire (solution déshydratante) du côté opposé à la suspension virale (SWEET et ELLENDER, 1972) crée en plus une pression osmotique qui accélère la filtration de l'eau. Ce sont des méthodes simples mais à débit très faible, utilisables plutôt comme seconde étape de concentration.

Les méthodes de séparation en deux phases

Certaines macromolécules, telles que le sulfate de dextran sodique ou le polyéthylène glycol en solution aqueuse, mélangées en concentrations bien définies avec l'échantillon, donnent (après agitation et décantation) un système à deux phases liquides (ALBERTSSON, 1958). En raison de leur taille, les virus se répartissent dans la phase inférieure et l'interface du mélange. Ce sont des méthodes simples et économiques mais très lentes, limitées en général à de faibles volumes d'eau et indiquées pour des eaux fortement polluées ou comme seconde étape de concentration.

Les méthodes d'adsorption sur des précipités ou des flocs en présence d'ions minéraux ou organiques et dans certaines conditions de concentration et de pH

Divers agents chimiques sont utilisés tels que le sulfate d'ammonium (MELNICK *et al.*, 1964), le sulfate de protamine (ENGLAND, 1970), le chlorure ferrique (FOLIGUET et MICHELET, 1969), le chlorure de cobalt (GROSSOWICZ *et al.*, 1960) ou encore le sulfate d'alumine (STEVENSON *et al.*, 1956) pour créer des flocs sur lesquels s'adsorbent les virus.

Ce sont des méthodes simples mais d'efficacité très variable, plutôt utilisables comme seconde étape de concentration.

Les méthodes d'ultrafiltration

Une membrane, dont le diamètre des pores est inférieur à la taille des virus, retient mécaniquement ceux-ci à sa surface. L'ultrafiltration peut être réalisée sous pression (ELLENDER et SWEET, 1972), être à circulation tangentielle continue (BERMAN *et al.*, 1980 ; GARIN *et al.*, 1993), osmotique (SWEET *et al.*, 1971) ou mettre en oeuvre des filtres solubles (GAERTNER, 1967). Ce sont des méthodes quantitatives à haut rendement, bien que le colmatage des filtres puisse être rapide et le débit de filtration faible. Ces difficultés peuvent être partiellement surmontées par l'emploi de membranes de grandes surface.

Les méthodes d'adsorption-élution

Leur principe repose sur la capacité des virus à se fixer sur divers supports puis d'en être décrochés en faisant varier les conditions électrochimiques. Cette propriété a donné lieu à un développement de méthodes très importantes tant par leur nombre, leur diversité, que par les résultats obtenus. De manière générale, pour toutes ces techniques, la composition chimique des supports, les conditions de force ionique, le pH, la présence de matière organique ou de protéines, jouent un rôle fondamental dans l'adsorption et l'élution des virus (Figure 4). Il existe actuellement toute une gamme de supports tels que les membranes et cartouches filtrantes chargées négativement ou positivement (WALLIS et MELNICK, 1967a ; SOBSEY *et al.*, 1973 ; HOMMA *et al.*, 1973 ; JAKUBOWSKI *et al.*, 1975 ; FARRAH *et al.*, 1978 ; PAYMENT et TRUDEL, 1979 ; SOBSEY et JONES, 1979 ; SOBSEY et GLASS, 1980) ; la poudre de verre (SARRETTE *et al.*, 1977), la laine de verre (VILAGINES *et al.*, 1988), divers sels métalliques comme l'oxyde de fer (RAO *et al.*, 1968) le phosphate de calcium (HILL *et al.*, 1971) ou encore l'hydroxyde d'aluminium (WALLIS et MELNICK 1967 b), les polyélectrolytes insolubles (JOHNSON *et al.*, 1967), les silicates minéraux (HILL *et al.*, 1974 ; SATTAR et RAMIA, 1979), le charbon activé (COOKSON et NORTH, 1967) ainsi que divers supports biologiques (BERG *et al.*, 1966 ; GODBOLE *et al.*, 1966). Après fixation sur ces supports, les virus sont décrochés par élution à l'aide de toute une gamme de solutions éluantes protéiques ou non, en général à des pH alcalins (WALLIS et MELNICK, 1967 a ; BERG *et al.*, 1971 ; WALLIS *et al.*, 1972 ; FARRAH et BITTON, 1978 ; LANDRY ET AL., 1978 ; HURST ET AL., 1984 ; TORANZOS ET GERBA , 1989). Les solutions éluantes les plus couramment utilisées sont des solutions d'extrait de boeuf et le tampon glycine à des pH

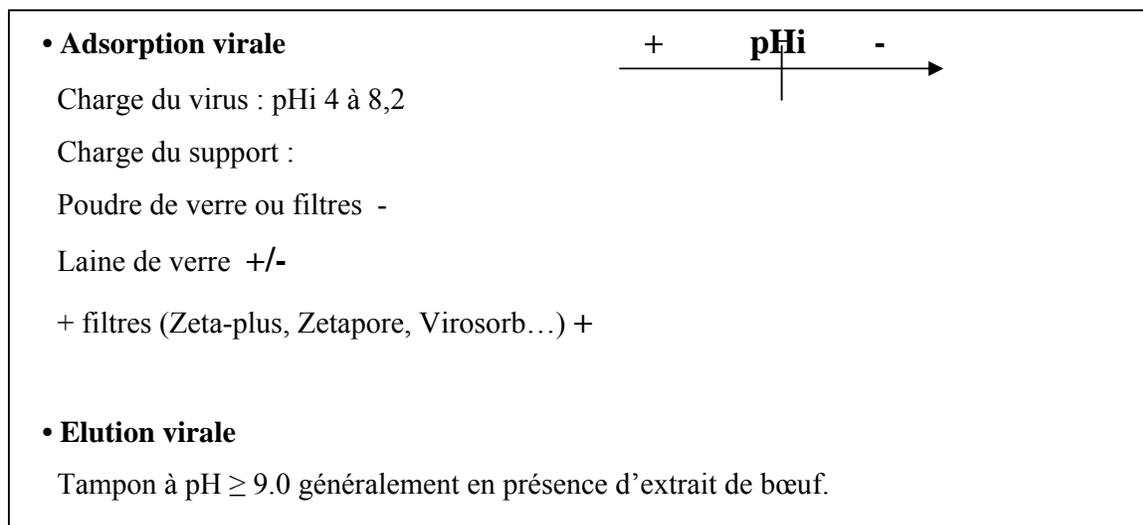


Figure 4

Techniques d'adsorption-élution

A l'aide de l'une ou l'autre de ces différentes techniques, la concentration des virus à partir des eaux peut être réalisée. Cependant il faut noter que lors de l'analyse de grands volumes d'eaux, il est nécessaire de procéder en deux étapes et d'effectuer successivement une concentration primaire et une concentration secondaire.

1.1.1. Concentration primaire

Deux groupes de techniques sont actuellement les plus largement employées, l'adsorption-élution sur différents supports et l'ultrafiltration tangentielle. Ce sont les techniques que nous présenterons de manière détaillée.

1.1.1.1. Adsorption-élution sur différents supports

Les méthodes présentées ci-après utilisent comme support soit la poudre de verre, soit la laine de verre, soit des membranes ou des cartouches filtrantes. La charge de ces supports peut être positive ou négative.

1.1.1.1.1. Adsorption-élution sur poudre de verre

La poudre de verre pyrex borosilicatée concassée (granulométrie comprise entre 100 et 200 μm) est chargée négativement et représente un excellent adsorbant pour les *Entérovirus* à un pH inférieur à leur pHi (point isoélectrique) (SARRETTE *et al.*, 1977). La concentration s'effectue par filtration ascensionnelle de l'échantillon d'eau à analyser préalablement acidifié, au travers d'une masse de poudre de verre en lit fluide. Les *Entérovirus* adsorbés sur la poudre de verre sont ensuite élués à l'aide d'un tampon alcalin.

Deux appareils sont utilisés, l'un classique proposé par SCHWARTZBROD et LUCENA (1978), l'autre modifié par SENOUICI *et al.* (1996).

Quel que soit l'appareillage utilisé l'eau à analyser est acidifiée à pH 3,5 à l'aide d'une solution d'HCl 1N et additionnée de chlorure d'aluminium à la concentration finale de 0,0005 M. Après la filtration de la totalité de l'échantillon, l'éluion est pratiquée à l'aide d'une solution éluante.

La description détaillée des matériels et des protocoles est indiquée dans l'annexe 1.

Cette méthode n'est pas praticable sur le terrain, mais elle présente un grand intérêt au niveau du laboratoire. En effet, elle peut être appliquée avec succès à tous les types d'eaux, même les plus chargées en matières en suspension car le lit fluide de poudre de verre ne peut, en principe, se colmater.

Pour les échantillons d'un volume inférieur à 100 litres, elle produit un faible volume d'éluion (30 mL) qui peut être inoculable en totalité sur culture de cellules (dans le cas des virus cultivables) et ne nécessite donc pas de concentration secondaire. Pour les échantillons de volume supérieur à 100 litres il faut utiliser des appareils adaptés (VILAGINES *et al.*, 1979 ; RIBAS *et al.*, 1986), et une reconcentration est alors nécessaire.

Cette méthode est valable pour les *Entérovirus* qui supportent très bien un pH de 3,5, mais aussi pour des virus relativement fragiles tels que les *Rotavirus* (BOSCH *et al.*, 1986).

Le rendement varie avec le type d'eau analysé et le type d'appareillage utilisé. Avec l'appareillage classique, JORET *et al.*, (1980) obtiennent un rendement de 60 % avec

l'eau d'alimentation mais seulement de 20 % avec les eaux usées brutes. Avec l'appareillage modifié et en eau d'alimentation artificiellement contaminée par du *Poliovirus*, SENOUCI *et al.* (1996) rapportent un rendement de récupération supérieur à 90 %.

1.1.1.1.2. Adsorption-élution sur laine de verre

Cette technique proposée par VILAGINES *et al.* (1988) utilise de la laine de verre sodocalcique et ne nécessite aucune modification du pH de l'eau à analyser.

La concentration s'effectue par filtration, de l'eau à analyser sur de la laine de verre sodocalcique prétraitée (réf. : Rantigny 725 Saint Gobain), compactée dans une cartouche en acier inoxydable.

Après filtration de la totalité de l'échantillon et élimination de l'eau restante dans la cartouche, une élution fractionnée est pratiquée à l'aide d'une solution éluante stérile (glycine 0,05 M 3 % d'extrait de boeuf, rouge de phénol 0,5 %) de pH 9,5.

La méthodologie est détaillée dans une norme AFNOR (AFNOR XPT 90-451, Mars 1996) résumée en annexe 2.

Cette technique est de réalisation facile, elle ne nécessite aucun traitement préalable de l'eau, elle peut parfaitement être utilisée sur le terrain et elle permet de traiter des volumes d'eaux très importants. Les concentrats obtenus présentent cependant très souvent une cytotoxicité non négligeable qui oblige à inoculer sur les cultures cellulaires des dilutions au 1/2 voire au 1/5 (ANDRE *et al.*, 1995).

1.1.1.1.3. Adsorption-élution sur membranes et filtres

Différents types de filtres ont été proposés pour la récupération des virus hydriques. Ils se présentent soit sous forme de membranes plates, soit sous forme de cartouches ("filtres en profondeur"). Leur composition chimique est très variée ainsi que leur diamètre et leur porosité (surtout pour les membranes plates). Il existe, à l'heure actuelle, toute une gamme de filtres chargés "négativement" ou "positivement". Leur efficacité dépend de la nature de l'eau à traiter. La présence de substances

interférentes comme les détergents, les solides en suspension ou la matière organique (JAKUBOWSKI *et al.*, 1975 ; PAYMENT et TRUDEL, 1979 ; KOSTENBADER et CLIVER, 1983 ; ROSE *et al.*, 1984) peut influencer l'adsorption des virus sur ces filtres. Les filtres les plus couramment utilisés sont indiqués dans le tableau 13.

Tableau 13
Principaux systèmes de concentration et leur rendement

	Concentration entérovirale	Références
Filtres électronégatifs	40-60%	STETLER <i>et al.</i> , 1992
Poudre de verre	80-98%	SENOUCI <i>et al.</i> , 1996
Laine de verre	70-90%	VILAGINES <i>et al.</i> , 1992
Filtres électropositifs	80-99%	MA <i>et al.</i> , 1994-a SOBSEY and GLASS, 1980

☞ Réduction du volume : > 20 L à 100 – 300 mL
 1L à 10 – 100 mL

L'utilisation de membranes plates ou de cartouches dépend du volume d'eau à filtrer et de sa charge polluante. Les membranes plates peuvent être colmatées beaucoup plus rapidement que les cartouches (même avec l'emploi de préfiltres) alors qu'avec l'utilisation de ces dernières il y a un volume mort (non exploitable) plus ou moins important selon la taille des cartouches (ce volume peut aller de quelques dizaines à quelques centaines de millilitres).

Selon la nature et le volume d'eau à traiter, il faut choisir un type de filtre ou une association de plusieurs filtres.

La filtration peut être réalisée soit sous vide, soit sous pression positive.

1.1.1.1.3.1. Adsorption-élution sur filtres électronégatifs

Des filtres chargés négativement peuvent fixer les virus à un pH inférieur à leur pHi. Cette adsorption est réalisée à des pH acides, généralement en présence de sels minéraux tels que NaCl, MgCl₂ ou AlCl₃ (LAVERAN *et al.*, 1976 ; SHIELDS et

FARRAH, 1983 ; GUTTMANS-BASS *et al.*, 1984) qui favorisent l'adsorption virale. Ces virus sont ensuite détachés des filtres à l'aide d'un éluant à pH alcalin (FARRAH et BITTON, 1978 ; HURST *et al.*, 1984 ; TORANZOS et GERBA, 1989).

La méthodologie préconisée est détaillée en annexe 3. Il s'agit à la fois d'une méthode de terrain et de laboratoire efficace et applicable, vu le choix très important de filtres, aux grands et petits volumes de tous les types d'eau. Elle semble valable pour tous les virus entériques qui peuvent résister aux pH acides. Elle nécessite cependant un traitement préalable de l'échantillon ce qui peut poser des problèmes lors de l'analyse de grands volumes d'eau. Enfin il faut signaler que pour les eaux riches en matières en suspension le volume à filtrer est limité par les phénomènes de colmatage.

1.1.1.1.3.2. Adsorption-élution sur filtres électropositifs.

L'utilisation des filtres électronégatifs est limitée d'une part, par l'inactivation de certains virus par les pH acides et d'autre part, par la nécessité d'acidifier de très grands volumes. Cette difficulté a été surmontée par la réalisation de supports dont la surface est chargée positivement aux pH voisins de la neutralité (6,0 - 7,0). Dans ces conditions, les virus peuvent s'adsorber sur ces filtres au pH naturel de l'eau (annexe 4). Il faut cependant préciser que la fixation optimale des virus s'effectue pour des pH $\geq 6,0$. Ils sont ensuite élués à pH alcalin. SOBSEY et JONES, (1979) ont proposé une méthodologie utilisant ce matériel. Elle est identique à celle décrite en annexe 3 pour l'adsorption-élution sur filtres électro-négatifs à l'importante différence près que l'échantillon d'eau n'est ni acidifié, ni complémenté avec des solutions salines avant filtration.

Il s'agit d'une méthode de terrain autant que de laboratoire. Un de ses grands avantages est l'absence de traitement préalable de l'échantillon. Elle est applicable aux grands et petits volumes et à différents types d'eaux. Tous les virus, peuvent être recherchés après concentration par cette méthode. La filtration d'eaux riches en matières en suspension est néanmoins souvent difficile en raison du colmatage des membranes.

1.1.1.2. Ultrafiltration tangentielle

L'ultrafiltration essentiellement tangentielle est utilisée depuis plusieurs années pour concentrer des particules virales à partir d'échantillons d'eau (BERMAN *et al.*, 1980 ; JANSONS and BUCENS 1986 ; DIVIZIA *et al.*, 1989 ; GARIN *et al.*, 1993).

L'ultrafiltration tangentielle fait intervenir un flux tangential et non plus perpendiculaire pour réduire le risque de colmatage des membranes.

La membrane filtrante écran, dont les pores sont infiniment petits, utilisée dans cette méthode, retient les macromolécules à sa surface. Cette membrane, peu épaisse, résistante, est perméable aux très petites molécules comme les sels, les acides aminés, les sucres qui constituent l'ultrafiltrat. En revanche, les macromolécules, dont les virus, sont retenues à la surface et constituent le rétentat (Fig. 5). L'efficacité de rétention sur un soluté particulier est déterminée principalement par la taille et la forme des molécules. Comme le poids moléculaire est un guide approximatif de leur taille, on pourra caractériser les ultrafiltres par leur pourcentage de rétention de solutés ou de particules dont on connaît exactement le poids moléculaire.

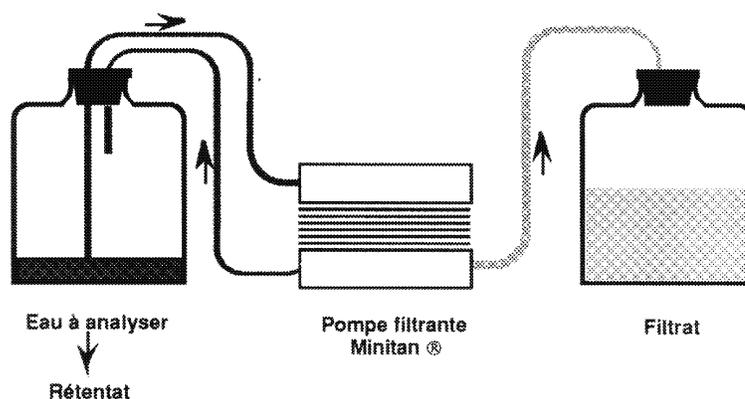


Figure 5 : schéma de l'ultrafiltration tangentielle

On définit donc les ultrafiltres en fonction de leur seuil de coupure ou Poids Moléculaire Nominal Limite (PMNL). La plupart des molécules de taille supérieure à ce seuil sont arrêtées et sont renvoyées dans l'échantillon d'eau à filtrer. Par exemple, pour garder les virus dans le rétentat, on utilisera une membrane en polysulfonate avec un seuil de 100 000 daltons.

Les dimensions originelles des molécules sont le premier mais non pas le seul facteur régissant la rétention. L'environnement ionique, le pH peuvent affecter la

conformation (et donc les dimensions) de la molécule et par conséquent modifier, dans quelques cas, les propriétés de rétention de la membrane. Pourtant, en ultrafiltration, l'effet secondaire principal reste la polarisation de concentration. Il s'agit de la formation à la surface de la membrane d'une couche de macromolécules concentrées qui peut réduire de façon significative le débit et altérer les caractéristiques de rétention de l'ensemble. Cette couche apparaît comme un dépôt ou un gel sur la membrane. Un moyen très efficace de lutter contre ce phénomène est le flux tangentiel.

Cette technique tire son originalité de la circulation du liquide à filtrer : ce dernier n'arrive pas perpendiculairement au filtre mais tangentiellement, ce qui évite les risques de colmatage. Les molécules retenues à la surface du filtre sont entraînées et rejetées dans le flux, évitant ainsi toute réduction du débit à travers le filtre.

En chassant les macromolécules retenues sur la couche limite et en les redistribuant dans la solution de départ, l'agitation réduit efficacement la polarisation de concentration et augmente le débit de filtrat. La dilution également s'avère être une très bonne solution pour réduire la polarisation de concentration et obtenir des débits de filtrat importants : c'est souvent le cas des eaux dans lesquelles on recherche les virus.

Cette technique d'ultrafiltration tangentielle a été utilisée pour concentrer des *Rotavirus* ou des *Entérovirus* à partir d'eaux (SOULE *et al.*, 2000).

L'ultrafiltration n'est pas une technique de haute résolution, le PMNL demeurant approximatif. Mais c'est un excellent moyen de concentrer rapidement des particules virales à partir de volumes d'eau compris entre 10 litres et 10 millilitres (annexe 5). Le facteur de concentration obtenue est d'environ 130. Après chaque filtration, les membranes sont décontaminées dans HNO_3 0,1 M puis lavées et conservées dans NaOH 0,1 M. Avant utilisation, elles sont rincées dans de l'eau distillée stérile. Il est souvent utile de reconcentrer le rétentat, par exemple sur membranes de faible adsorption de type Amicon Centriprep, jusqu'à obtenir un volume final de 500 μl . L'ensemble de ces étapes de concentration dure 1 heure.

1.1.2. Concentration secondaire

A l'issue de la concentration primaire de grandes quantités d'eau, les volumes des concentrats obtenus sont trop importants pour être analysés directement. Ils doivent alors subir une concentration secondaire de façon à récupérer les virus sous un volume de quelques dizaines de millilitres.

La plupart des méthodes de concentration déjà citées peuvent être utilisées comme méthodes de concentration secondaire, mais d'autres techniques spécifiques sont préconisées à ce stade : techniques de floculation (KATZENELSON *et al.* 1976) de précipitation à l'aide de divers agents chimiques tels que le sulfate d'ammonium (LUDHOLM et NIELSEN, 1980 ; SHIELDS and FARRAH 1986 ; ARMON *et al.*, 1988), le chlorure d'aluminium ou de fer (PAYMENT *et al.*, 1976), l'hydroxyde de magnésium (VILAGINES *et al.*, 1982) et le polyéthylène glycol (BIZIAGOS *et al.*, 1987 ; LEWIS et METCALF ; 1988), par ultracentrifugation (STEINMAN, 1981) ou par séparation immunomagnétique. Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients selon le type du virus, la nature de la solution éluante et la durée de l'expérience.

1.1.2.1. Floculation organique

Cette méthode repose sur la capacité des protéines en solution de floculer à un pH acide inférieur à leur pHi. Les virus en solution sont emprisonnés dans le flocculat d'où ils devront être récupérés. Cette méthode ne peut être réalisée qu'avec des solutions ou les éluants sont de nature protéique. L'extrait de boeuf est généralement utilisé comme source de protéine pour réaliser cette floculation.

La solution protéique est acidifiée à pH 3,5 et maintenue sous agitation lente pendant 30 min. pour favoriser la floculation. Le floc formé est récupéré par centrifugation (3 000 g, 15 min, 4°C) puis le culot obtenu est remis en suspension dans une solution de Na₂HPO₄ 0,15 M, pH 9 (5-10 mL). Après dissolution complète du culot, si besoin, le pH est ajusté à 7,2 ± 0,2. C'est une technique simple, économique et très rapide. Cependant, les résultats obtenus varient énormément selon le type de virus et la provenance des éluants protéiques (HURST *et al.*, 1984). Une floculation incomplète avec de faibles pourcentages de récupération virale a été souvent observée (RAMIA et SATTAR, 1979 ; SOBSEY *et al.*, 1985 ; BIZIAGOS *et al.*, 1986 ; LEWIS et

1.1.2.2 Précipitation par le polyéthylène glycol (PEG)

Le polyéthylène glycol est un polymère synthétique soluble dans l'eau, non toxique qui agit probablement en piégeant l'eau autour des virus provoquant ainsi leur précipitation. C'est une macromolécule chimiquement neutre qui réalise une précipitation des virus en suspension à partir de n'importe quel type de solution, protéique ou non.

A la suspension virale à concentrer est ajoutée de façon à obtenir une concentration finale de 10 %, une solution de polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000) préparée extemporanément dans du PBS (PEG 6000 : 500 g, NaCl : 75 g, PBS Q.S.P. 1000 mL). Après homogénéisation, la solution est incubée pendant 12 heures à 4°C. Le précipité formé est ensuite récupéré par centrifugation (10 000 g, 4°C) et le culot est remis en suspension dans un volume de PBS (pH 7- 7,2) qui peut varier de 100 µl pour un culot faible ou inapparent (dans le cas de suspensions claires ou non protéiques) à 3-5 mL pour les culots importants.

La durée de centrifugation est fonction du volume à centrifuger : en général pour des volumes jusqu'à 50 mL, 45 min. suffisent alors que pour des volumes supérieurs à 100 mL, la durée de centrifugation varie de 60 à 90 min. Cette technique, efficace, simple et économique, a pour seul défaut sa durée qui est plus importante que celle de la floculation organique. Cependant, pour tous les types de suspensions et, à notre connaissance, pour tous les virus testés, son rendement est proche de 100 %. De plus, la réalisation de deux précipitations successives par le PEG enlève une grande partie de la toxicité des échantillons. Au cours d'expériences menées en parallèle, cette technique s'est révélée plus performante que la floculation organique au niveau de l'homogénéité des résultats, de la toxicité des échantillons et de l'efficacité de récupération.

1.1.2.3 Ultrafiltration tangentielle

L'ultrafiltration tangentielle décrite en 1.1.1.2. peut aussi être employée au titre de la

concentration secondaire.

Il existe en effet des microsystemes permettant de procéder rapidement à la filtration d'échantillons dont le volume peut varier de 50 mL à 1 litre.

Il peut ainsi être envisagé d'utiliser l'ultrasart-micro (Sartorius), constitué par un support en polypropylène équipé d'un filtre en polyéthersulfone dont le seuil de coupure varie de 1000 D à 300000 D.

Cette technique présente l'énorme avantage de ne nécessiter l'ajout d'aucun réactif supplémentaire dans le liquide à concentrer, en particulier pas d'extrait de boeuf, ce qui est très important dans l'optique d'une détection des acides nucléiques viraux par Polymerase Chain Reaction (PCR).

1.1.2.4. Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation, utilisée depuis des années pour la préparation et l'analyse des virus, reste une excellente méthode pour concentrer les particules virales (PAYMENT and TRUDEL, 1985 ; TRUDEL and PAYMENT, 1993).

Au cours de la centrifugation différentielle et après avoir débarassé la suspension virale des matières en suspension, on peut appliquer aux virions une force gravitationnelle d'au moins 100 000 xg pendant 1 heure : les virions constituent un culot au fond du tube. Il est aussi possible de faire sédimenter les particules virales sur un coussin fait d'une substance plus dense que les virus (par exemple le sucrose ou le chlorure de césium). Les virus se concentrent à la surface du coussin et sont facilement récupérables.

La centrifugation sur gradient de densité permet aux particules de migrer selon leur taille et donc d'obtenir une séparation optimale, surtout si l'on utilise un gradient linéaire continu.

L'ultracentrifugation, si elle ne peut servir à concentrer de grands volumes d'eau peut être employée pour terminer des concentrations qui ont été entreprises par ultrafiltration ou par d'autres méthodes.

1.1.2.5. Séparation immunomagnétique

La séparation immunomagnétique peut être utilisée pour concentrer les virus à partir d'un faible volume de concentrat. Pour ce faire, des billes paramagnétiques sont recouvertes d'anticorps spécifiques du virus recherché puis mises en présence de l'échantillon à concentrer. Au cours de l'homogénéisation et de l'agitation du mélange les virus se fixent sur les anticorps correspondants et sont ainsi capturés. Un aimant est utilisé pour récupérer les billes. Cette méthode peut être utilisée pour la détection des virus soit par culture cellulaire, soit par RT-PCR (SCHWAB *et al.*, 1996 ; YATES *et al.*, 1999).

1.2. Extraction-concentration des virus entériques à partir des boues

Les techniques de mise en évidence des virus dans les boues sont fondées sur une extraction permettant la rupture des liaisons virus-particules constitutives de la boue.

L'adhésion des virus aux particules de boues et donc leur élution dépendent en particulier de la charge électrostatique respective des virus et de leur support, du pH, de leur environnement, de l'existence ou de la neutralisation d'interactions hydrophobes et de la présence ou non de protéines qui entrent en compétition avec les virus pour leur adsorption sur les sites de fixation.

Dans ces conditions, la composition des solutions éluantes est très importante. En effet, ces solutions modifient les conditions du milieu par apport d'ions et par variation du pH. Elles peuvent ainsi inverser le potentiel de charge des particules virales et permettre leur libération dans la phase liquide. Il s'agit généralement de solutions de pH alcalin, enrichies en sels minéraux et en protéines. En effet, le pH du mélange boue/éluant doit être supérieur au point isoelectrique des virus recherchés afin de leur permettre d'acquérir une charge globale négative.

Parmi les éluants les plus couramment utilisés, on trouve des solutions de glycine, d'extrait de boeuf, de borate ou encore de lait écrémé. Les études comparant l'efficacité des

différents éluants sont nombreuses, mais la diversité des paramètres variant entre les protocoles rend les comparaisons délicates.

Malgré ces divergences, les nombreuses études comparatives décrites dans la littérature permettent de constater que certains éluants sont plus employés que d'autres. c'est le cas des solutions à base d'extrait de boeuf, préconisées par l'E.P.A. (E.P.A., 1992), et qui sont utilisées par de très nombreux auteurs (BRASHEAR et WARD, 1982 ; BERG and DAHLING, 1980 ; BERG *et al.*, 1982 ; WELLINGS *et al.*, 1976 ; HAMPARIAN *et al.*, 1985 ; GLASS *et al.*, 1978 ; STETLER *et al.*, 1992 ; BATES and GODDARD, 1980), à base de glycine (JORET and WULLENWEBER, 1983 ; ALBERT, 1989), de borate ou de lait écrémé (GODDARD *et al.*, 1981).

Certains éluants sont plus rarement employés, comme des solutions à base de lysine (SCHEUERMANN *et al.*, 1986), d'urée-lysine (FARRAH *et al.*, 1981), de sérum de veau (CLIVER, 1975 ; SATTAR and WESTWOOD, 1976) et de fréon (WELLINGS *et al.*, 1976 ; WULLENWEBER and AGBALIKA, 1984).

Enfin, des éluants à base de sérum de veau foetal, de détergents basiques (bromure de cetyltriméthylammonium), neutres (Tween) ou acides (sodium dodécyl sulfate) et d'eau distillée ont été qualifiés de médiocre efficacité (BATES and GODDARD, 1980 ; FARRAH *et al.*, 1981). Cependant, VANDEN BOSSCHE (1994) estime que l'emploi de détergents ioniques associé à une sonication permettrait de favoriser la récupération des particules virales et d'améliorer leur capacité à infecter les cellules.

Par ailleurs deux paramètres jouent un rôle important au niveau de l'extraction des virus. Il s'agit du rapport des volumes d'éluant et de boues d'une part et de la technique d'homogénéisation d'autre part.

Le rapport entre le volume d'éluant et le volume de boues varie selon les auteurs d'un facteur 1 à 5. Plusieurs études ont comparé l'influence de ce paramètre sur l'élution des virus. Ainsi, SHIMOHARA *et al.*, (1986) estiment que l'efficacité de l'élution est maximale quand le volume d'éluant est 2 fois celui de la boue. Cependant, d'autres auteurs travaillent avec un rapport de 1/5. C'est le cas de FARRAH *et al.*, (1981) qui préconisent de mélanger un culot de boue centrifugée à 5 volumes de solution urée-lysine. HURST and GOYKE (1986) et

SCHEUERMANN *et al.*, (1986) obtiennent également un rendement maximal lorsque les boues analysées sont traitées à raison de 5 volumes d'éluant pour 1 volume de boues. D'autres auteurs, comme ALBERT (1989) préconisent une dilution de la boue au dixième dans l'éluant. Les prises d'essai analysées varient de 40 à 100 grammes de boues.

L'efficacité de l'éluant varie aussi avec la technique d'homogénéisation qui peut être soit l'agitation magnétique (HURST *et al.*, 1978), soit l'agitation mécanique (CLIVER, 1975), soit la sonication (GLASS *et al.*, 1978) soit l'association de ces diverses méthodes. Le temps de contact entre la solution éluante et la boue varie entre 1 et 60 minutes selon le protocole.

Il faut enfin signaler que l'utilisation, au cours des opérations d'extraction, de certains hydrocarbures halogénés tels que le Fréon (trichlorotrifluoro-ethane) permettent d'éliminer un certain nombre de substances dissoutes toxiques pour les cultures cellulaires.

A l'issue de l'extraction, les virus sont présents dans le liquide d'éluant qui est récupéré après centrifugation. Celui-ci est alors le plus souvent soumis à une concentration de façon à obtenir le maximum de virus sous le plus faible volume. Deux techniques sont généralement préconisées, il s'agit de la floculation organique (KATZENELSON *et al.*, (1976) et la précipitation par le polyéthylène-glycol PEG 6000 (LEWIS and METCALF, 1988) ou 8000 (ALOUINI and SOBSEY, 1995).

Après un temps de contact compris entre 1 et 18 heures le mélange est centrifugé et le culot dans lequel se trouvent les virus est remis en suspension dans un faible volume de solution tampon. Les modalités techniques de ces méthodes sont exposées en annexe

De nombreux protocoles ont été proposés dans la littérature pour l'extraction des virus à partir des boues ou des sédiments (SCHEUERMAN *et al.*, 1986, SCHWARTZBROD and MATHIEU, 1986 ; SHIMOHARA *et al.*, 1986 ; SAFFERMAN *et al.*, 1988 ; ALBERT and SCHWARTZBROD 1991 ; EPA 1992 ; STETLER *et al.*, 1992 ; SOARES *et al.*, 1994 ; STRAUB *et al.*, 1994 ; AHMED and SORENSEN, 1995) mais d'autres techniques proposées pour l'extraction des virus à partir de coquillages ont pu être adaptées à l'analyse des boues (ALOUINI and SOBSEY, 1995).

Quatre protocoles d'extraction des *Entérovirus* sont proposés ici parce que, à l'issue d'une étude comparative portant sur 8 techniques d'extraction-concentration, il a été montré

qu'ils présentaient les meilleures performances pour la détection des *Entérovirus* dans les boues par cultures cellulaires (Techniques 1, 2, 4) (MIGNOTTE *et al.*, 1999) ou par RT-PCR (Techniques 1, 2, 3).

* **Technique 1** : extraction par une solution NaCl 0,3 M / extrait de boeuf 7 % à pH 7,5 - fréon décrite par ALOUINI and SOBSEY (1995) initialement pour éluer les virus à partir de coquillages. Cette technique comporte l'ajout de 50 mL de NaCl 0,3 M à la boue et l'homogénéisation du mélange à l'ultra-turrax à 9 500 TPM pendant 1 min. Le mélange est additionné de 350 mL de solution d'extrait de boeuf 7 % / NaCl 0,3 M à pH 7,5 et le pH ajusté à 7,5 si nécessaire. Après une seconde homogénéisation à l'ultra-turrax à 9 500 TPM pendant 1 min., 100 mL de fréon TF sont additionnés. De nouveau la boue est homogénéisée à l'ultra-turrax à 9 500 TPM pendant 1 min., avant d'être centrifugée à 5 000 g pendant 20 min. à + 4°C. Le surnageant, qui constitue l'extrait, est ajusté à pH 7,5 (protocole en annexe 6).

* **Technique 2** : extraction par une solution d'extrait de boeuf 10 % à pH 9 décrite par AHMED and SORENSEN (1995) initialement pour extraire les phages de *Bacteroides fragilis* à partir de sédiments. Un volume de boue équivalent à 5 g de matière sèche est additionné à 45 mL de solution éluante et le mélange est placé sur une table d'agitation réglée sur 500 RPM. Une sonication sur glace (100 W ; 0,9 s) est alors réalisée pendant 5 min. par fractions de 1 min. et le mélange est centrifugé à 5000 g pendant 1 heure à + 4°C. Le surnageant neutralisé à pH 7,2 constitue l'extrait (protocole en annexe 7).

* **Technique 3** : extraction par une solution d'extrait de boeuf 3 % / Na₂HPO₄ 3,15 g.L⁻¹ / acide citrique 0,15 g.L⁻¹ pH 7 décrite par SOARES *et al.*, (1994). Après avoir ajouté 2,5 mL d'une solution d'AlCl₃ 0,05 M à la boue, le pH est amené à 3,5 par ajout d'HCl 5 N. Le mélange est ensuite placé sur une table d'agitation réglée sur 500 RPM pendant 30 min. et centrifugé à 2 500 g pendant 15 min. à + 4°C. Le culot est remis en suspension dans 500 mL de la solution éluante, homogénéisé sur table d'agitation pendant 30 min. et centrifugé à 15 300 g pendant 10 min. à + 4°C. Le surnageant est récupéré et constitue l'extrait (protocole en annexe 8).

* **Technique 4** : extraction par une solution de borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 % pH 9 décrite par ALBERT and SCHWARTZBROD (1991). La boue est tout d'abord centrifugée à

1 500 g pendant 15 min. et le culot remis en suspension dans 360 mL de solution éluante. Le mélange est ensuite placé sur une table d'agitation réglée sur 500 RPM pendant 30 min. puis il subit une sonication sur glace (100 W ; 0,9 s) pendant 1 min. Après centrifugation à 10 000 g pendant 45 min. à + 4°C, le surnageant est prélevé et neutralisé. il constitue l'extrait (protocole en annexe 9).

1.3. Extraction-concentration des virus entériques à partir des fruits de mer

Les virus entériques peuvent être présents ou adsorbés sur différents organes des mollusques (muqueuses du tube digestif, hépatopancréas...), CLIVER *et al.*, 1983. Il est donc nécessaire d'extraire les particules virales adsorbées sur les tissus. De plus, ces virus sont en relativement faible quantité dans les coquillages contaminés, il est donc nécessaire d'ajouter une étape de concentration après l'extraction.

De très nombreuses méthodes d'extraction-concentration ont été proposées dans la littérature, elles ont en commun de comporter le plus souvent trois étapes :

- Extraction des virus
- Clarification de l'éluat obtenu
- Concentration des virus

1.3.1. Extraction des virus

L'extraction est réalisée soit à partir de l'ensemble des tissus du coquillage, soit à partir de l'hépatopancréas. Il a en effet été montré par différents auteurs que, chez les bivalves, les organes principalement contaminés par les virus entériques sont les organes digestifs (METCALF *et al.*, 1980, BOSCH *et al.*, 1995 ; ROMALDE *et al.*, 1994). Les quantités analysées varient selon les techniques entre 25 et 100 grammes de tissus et d'eau intervalvaire.

L'extraction est en général effectuée après broyage de ces tissus au Waring-Blendor (LEWIS and METCALF, 1988 ; ALBERT *et al.*, 1995) ou à l'ultra-turrax (SOBSEY and ALOUINI, 1995 ; VAN DER VEEN, 1995). A partir du broyat de tissus, il est alors procédé à l'élution des virus adsorbés. Cette opération fait intervenir 3 éléments fondamentaux : la

nature de la solution éluante, le rapport des volumes éluat/broyat et le temps de contact avec l'éluant.

L'utilisation de solutions éluantes alcalines, en modifiant les conditions du milieu par apport d'ions et par variation du pH, entraînent l'inversion du potentiel de charge des particules virales et leur libération dans la phase liquide. Il s'agit, dans la plupart des cas, de solutions tamponnées, de pH alcalin, enrichies en sels minéraux et en protéines, celles-ci entrant en compétition avec les particules virales pour les sites d'adsorption. Les solutions les plus utilisées dans la littérature sont :

- les tampons à base de glycine, (WEST and WILLIAMS, 1988 ; LEWIS and METCALF, 1988 ; VAN DER VEEN, 1995),
- les tampons phosphate utilisés seuls (CROCI *et al.*, 1984) ou additionnés d'extrait de boeuf (METCALF *et al.*, 1980),
- diverses solutions à base de milieu nutritif, de lait écrémé ou de solutions tamponnées (BIZIAGOS *et al.*, 1989 ; BOHER, 1991 ; SOBSEY and ALOUINI, 1995).

Le volume du liquide d'éluion varie, selon les auteurs de 1 à 10 fois la masse initiale de tissus. Une ultrasonication peut également être réalisée dans le but d'obtenir une meilleure dissociation des liaisons virus-tissus et d'éventuels agrégats de particules virales (METCALF *et al.*, 1980 ; BIZIAGOS *et al.*, 1989).

Le contact des tissus avec l'éluant est réalisé sous agitation magnétique. Sa durée peut varier de 1 à 30 minutes selon les techniques.

Parmi les différentes méthodes d'extraction rapportées dans la littérature, trois sont présentées ici. Elles utilisent une éluion respectivement par un tampon borate (BOHER and SCHWARTZBROD, 1993) pour la technique 1, une solution de glycine (SOBSEY *et al.*, 1978, LEWIS and METCALF, 1988 et VAN DER VEEN, 1995), pour la technique 2, une solution de chlorure de sodium et d'extrait de boeuf (ALOUINI and SOBSEY, 1995), pour la technique 3. Les protocoles sont les suivants :

* **Technique 1** : extraction par une solution "borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 %"

Ce protocole d'extraction consiste à broyer les tissus au Waring-Blendor à 10 000 TPM pendant 3 minutes. Le broyat est ensuite transféré dans un pot à centrifuger et additionné de 100 mL de tampon borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 % ajusté à pH 9. La suspension est homogénéisée à l'ultra-turrax T25 pendant 1 min. à 9 500 TPM. Le pH est ajusté à 9 si nécessaire, par addition de soude 0,1 M, et la suspension est soumise à une agitation magnétique pendant 15 minutes. Le mélange subit ensuite une sonication sur glace de 100 W (0,9 s) pendant 1 minute et une agitation magnétique de 5 minutes. L'extrait obtenu est ensuite clarifié par centrifugation à 10 000 g pendant 90 minutes à + 4°C (le schéma de ce protocole est donné en annexe 10).

* **Technique 2** : extraction par une solution "glycine 0,05 M / NaCl 0,15 M"

Le broyat de tissus, obtenu par homogénéisation à l'ultra-turrax pendant 3 min. à 9 500 TPM, est additionné de 50 mL de tampon glycine 0,05 M / NaCl 0,15 M à pH 8,5. Le pH du mélange est vérifié et ajusté à 8,5 si nécessaire, puis celui-ci est homogénéisé 15 min. sur agitateur magnétique. Il subit ensuite une clarification à 5 000 TPM pendant 10 minutes (le schéma de ce protocole est donné en annexe 11).

* **Technique 3** : extraction par une solution " NaCl / Extrait de boeuf"

Le broyat est réalisé par homogénéisation des tissus de coquillages, additionnés de 50 mL de solution NaCl 0,3 M, à l'ultra-turrax pendant 1 minute à 9 500 TPM. La solution éluante NaCl 0,3 M / extrait de boeuf 7 % est ensuite ajoutée à raison de 350 mL et le mélange est de nouveau traité à l'ultra-turrax pendant 1 minute à 9 500 TPM. Le pH est vérifié et ajusté à pH 7,5 si nécessaire (le schéma de ce protocole est donné en annexe 12).

1.3.2. Clarification de l'éluat

A la suite de l'extraction, un éluat fortement chargé en matières en suspension est obtenu. Il est donc très souvent nécessaire de procéder à une clarification. Les principales techniques employées sont la centrifugation, la filtration et la floculation.

La centrifugation permet d'éliminer la plus grande partie des matières en suspension qui se retrouvent dans le culot alors que les virus demeurent dans le surnageant. Cette méthode, à la fois simple, rapide et efficace, est fréquemment utilisée.

La filtration sur laine de verre (TIERNEY *et al.*, 1980), sur gaze hydrophile (CROCI *et al.*, 1984) ou sur membranes de fibres de verre (SOBSEY *et al.*, 1978) est plus lente à réaliser. En outre, elle occasionne souvent une perte de virus par rétention sur les filtres et présente un risque de colmatage.

La floculation peut être réalisée par utilisation de fréon TF (trichloro-trifluoro-éthane) ou de flocculant cationique (cat-floc). Le fréon TF est utilisé en tant que solvant des lipides et en tant qu'agent de rupture des liaisons entre les virus et les tissus. BEMISS *et al.*, (1989) préconisent un rapport de 1/3 entre la masse de tissus et le volume de fréon. Il se forme un gel emprisonnant les débris tissulaires qui, après centrifugation, constituent un culot alors que les virus restent dans le surnageant. ALOUINI and SOBSEY (1995) l'utilisent volume à volume après extraction par une solution de NaCl et d'extrait de boeuf selon le protocole suivant :

Trois cent millilitres de fréon TF sont ajoutés au mélange, qui est ensuite homogénéisé à l'ultra-turrax pendant 1 min. à 9 500 TPM. Le mélange est ensuite centrifugé à 5 000 g pendant 20 minutes à + 4°C et le surnageant est ajusté à pH 7,2 (le schéma de ce protocole est donné en annexe 13).

Le cat-floc (chlorure de polydiallyléthylammonium), ajouté dans une proportion de 0,01 % à 0,5 %, a pour but de flocculer les solides en suspension. Cette méthode, nécessite également une étape ultérieure de centrifugation.

1.3.3. Concentration des virus

Cette étape a pour but d'obtenir sous un faible volume tous les virus présents dans l'important volume d'éluat.

Les techniques de concentration les plus souvent utilisées sont la floculation organique (KATZENELSON *et al.*, 1976) et la précipitation par le polyéthylène glycol (PEG). Deux types de PEG sont classiquement utilisés : le PEG 6000 (LEWIS and METCALF, 1988 ; ALBERT *et al.*, 1995) et le PEG 8000 (ALOUINI and SOBSEY, 1995). Après un temps de contact compris entre 1 heure et 18 heures permettant la formation de liaisons intermoléculaires, le mélange est centrifugé et le culot dans lequel se trouvent les virus est

remis en suspension dans un faible volume de solution tampon. Les modalités techniques de ces 3 méthodes sont exposées en annexes 14, 15, 16.

Parmi l'ensemble des techniques proposée ci-dessus MIGNOTTE *et al.*, 1997 ont montré que pour la détection de *Poliovirus* de type 1 par inoculation sur cultures cellulaires à partir de moules artificiellement contaminées la technique qui présentait le meilleur rendement était la concentration par une solution de NaCl extrait de boeuf (technique 3) suivie par une clarification à l'aide de fréon (ALOUINI and SOBSEY, 1995) associée à une concentration par le PEG 6000.

Pour la détection par RT-PCR du génome des *Poliovirus*, *Astrovirus* et virus de l'hépatite A, TRAORE *et al.*, (1998) ont montré que les méthodologies les plus performantes étaient les techniques d'extraction utilisant comme solution éluante soit une solution de borate 3% d'extrait de boeuf (technique 1), soit une solution de glycine (technique 2). associées à une concentration par le PEG 6000.

1.4. Concentration des bactériophages

Dans le cadre de la mise en évidence de bactériophages en tant qu'indicateurs de contamination virale et lorsque la densité phagique dans un milieu hydrique est faible, il peut être nécessaire de procéder à une concentration à partir d'un grand volume d'eau de façon à recueillir des bactériophages présents sous un faible volume.

Une concentration préalable semble nécessaire en particulier pour la recherche des phages de *Bacteroides fragilis* dans des eaux peu ou modérément polluées.

De nombreuses techniques ont été décrites et ont été surtout appliquées à la concentration des coliphages à partir d'échantillons d'eaux de nature très variée. La plupart sont fondées sur l'adsorption des virus soit sur des membranes filtrantes, soit sur des filtres microporeux suivie par une élution (LOGAN *et al.*, 1980 ; GERBA, 1984 ; ROSE *et al.*, 1984 ; NUPEN and BATEMAN, 1985 ; SHIELDS *et al.*, 1986 ; PRESTON *et al.*, 1988 ; SOBSEY *et al.*, 1990 ; BORREGO *et al.*, 1991).

1.4.1. Concentration par filtration sur membrane inorganique

Le principe de cette technique est, dans un premier temps, de filtrer l'eau à analyser à travers une membrane inorganique de 0,22 μ de porosité préalablement traitée par de l'extrait de boeuf (MIX 1987) puis dans un deuxième temps d'éluer les virus adsorbés sur la membrane à l'aide d'un tampon glycine . Elle a été proposée en 1995 par LUCENA *et al.*,

- Trois mL d'une solution d'extrait de boeuf à 3 % sont filtrés sous vide à travers une membrane inorganique Anodix (Whatman ref : 6809-5022) de porosité 0,22 μ et de diamètre 47 mm.
- 100 mL d'eau à analyser sont filtrés sous vide à travers cette membrane.
- La membrane est prélevée et broyée dans 5 mL de tampon glycine 0,25 M, pH 9,5.
- L'ensemble membrane-tampon est vortexé pendant 1,5 minutes.
- Le liquide surnageant est ensuite récupéré et il constitue le concentrat.

Les auteurs rapportent des pourcentages de récupération des phages de *Bacteroides fragilis* variant de 56,1 % dans des eaux souterraines à 8,9 % dans des eaux de rivière et 9,7 % dans de l'eau de mer.

1.4.2. Concentration par filtration sur membrane en esters de cellulose

Cette méthode de concentration préconisée par LUCENA (1999) est fondée sur le principe d'adsorption-élution des phages sur une membrane en ester de cellulose en présence de MgCl₂ suivie par une élution à pH 9 en présence de Tween 80 et d'extrait de boeuf.

- l'eau à analyser (100mL) est additionnée de 10 mL d'une solution de MgCl₂ 0,05 M
- après homogénéisation, l'échantillon ainsi obtenu est filtré par aspiration sur une membrane de porosité 0,22 μ m (réf : Millipore GSWP 047 00)
- la membrane est ensuite introduite dans un pilulier de 40 mL contenant 10 mL d'une solution d'élution (1% d'extrait de boeuf (réf : 97 331 Becton Dickinson) ; 3 % (v/v) de

Tween 80 ; 0,5 M NaCl ; eau désionisée qsp 100 mL, pH 9,0).

- l'ensemble est vortexé pendant 1 minute (réf : Scientific Industries Vortex Genie 2) puis introduit dans un bain à ultrasons (200 Watts) pendant une minute (réf : Deltasonic 011 c)
- le liquide est alors recueilli et constitue le concentrat.

Utilisée pour la concentration des phages à partir d'eau de rivière cette technique a permis d'obtenir des pourcentages de récupération de 82 % pour les phages à ARN F-spécifiques et de 33 % pour les phages de *Bacteroides fragilis* (souche RYC 2056). Un pourcentage important d'échantillons négatifs avant concentration se sont révélés positifs après concentration. Ce pourcentage est de 100 % pour les phages à ARN F-spécifiques et de 55 % pour les phages de *Bacteroides fragilis* (souche RYC 2056) (GANTZER *et al.*, 1999).

1.4.3. Concentration par filtration sur filtres chargés positivement

BORREGO *et al.*, (1991) ont proposé une technique d'adsorption-élution fondée sur la filtration sur filtre de verre époxy terre de diatomée traité avec des polymères cationiques suivie par une élution lente à l'aide d'une solution à 3 % d'extrait de boeuf pH 9.

Le protocole consiste à filtrer 1 litre d'eau sur un filtre en terre de diatomées préparé de la façon suivante : des filtres en fibre de verre époxy (0,45 μ - 47 mm de diamètre) utilisés comme support physique sont placés sur des filtres en polypropylène Swinnex (Millipore) puis une suspension aqueuse de terre de diatomées est filtrée à travers l'ensemble de façon à ce que la terre de diatomées soit déposée sur le filtre en fibre de verre. L'ensemble est ensuite traité avec 0,1 % de Nalco 7111 (LEACHEM Industries Inc. Titusville, Fla) selon une méthodologie décrite par FARRAH *et al.*, (1988).

- L'élution est réalisée avec 10 mL d'une solution d'extrait de boeuf à 3 % supplémentée avec 1 M NaCl à pH 9 en faisant en sorte que le passage à travers le filtre soit très lent (0,5 mL/minute).

Avec une telle méthode les auteurs rapportent la récupération de 103 % de coliphages indigènes dans l'eau d'alimentation artificiellement contaminée avec des eaux usées et 71 % de ces mêmes phages à partir de "trickling filter".

1.4.4. Concentration par adsorption-élution sur laine de verre

Cette méthode est fondée sur l'adsorption des phages sur de la laine de verre suivie par une élution. Elle a été proposée par VILAGINES *et al.*, (1988) pour la concentration des *Entérovirus* à partir du milieu hydrique. La concentration s'effectue par filtration, à un débit de 14 litres/heure, de 20 litres d'eau au travers de 50 grammes de laine de verre sodocalcique prétraitée (réf : Rantigny 725 Saint Gobain), compactée dans une cartouche en acier inoxydable (Sartorius SM 16 249). Le protocole utilisé est décrit ci-dessous.

- Cinquante grammes de laine de verre sont placés 24 heures dans de l'eau désionisée avant d'être introduits dans une cartouche en acier inoxydable en trois fractions égales, tassées l'une après l'autre, à une densité de 0,4 g/cm³ (hauteur de 9 cm dans la cartouche) pour les eaux usées et 0,5 g/cm³ (hauteur de 7,2 cm dans la cartouche) pour les eaux de rivières et de boisson.
- Il est ensuite procédé à un prétraitement qui consiste à faire passer à travers la laine de verre et de façon séquentielle 200 mL d'HCL 1N, 500 mL d'eau déminéralisée, 200 mL de NaOH 1N et 1000 mL d'eau déminéralisée.
- L'eau à analyser est ensuite filtrée à travers la laine de verre par aspiration. Une fois la filtration terminée, l'élution des phages est réalisée par passage au travers de la laine de verre de 300 mL d'une solution d'élution stérile de pH 9,5 (Glycine 0,05 M, 3 % d'extrait de boeuf). Cette élution doit être fractionnée et pour ce faire, la filtration est stoppée pendant une minute après passage de chaque fraction de 100 mL de la solution éluante.
- Les 300 mL d'éluat recueillis dans un flacon stérile sont alors neutralisés à pH 7,2 et constituent le concentrat.

Cette technique appliquée à des eaux de rivière donne des rendements de récupération faibles de 32 % et 14 % respectivement pour les phages à ARN F-spécifiques et les phages infectant *Bacteroides fragilis* (souche RYC 2056). Par contre, sur un plan qualitatif des échantillons négatifs avant concentration se sont révélés positifs après concentration par cette méthode. Ainsi, le pourcentage d'échantillons positifs est passé de 8 % avant concentration à 83 % après concentration pour les phages infectant *Bacteroides fragilis* et de 50 % à 100 %

2. Détection des virus entériques

La détection des virus entériques dans le milieu hydrique peut être réalisée à l'aide de plusieurs techniques :

2.1. Isolement sur cultures cellulaires in vitro

Le principe de cette méthode classique de mise en évidence repose sur le fait que certains virus entériques sont capables de se multiplier sur des cultures de cellules in vitro (Tableau 14) et que cette multiplication peut être visualisée :

* soit directement par apparition d'un effet cytopathogène (ECP) c'est-à-dire de lésions ou d'une destruction spécifique des cellules infectées. Cet ECP n'est produit que par certains virus entériques (*Poliovirus*, *Coxsackievirus*, *Echovirus*, *Adénovirus*...).

* soit indirectement pour les virus se multipliant sur cultures cellulaires sans y provoquer d'ECP, en révélant cette multiplication cellulaire :

- soit par une technique immunologique in situ (Ex : Mise en évidence des *Rotavirus* par inoculation sur cellules MA 104 et révélation par une réaction d'immunofluorescence in situ, isolement du virus de l'hépatite A par inoculation sur cellules PLC/PRF/5 et révélation par Radio-Immuno-Focalisation-Assay).

- soit par une technique de biologie moléculaire par exemple en réalisant une hybridation moléculaire ou une Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) à partir du surnageant de la culture cellulaire inoculée.

Tableau 14
Isolement des virus entériques sur cultures cellulaires

Virus	Cultures cellulaires
<i>Entérovirus</i>	BGM, KB, MA104... + RD, MRC5...
<i>Virus de l'hépatite A</i>	Frp/3, PLC/PRF/5... + Technique immunologique
<i>Rotavirus</i>	MA104 + Technique immunologique
<i>Astrovirus</i>	Caco2, HEK... + Technique immunologique
<i>Adénovirus 40 et 41</i>	Hep2, Graham 293...
<i>Norwalk like virus</i>	Néant
<i>Sapporo-like virus</i>	Néant

Dans l'état actuel des connaissances, seule cette méthode d'isolement sur cultures cellulaires permet d'affirmer le caractère infectieux des virus isolés puisqu'elle est fondée sur l'infection de cellules vivantes par des particules virales. Elle constitue donc la méthode de référence incontestable. Elle est limitée par le fait que certains virus ne se multiplient pas (*Norwalk-like*, *Sapporo-like*...) ou mal (virus de l'hépatite A, *Rotavirus*) sur cultures cellulaires et que c'est une méthode longue et délicate. Enfin, les virus isolés sur cultures cellulaires doivent ensuite être identifiés le plus souvent à l'aide d'une technique immunologique de séroneutralisation.

Par ailleurs, les concentrats contiennent indifféremment, des virus, des matières en suspension et de nombreuses molécules ou macromolécules tels que métaux lourds ou détergents, qui peuvent s'avérer toxiques pour les cultures cellulaires mais aussi des quantités importantes de bactéries et de fungi.

Il est donc nécessaire de réaliser systématiquement une décontamination bactérienne et fongique et selon les cas une détoxification avant toute inoculation aux cultures cellulaires.

2.1.1. Détoxification des concentrats ou extraits

Une solution pour diminuer le risque de toxicité consiste à diluer l'échantillon, mais cette dilution augmente considérablement le volume de l'inoculum. D'autres techniques permettent de résoudre partiellement ce problème parmi lesquelles :

2.1.1.1. Centrifugation

Une clarification par centrifugation à vitesse supérieure ou égale à 8500 g élimine des matières en suspension, souvent support de molécules toxiques. Cette centrifugation appliquée à un liquide d'élution et non pas à un échantillon d'eau brute, n'entraîne pas de diminution significative du titre viral.

2.1.1.2. Filtration sur gel de Séphadex LH20

Une filtration à travers un gel de Séphadex LH 20 est particulièrement destinée à la détoxification des concentrats très cytotoxiques (BERIL *et al.* 1991). Elle permet de réduire la cytotoxicité d'un facteur 4 à 10.

Quelle que soit la technique de détoxification, en présence d'un échantillon susceptible d'être toxique, il est recommandé lors de l'inoculation de procéder, à l'issue du contact de 1 à 2 heures entre l'inoculum et le tapis cellulaire, à un lavage par agitation douce avec quelques millilitres de tampon PBS (BERG *et al.*, 1984).

2.1.2. Décontamination bactérienne et fongique

Deux techniques sont couramment appliquées pour éliminer bactéries et fungi : addition d'un mélange d'antibiotiques ou traitement par le chloroforme. Cependant, du fait de la présence de microorganismes résistant aux antibiotiques, il est préférable d'associer les deux techniques en traitant d'abord par le chloroforme ensuite par addition d'un mélange d'antibiotiques. Dans certains cas, il est aussi possible d'avoir recours à une filtration sur des membranes filtrantes de porosité 0,22 µm (Millex ou Sterivex GS Millipore) à condition de les avoir traitées au préalable par du sérum de veau stérile de façon à éviter l'adsorption non

spécifique des virus.

2.1.2.1. Traitement par le chloroforme

Dans le cadre spécifique d'une recherche de virus nus donc insensibles à l'action des solvants des lipides, l'addition de chloroforme permet d'inactiver tous les microorganismes contenant des lipides (bactéries, levures...). C'est donc un moyen efficace de décontamination qui est obtenu en ajoutant 30 % de chloroforme à l'échantillon et en réalisant un mélange intime des deux phases par agitation mécanique violente durant 30 min. à la température du laboratoire.

Après avoir laissé reposer le mélange, la phase chloroformique est rejetée et les traces de chloroforme demeurant dans la phase aqueuse sont éliminées par barbotage d'air ou d'azote stérile. Le travail doit être réalisé sous hotte aspirante de façon à éviter tout risque d'intoxication par les vapeurs de chloroforme.

2.1.2.2. Traitement par antibiotiques

Le traitement par antibiotiques consiste à ajouter aux échantillons un mélange de molécules actives contre les bactéries et les champignons microscopiques à doses non toxiques pour les cultures cellulaires. Cette solution d'antibiotiques et d'antifongique (0,015 g de Néomycine, 0,1 g de Streptomycine, 100000 U.I. de Spécilline G, 5 mg d'Amphotéricine par mL) est ajoutée à raison de 0,1 mL par mL de concentrat ou d'extrait, et laissée en contact avec l'échantillon pendant 2 heures à 37° C avant l'inoculation aux systèmes sensibles.

2.1.3. Isolement des virus provoquant un effet cytopathogène

Les cellules en culture ne présentent pas toutes la même sensibilité aux virus, il est donc nécessaire de faire un choix parmi tous les systèmes cellulaires proposés en fonction des virus recherchés. Le tableau 15 indique un certain nombre de systèmes cellulaires sur lesquels différents virus rencontrés dans le milieu hydrique sont susceptibles de se multiplier en provoquant l'apparition de lésions caractéristiques ou Effet Cytopathogène (ECP).

Par ailleurs, la probabilité d'isoler un virus à partir d'un prélèvement augmente avec le

nombre de systèmes cellulaires inoculés. Il est matériellement difficile pour un laboratoire d'en utiliser un trop grand nombre, cependant, il est recommandé d'effectuer les isolements sur deux systèmes cellulaires différents.

De plus il a été montré que, en absence de toute altération cellulaire, il était nécessaire de réaliser systématiquement une, voire deux subcultures. Cette pratique augmente en effet le pourcentage d'isolement d'au moins 20 %.

Tableau 15
Sensibilité de différents systèmes cellulaires pour l'isolement des virus entériques
(Effet cyto-pathogène)

Cellules \ Virus	Virus						
	<i>Poliovirus</i>	<i>Coxsackievirus A</i>	<i>Coxsackievirus B</i>	<i>Echovirus</i>	<i>Réovirus</i>	<i>Adénovirus (1 à 39)</i>	<i>Adénovirus (40 à 41)</i>
Rein de singe (primaire)	+	-*	+	+	+	-	-
Véro	+	-*	+	+	+	±	-
BGM	+	-*	+	+	+	±	-
HeLa	+	-*	±	±	+	+	-
KB	+	-*	±	±	+	+	-
Hep 2	+	-*	±	±	+	+	-
RD	+	-*	-	+	±	+	-
MRC 5	+	-*	-	+	±	+*	-
L20 B	+				+		
PLC/PRF/5							+

* à l'exception de certaines souches.

L'isolement sur tapis cellulaire s'effectue en deux étapes principales : inoculation de l'échantillon et adsorption des virus sur les cellules, puis incubation en présence d'un milieu de survie liquide ou gélosé.

En milieu liquide la multiplication du virus à l'intérieur des cellules aboutit à la libération de virions néoformés dans le milieu de culture. Ceux-ci sont alors capables d'infecter n'importe quelle autre cellule du tapis cellulaire, ce qui provoque souvent sa destruction massive.

En milieu solide la technique connue sous le nom de méthode des plages consiste,

comme précédemment, à inoculer le prélèvement sur une culture cellulaire. Après adsorption des virus sur les cellules, l'inoculum est éliminé et le tapis cellulaire est recouvert par un milieu de survie gélosé. Dans ces conditions, les particules virales se multiplient à l'intérieur de la cellule mais les virus néoformés ne peuvent pas se disperser sur tout le tapis cellulaire et ils infectent uniquement les cellules adjacentes à celle qui leur a donné naissance. L'infection se propage donc de proche en proche et la multiplication d'une particule se traduit par l'apparition d'une plage de lyse cellulaire circulaire, visible à l'oeil nu. Celle-ci se présente comme une zone ronde incolore contrastant avec le reste de la culture cellulaire.

Il faut cependant signaler que cette méthode des plages n'est pas applicable à l'isolement de tous les virus mentionnés dans le tableau 15 car certains d'entre eux ne provoquent pas la formation de plages. Elle est surtout utilisée pour l'isolement des *Entérovirus*.

2.1.4. Isolement des virus se multipliant sur cultures cellulaires sans provoquer d'effet cytopathogène.

Un certain nombre de virus rencontrés dans le milieu hydrique sont susceptibles de se multiplier sur cultures cellulaires sans y provoquer d'effet cytopathogène. Parmi ces virus, certains peuvent se multiplier rapidement dans les cellules, c'est le cas des *Rotavirus*. D'autres ne présentent une multiplication intracellulaire décelable qu'après une très longue incubation (6 à 10 semaines) : c'est le cas du virus de l'hépatite A (CRANCE et al., 1983).

Par ailleurs, un certain nombre d'*Entérovirus* qui normalement provoquent un effet cytopathogène en cultures cellulaires, après passage dans le milieu hydrique se multiplient en cultures cellulaires sans provoquer d'effet cytopathogène (SHIEH *et al.*, 1997 ; GRABOW *et al.*, 1993).

La mise en évidence de ces virus qui se sont multipliés en cultures cellulaires sans donner d'effet cytopathogène est réalisée à l'aide soit de techniques immunologiques, soit de techniques de biologie moléculaire par la mise en œuvre d'une RT-PCR sur le produit résultant de la congélation-décongélation des cultures cellulaires (YATES *et al.*, 1999).

2.1.4.1. Mise en évidence par Immunofluorescence in situ (IF)

La mise en évidence et la quantification des *Rotavirus* est prise comme exemple de cette technique qui associe la culture du virus sur cellules in vitro et la révélation de la multiplication virale par une réaction d'immunofluorescence.

Le principe repose sur le fait que, dans le cytoplasme des cellules infectées (MA 104) par un *Rotavirus*, il y a synthèse en 48 heures d'antigène viral. Celui-ci est mis en évidence par une réaction d'I.F. in situ après fixation des cellules. Les Foci de fluorescence sont dénombrés par observation microscopique et les résultats sont donnés en nombre de foci fluorescents (FF).

2.1.4.2. Mise en évidence par Radio-Immuno Focalisation Assay (RIFA)

La méthode RIFA permet par autoradiographie de visualiser des foyers de multiplication d'un virus dans des cellules cultivées sous une couche d'agarose. Elle a été développée par LEMON et al. (1983) pour la quantification du virus de l'hépatite A (VHA)

2.1.4.3. Mise en évidence par biologie moléculaire

Au lieu de détecter les antigènes viraux dans les cellules infectées "in vitro", il est possible de mettre en évidence les acides nucléiques soit par hybridation moléculaire, soit par "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction" (RT-PCR). Dans ces conditions, les techniques de mise en évidence sont en tous points identiques à celles décrites dans la partie suivante (2.2.). L'avantage d'un ou de plusieurs passages préalables des échantillons sur culture cellulaire avant la détection des génomes viraux permet non seulement d'amplifier le signal viral (par multiplication des virus au niveau des cellules) et donc d'abaisser le seuil de détection mais surtout de témoigner du caractère infectieux des virus isolés (YATES *et al.*, 1999 ; GRABOW *et al.*, 1999b ; REYNOLDS *et al.*, 1995 et 1997 ; PUIG *et al.*, 1994). Cette technique d'ICC-PCR (Integrated Cell Culture Polymerase Chain Reaction) n'est applicable qu'aux virus cultivables mais elle constitue très vraisemblablement, pour ceux-ci, la technique de détection la plus sensible et la plus adaptée (GREENING *et al.*, 2000a ; SEIDEL *et al.*, 2000 ; GRABOW *et al.*, 2000).

2.2. Détection par biologie moléculaire

2.2.1. Principe

Le principe des techniques de biologie moléculaire repose sur la mise en évidence

spécifique d'acides nucléiques viraux soit par hybridation moléculaire, soit par amplification par polymérisation en chaîne.

2.2.1.1. Hybridation moléculaire

Cette technique consiste à fixer les acides nucléiques viraux sous forme de simple brin sur un support solide pour ensuite réaliser une hybridation avec des sondes spécifiques ADN ou ARN. Les sondes, marquées par des molécules radioactives ou antigéniques, sont révélées secondairement soit par autoradiographie, soit par des techniques immunoenzymatiques. L'hybridation moléculaire est applicable à la détection de tous les sérotypes de virus entériques (PRESTON *et al.*, 1990) mais du fait de sa limite de détection élevée (10^2 à 10^4 UFP/mL) elle est difficilement applicable directement à des échantillons de l'environnement. En outre la seule présence de génome ne permet pas de témoigner de l'état d'infectiosité du virus détecté (GERBA *et al.*, 1989 ; KOPECKA *et al.*, 1988 ; METCALF *et al.*, 1988).

2.2.1.2. Amplification par Polymerisation en Chaîne (APC) ou "Polymerase Chain Reaction" (PCR)

Cette technique permet d'amplifier *in vitro* une séquence nucléotidique présente initialement en une seule ou en quelques copies. Quelques heures suffisent pour amplifier au moins un million de fois l'acide nucléique viral d'un tout petit nombre de virions de telle sorte qu'il soit identifié ensuite facilement par hybridation moléculaire à l'aide d'une sonde marquée (MULLIS 1990 ; ERLICH *et al.*, 1991 ; SAIKI *et al.*, 1985 ; SAIKI *et al.*, 1988).

En général, il n'est pas nécessaire d'amplifier l'intégralité du génome viral. En revanche, la séquence nucléotidique du génome ou d'une partie de ce dernier doit être connue afin de faire synthétiser les 2 amorces oligonucléotidiques représentant les extrémités de la région que l'on veut amplifier.

La plupart des virus humains courants ont été séquencés partiellement ou en totalité et la PCR peut être utilisée dans presque tous les cas.

Un cycle de PCR comprend 3 étapes (Figure 6) :

- Dénaturation (94-96°C). Les brins d'ADN complémentaires cibles contenant la séquence à amplifier se séparent.
- Hybridation (50-60°C). Les amorces s'hybrident spécifiquement sur chacun des 2 brins d'ADN au niveau de courtes séquences qui flanquent la zone à amplifier.
- Elongation (60-72°C). L'ADN polymérase thermostable synthétise à partir de chaque amorce une copie complémentaire de chaque brin de la séquence.

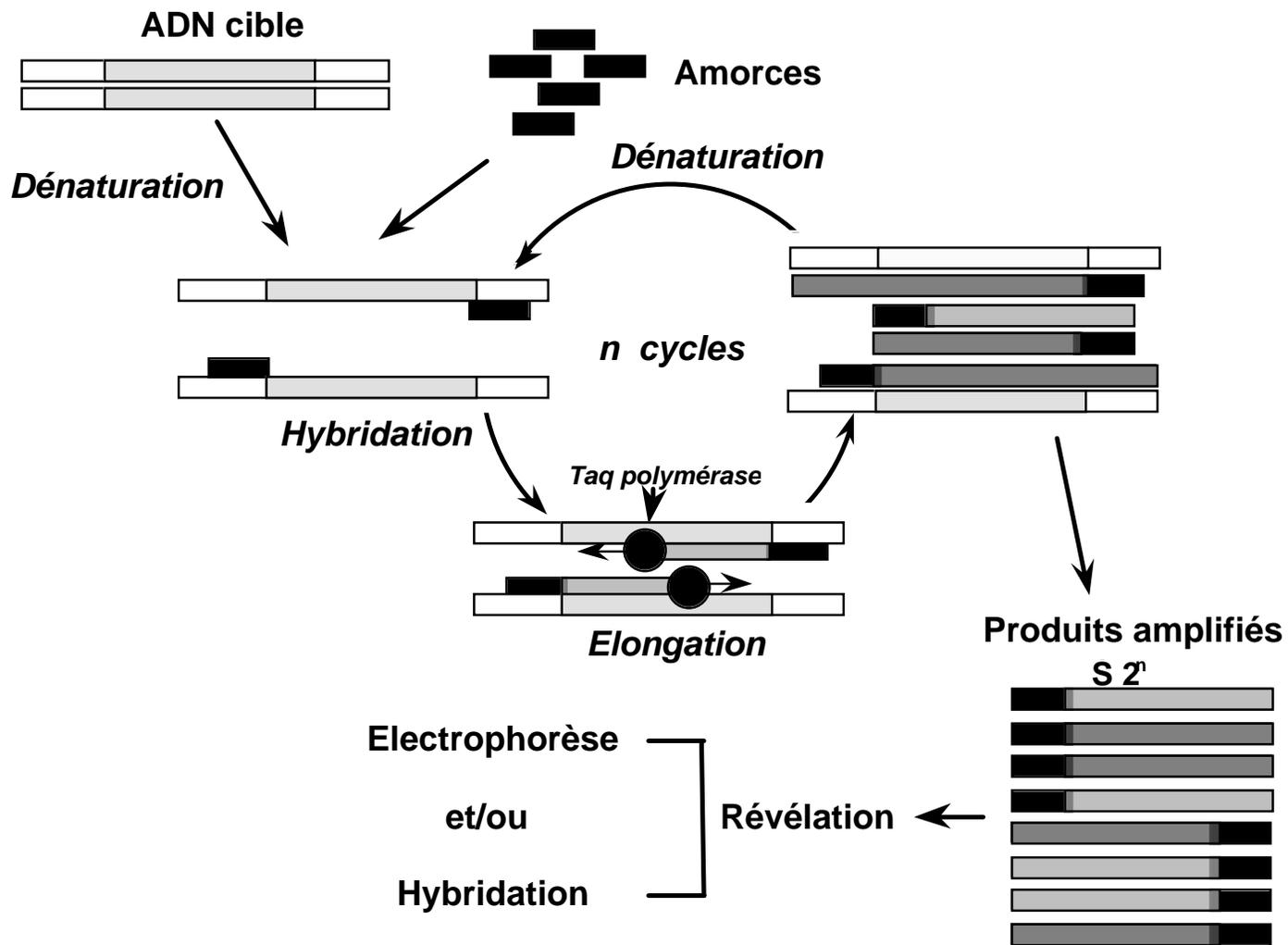


Figure 6 : Schéma de l'amplification par PCR

Ce cycle (dénaturation-hybridation-élongation) peut être répété de 30 à 40 fois ce qui conduit à une augmentation exponentielle du nombre de copies de la séquence cible. Ainsi en partant d'une seule copie, 30 cycles aboutissent à plus de 1 million de copies.

Cette partie cyclique de la PCR a été automatisée et est réalisée dans un thermocycleur qui permet d'effectuer les 30 à 40 cycles en une à quelques heures.

Pour cette technique, il est nécessaire d'employer une polymérase capable de fonctionner aux températures élevées (60-72°C lors de l'étape d'élongation) et de résister à des températures de 94-96°C (dénaturation) c'est le cas de l'ADN polymérase provenant du microorganisme *Thermophilus aquaticus* (Taq), présent à l'état naturel dans les sources chaudes (SAIKI *et al.*, 1988, KEOHAVONG *et al.*, 1989).

La "nested PCR" ou la "seminested PCR" font intervenir deux PCR successives, la deuxième PCR étant réalisée respectivement avec 2 nouvelles amorces ou une seule nouvelle amorce, la deuxième étant identique à l'une de celle utilisée lors de la première PCR. Les amorces utilisées lors de la seconde PCR doivent bien évidemment être complémentaires d'une région située à l'intérieur du fragment amplifié lors de la première PCR. C'est donc une méthode encore plus sensible que la PCR mais il est nécessaire de prendre des précautions drastiques pour éviter tous problèmes de contamination.

La majorité des virus entériques possédant un génome constitué d'ARN, il est nécessaire de réaliser, avant la PCR, une étape de rétro-transcription. Il s'agit de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) à partir de l'ARN viral à l'aide d'une transcriptase inverse ou "reverse transcriptase" (RT) isolée de différents *Retrovirus* animaux. Cette étape qui nécessite la présence d'une amorce pour initier la réaction s'effectue à 37-42°C pendant 30 à 60 min. Elle aboutit à des hybrides ARN-ADN dont le brin d'ADN peut être amplifié par PCR.

En résumé les génomes des virus entériques peuvent être amplifiés par RT-PCR, RT-seminested PCR ou RT-nested PCR.

Les produits amplifiés sont visualisés par :

- électrophorèse en gel d'agarose ou de polyacrylamide en présence de bromure d'éthidium et observation sous ultra-violet. Les fragments sont séparés en fonction de leur poids moléculaire. La révélation des fragments amplifiés après une simple électrophorèse reste la technique la moins sensible et est donc principalement utilisée après RT seminested PCR ou RT nested PCR.

- hybridation moléculaire (dot-blot ou slot blot). Les fragments amplifiés sont déposés sur des membranes (nylon ou nitrocellulose) et révélés par des sondes spécifiques marquées. Cette technique ne fournit aucune information sur la taille des fragments amplifiés mais est plus sensible et plus spécifique qu'une révélation après électrophorèse.

- couplage d'une électrophorèse et d'une hybridation moléculaire (Southern blot). Les fragments amplifiés sont séparés en fonction de leur poids moléculaire par électrophorèse puis transférés sur une membrane de nylon ou de nitrocellulose pour finalement être révélés par des sondes spécifiques marquées. C'est la technique la plus couramment utilisée car plus sensible et plus spécifique que la révélation après simple électrophorèse, elle permet de contrôler la taille des fragments amplifiés.

2.2.2. Détection du génome des virus entériques par RT-PCR

La recherche des génomes viraux s'effectue la plupart du temps à partir de concentrats viraux obtenus à partir de grands volumes d'eaux, de boues ou de tissus (coquillages). Or, les méthodes de concentration concentrent non seulement les virus mais aussi de nombreuses macromolécules susceptibles d'interférer avec les réactions enzymatiques mises en jeu lors de la RT-PCR. A ce jour aucune étude systématique d'identification de ces substances n'a été entreprise mais l'action inhibitrice du glycogène, des polysaccharides acides, des protéines et des ARN non cibles à fortes concentrations a été démontrée (JAYKUS *et al.*, 1993 ; LEES *et al.*, 1994 ; JAYKUS *et al.*, 1995 ; CROMEANS *et al.*, 1997). Afin d'améliorer le rendement des réactions enzymatiques de RT-PCR, il est donc nécessaire d'inclure des étapes

d'élimination de ces produits et donc de purification. Par ailleurs, il est nécessaire de procéder à l'extraction de l'ARN ou de l'ADN viral en particulier en dénaturant les capsides virales. Enfin, la détection proprement dite est réalisée à l'aide d'une amplification par PCR ou RT-PCR associée à un système de détection (hybridation moléculaire, électrophorèse, Southern blot). Compte-tenu du fait que la plupart des virus entériques susceptibles de se retrouver dans le milieu hydrique sont des virus à ARN nous développerons ici la mise en évidence des seuls virus à ARN et donc l'amplification par RT-PCR.

2.2.2.1. Extraction-purification

Les étapes de purification peuvent se situer en amont (purification des particules virales) ou en aval (purification des acides nucléiques) de l'étape d'extraction.

2.2.2.1.1. Purification des particules virales

Les techniques de purification spécifiques sont basées sur des réactions d'immunocaptures (IC) des virus. Les anticorps spécifiques d'un virus donné sont fixés sur un support solide et l'échantillon à analyser est mis en contact avec ces anticorps. Après incubation les virus restent fixés au niveau des anticorps et des lavages successifs permettent d'éliminer les éventuels inhibiteurs. Cette technique a été largement utilisée pour purifier le virus de l'hépatite A (JOTHIKUMAR *et al.*, 1998 ; SHAN *et al.*, 1997, MONCEYRON et GRINDE (1994) ; PREVOT *et al.*, 1993 ; GRAFF *et al.*, 1993 ; DENG *et al.*, 1994). Par contre, elle est plus délicate à mettre en oeuvre pour les *Entérovirus* ou les "*Norwalk like virus*" par exemple dont les sérotypes sont nombreux et pour lesquels il n'existe pas d'antigène de groupe.

Les techniques de purification non spécifiques sont basées sur la précipitation des protéines et donc des virus. Ainsi des traitements chimiques à base de cetyltriméthylammonium bromide (CTAB) ou de procipitate ont permis de purifier des virus vis-à-vis du glycogène et des polysaccharides contenus dans des concentrats d'huîtres (JAYKUS *et al.*, 1993 ; JAYKUS *et al.*, 1996).

2.2.2.1.2. Extraction des génomes viraux

Dans la plupart des cas la libération de l'ARN viral est obtenue par l'action d'agents dénaturants des protéines. Ceci permet non seulement de dégrader la capside virale

mais aussi d'inactiver les ribonucléases présentes dans le milieu. Cette étape peut s'effectuer soit par voie chimique à l'aide du thiocyanate ou de l'isothiocyanate de guanidium 4 M (CHOMCZYNSKI et SACCHI, 1987), soit par voie enzymatique en utilisant la protéinase K (200 µg/mL) en présence de détergent (SDS 1 %). La voie enzymatique nécessite une incubation à 56°C pendant 30-60 min.

D'autres auteurs préconisent un simple chauffage de l'échantillon 30 min. à 65°C pour libérer l'ARN viral (RICHARDSON *et al.*, 1988) mais dans ces conditions, il est nécessaire d'ajouter au préalable des inhibiteurs de ribonucléases.

2.2.2.1.3. Purification des acides nucléiques

De nombreuses techniques de purification des acides nucléiques viraux sont décrites dans la littérature. Il est possible de distinguer celles qui permettent d'éliminer les inhibiteurs de manière non sélective de celles qui éliminent sélectivement les inhibiteurs soit de type protéique, soit de type polysaccharide.

L'élimination non sélective des inhibiteurs consiste à fixer les ARN totaux ou les ARN viraux sur un support. Cette fixation peut s'effectuer par hybridation moléculaire. En effet les ARN viraux comme les ARNm possèdent à leur extrémité 3' non codante une séquence polyadénillée ("queue de poly A"). Il est donc possible d'immobiliser les acides nucléiques par hybridation sur des billes magnétiques sur lesquelles sont fixées des oligonucléotides formés de 15 à 25 résidus thymidine (oligo (dT)¹⁵⁻²⁵). Les billes sont ensuite fixées sur un support magnétique pour permettre d'éliminer les inhibiteurs par des lavages successifs (ALBERT *et al.*, 1992 ; SCARLATTI *et al.*, 1993).

Cette purification peut être appliquée à tous les virus dont le génome possède une "queue de poly A" (*Entérovirus*, *Norwalk like virus*...). Le même type de protocole peut être réalisé en substituant l'oligo (dT)¹⁵⁻²⁵ par une sonde spécifique d'un type de virus donné, par exemple les *Entérovirus* (REGAN et MARGOLIN, 1997 ; BEAULIEUX *et al.*, 1996).

La fixation des ARN peut aussi s'effectuer par adsorption non spécifique sur des supports telles que la silice (BOOM *et al.*, 1990) ou la poudre de verre (GREEN *et al.*, 1998 ; LEES *et al.*, 1994 ; HAFLIGER *et al.*, 1997) en présence d'agent chaotrope tel que le thiocyanate de guanidium. De la même manière que précédemment, les acides

nucléiques adsorbés peuvent être purifiés d'éventuels inhibiteurs par des lavages successifs.

L'élimination sélective des inhibiteurs de type protéique peut être obtenue soit par une ou deux extractions organiques (phénol : chloroforme : alcool isoamylique / 25:24:1) suivies d'une précipitation à l'éthanol ou à l'isopropanol (LE GUYADER *et al.*, 1996 ; ATMAR *et al.*, 1995 ; GANTZER *et al.*, 1999) soit par une précipitation à l'acide trichloracétique 5 % à chaud (FENG *et al.*, 1993).

Les inhibiteurs tels que le glycogène ou les polysaccharides peuvent être éliminés sélectivement par précipitation des acides nucléiques au CTAB (ATMAR *et al.*, 1993 ; JAYKUS *et al.*, 1993).

Enfin les sels et les protéines résiduelles de faible poids moléculaire peuvent être éliminés par chromatographie d'exclusion sur Séphadex G₅₀, G₁₀₀ ou G₂₀₀ (DE LEON *et al.*, 1992) ou sur résine échangeuse d'ions tel que le Chelex 100 (STRAUB *et al.*, 1994 ; HALE *et al.*, 1996).

2.2.2.2. RT-PCR et détection des fragments amplifiés

L'ARN viral extrait et purifié est d'abord transcrit en ADN complémentaire (ADNc) par rétro-transcription. Cette opération est réalisée dans un mélange réactionnel de pH et de composition ionique donnée à l'aide d'une enzyme de rétro-transcription (RT) soit d'origine aviaire (Avian Myeloblastesis Virus Reverse Transcriptase) soit d'origine murine (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). L'amorce utilisée peut être universelle (oligo (dT)¹⁵) complémentaire de l'extrémité poly A du génome viral) permettant de rétro-transcrire le génome entier ou spécifique ne transcrivant que le segment compris entre l'amorce et l'extrémité 5'.

L'ADNc est ensuite amplifié par PCR et de nombreux paramètres doivent être bien définis : la nature de la polymérase (Taq polymérase classique, rTth polymérase qui permet de réaliser simultanément la RT et la PCR, Polymérase "hot start" qui nécessite d'être activée à 92-94°C) la quantité d'enzyme (1 - 5 U), la concentration en dNTP (molarité optimale 20 à 200 µM pour chacune de 4 bases), la concentration en sel qui intervient au niveau de l'hybridation des amorces.

D'autres paramètres doivent être optimisés pour chaque nouvelle application de manière à définir les conditions optimales de la réaction. Il s'agit en particulier de la concentration en $MgCl_2$, de la température d'hybridation, de la concentration des amorces. En effet, $MgCl_2$ agit d'une part sur l'hybridation et la dissociation des couples matrice-produit PCR et matrice-amorce et d'autre part sur l'activité et la fidélité de l'enzyme. La concentration optimum varie d'un couple d'amorce à un autre de 0,5 à 10 mM. La durée et la température d'hybridation varient en fonction de la longueur, la composition et la concentration de chaque amorce.

En général, pour chaque nouveau couple d'amorce, il est souhaitable de débiter à une température de 5°C en dessous de la température de fusion des brins d'ADN et d'augmenter celle-ci de 3°C par essai.

Le nombre de cycles ne doit pas excéder 40 (sauf pour la polymérase "hot start") et dépend de la concentration initiale en ADN.

Le choix des amorces constitue bien évidemment une étape clé concernant la spécificité et la sensibilité de la réaction (Figure 7 et Tableau 16). Par exemple, lorsqu'elles sont choisies au niveau de la région 5' non codante du génome des *Entérovirus* (très conservé pour chaque sérotype) le génome de tous les *Entérovirus* (sauf *Echovirus 22*) peut être amplifié (LEPARC *et al.*, 1993). Par contre, des amorces choisies dans la région VP1 (région hypervariable chez les *Entérovirus*) sera très spécifique d'un sérotype donné. A l'inverse pour la recherche des *Norwalk-like virus* et des *Sapparo-like virus*, il apparaît que de nombreux couples d'amorces sont décrits dans la littérature mais aucun d'entre eux ne permet la mise en évidence de tous ces virus qu'ils appartiennent au génogroupe I ou au génogroupe II. Il est donc nécessaire de multiplier les analyses en utilisant différentes amorces, de façon à augmenter les chances de détection (Tableau 16).

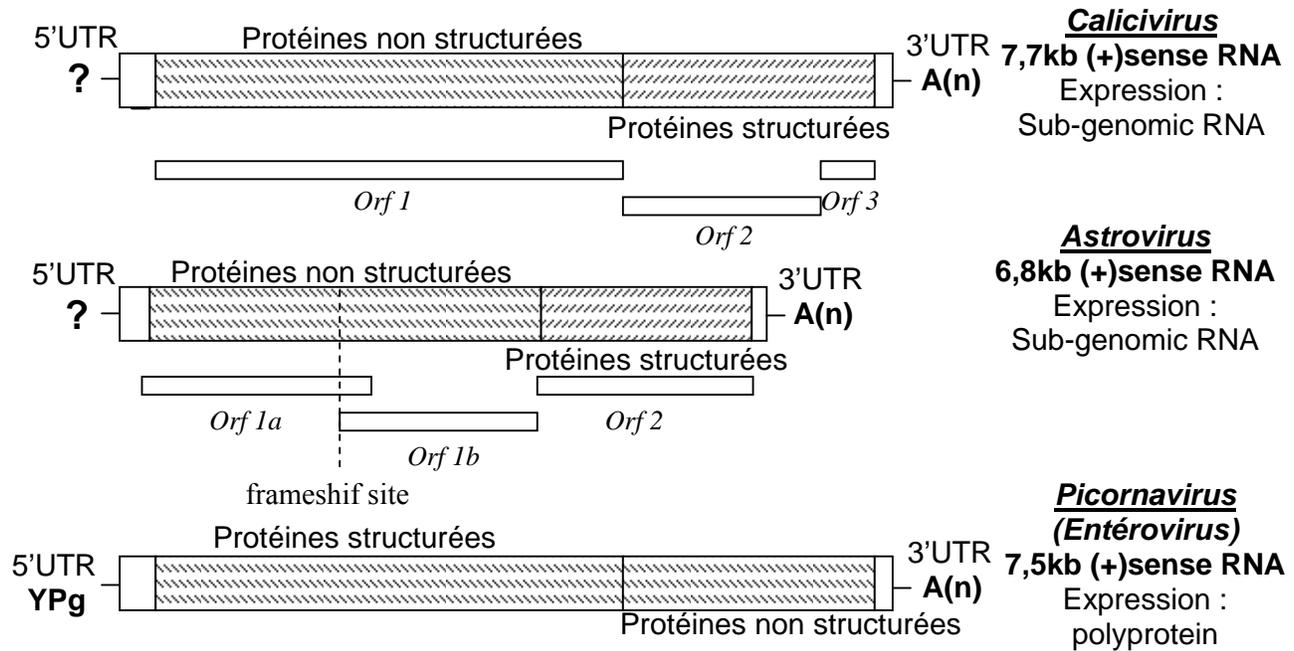


Figure 7
Génome de quelques virus entériques

Tableau 16
RT-PCR : Primer sets

	Number of primer sets	Primers location	Références
<i>Entérovirus</i>	1	5' NC	KOPECKA <i>et al.</i> , 1993...
<i>Hepatitis A virus</i>	1	VP ₁	APAIRE MARCHAIS <i>et al.</i> , 1995...
<i>Norwalk like virus : Genogroupe I et Genogroupe II</i>	? (at least 2)	ORF1 or ORF2	ANDO <i>et al.</i> , 1995 ; GREEN <i>et al.</i> , 1998 ; LEGUYADER <i>et al.</i> , 1996 ; HAFLIGER <i>et al.</i> , 1997...
<i>Rotavirus (A group)</i>	1	VP ₇ VP ₄	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990 GENTSCH <i>et al.</i> , 1992...
<i>Adénovirus 40 et 41</i>	1	Heson genes	ALLARD <i>et al.</i> , 1990...
<i>Astrovirus</i>	1	ORF1	BELLIOT <i>et al.</i> , 1997

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide ou d'agarose en présence de bromure d'éthidium permet l'analyse directe sous UV des produits amplifiés. Après transfert de l'ADN sur une membrane puis dénaturation, la spécificité peut être confirmée par hybridation avec une oligosonde spécifique marquée de 20 bases environ. Pendant longtemps, le marquage au ^{32}P a été la technique de référence. mais le marquage à la digoxigénine est très utilisé (FUCHS *et al.*, 1993).

En conclusion, la détection des génomes viraux peut être réalisée :

- pour l'eau :
 - directement à partir de l'échantillon
 - à partir des concentrats ce qui augmente très notablement la sensibilité de la méthode,
- pour les boues et le coquillages : - à partir des extraits
 - à partir des concentrats
- pour les produits maraîchers : - à partir des liquides de lavage

Il n'existe aucun consensus concernant ni les techniques d'extraction-purification des génomes viraux ni les protocoles d'amplification. Cependant, il est possible de considérer qu'il existe à l'heure actuelle des techniques de RT-PCR pour isoler tous les virus entériques dans tous les types d'échantillons provenant de l'environnement.

Ainsi, les *Entérovirus* (KOPECKA *et al.*, 1993 ; GILGEN *et al.*, 1995 ; GANTZER *et al.*, 1998), le virus de l'hépatite A (TSAI *et al.*, 1994 ; DIVIZIA *et al.*, 1998 ; JOTHIKUMAR *et al.*, 1998 ; ABBAZADEGAN *et al.*, 1999), les *Norwalk Like Viruses* (SCHWAB *et al.*, 1996 ; GILGEN *et al.*, 1997 ; LODDER *et al.*, 2000), les *Adénovirus* (PINTO *et al.*, 1994), les *Rotavirus* (ABBAZADEGAN *et al.*, 1999 ; DUBOIS *et al.*, 1997), les *Astrovirus* (PINTO *et al.*, 1995 ; GENTHE *et al.*, 1995 ; GIRONES *et al.*, 1993 et 1994 ; PINTO *et al.*, 2000) et le virus de l'hépatite E (CORWIN *et al.*, 1996) ont été détectés dans des échantillons d'eaux. Les *Entérovirus*

(LE GUYADER *et al.*, 1994 ; LEES *et al.*, 1994, JAYKUS *et al.*, 1996), le virus de l'hépatite A (ROMALDE, 1994 ; ATMAR *et al.*, 1995 ; LOPEZ-SABATIER *et al.*, 1997 ; CROMEANS *et al.*, 1997 ; SCHWAB *et al.*, 1998 ; BOSCH *et al.*, 2000 ; YAM *et al.*, 2000), les *Norwalk Like Viruses* (LE GUYADER *et al.*, 1996 ; HAFLIGER *et al.*, 1996 ; ATMAR *et al.*, 1995 ; GOUVEA *et al.*, 1994 ; ATMAR *et al.*, 1996 ; SCHWAB *et al.*, 1998 ; HENSHILWOOD and LEES, 2000 ; GREENING *et al.*, 2000b), les *Adénovirus* (PINA *et al.*, 1998), les *Rotavirus* (LE GUYADER *et al.*, 1994), les *Astrovirus* (MARX *et al.*, 1995 ; TRAORE *et al.*, 1998) et le virus de l'hépatite E (YAM *et al.*, 2000) ont été détectés dans des échantillons de fruits de mer. Enfin, les *Entérovirus* (STRAUB *et al.*, 1994a et 1994b ; LE GUYADER *et al.*, 1994 ; MONPOEHO *et al.*, 2000a et 2000b), le virus de l'hépatite A (GRAFF *et al.*, 1993, LE GUYADER *et al.*, 1994) et le *Rotavirus* (LE GUYADER *et al.*, 1994) ont été détectés dans des échantillons de boues ou de sédiments.

Cependant, quelle que soit la technique de biologie moléculaire utilisée, ces méthodes permettent uniquement de mettre en évidence la présence de génome viral dans un environnement. Or, la présence de génome ne permet pas d'affirmer la présence de virus infectieux, elle apporte simplement la preuve d'une contamination virale plus ou moins récente du milieu analysé.

2.3. Détection par technique immunologique

Les techniques de détection d'antigène viral par Immuno-enzymologie (ELISA) ou par radio-immunologie ont été préconisées. Elles permettent d'obtenir très rapidement le résultat de l'analyse et réalisent simultanément l'isolement et l'identification du virus. Mais elles ont l'inconvénient majeur de mettre en évidence uniquement des antigènes viraux et elles ne peuvent en aucun cas apporter la preuve de la présence d'un virus effectivement infectieux. Par ailleurs, leur utilisation en virologie de l'environnement est difficile compte-tenu de la faible quantité de virus présents dans les échantillons.

2.4. Détection par microscopie et immunomicroscopie électronique

La microscopie électronique (ME) combinée avec une technique de coloration négative est l'une des méthodes les plus rapides pour détecter un virus dans un liquide (ALAIN and BERTHIAUME, 1993). Son principal inconvénient réside dans sa faible

sensibilité mais celle-ci peut être augmentée en ajoutant un anticorps à l'échantillon étudié [immunoélectromicroscopie (IEM)].

En pratique l'échantillon est traité par coloration négative qui consiste à amplifier les contrastes dans la particule virale par l'utilisation de sels de métaux lourds. On mélange les virions en suspension aqueuse dans un volume identique d'acide phosphotungstique (2 - 4 %) en solution saline. Ce mélange est déposé sur une grille spéciale recouverte d'un film de collodion. Le liquide en excès est absorbé puis on laisse sécher l'échantillon à l'air. La grille est alors prête pour être examinée au microscope électronique (ALAIN *et al.*, 1987). Les particules virales se détachent en clair sur un fond assombri par les atomes de tungstène. Les électrons traversent le virus peu "opaque", mais pas le fond "métallique". Par cette technique, on ne peut détecter des virus à moins de 10^6 particules par mL.

Au cours de l'immunoélectromicroscopie, le traitement de l'échantillon par un anticorps spécifique du virus recherché conduit à agglutiner les particules virales : ces dernières sont donc plus visibles (sensibilité accrue de la technique de l'ordre de 10^4 particules par mL) et sont identifiées sérologiquement (spécificité). Cette méthode nécessite des contrôles positifs et négatifs rigoureux.

Les techniques de microscopie électronique après coloration négative et d'immuno-électromicroscopie, si elles permettent un diagnostic virologique rapide à partir d'échantillons de selles sont peu appropriées pour la détection de virus dans les eaux du fait de leur faible sensibilité. De plus, elles ne permettent pas de déterminer le caractère infectieux de la particule virale observée.

3. Détection des bactériophages

La détection des trois bactériophages susceptibles d'être recherchés dans le milieu hydrique est parfaitement codifiée puisqu'elle fait l'objet de Normes ISO. Ces 3 normes sont fondées sur l'incubation de l'échantillon à analyser avec une souche bactérienne réceptrice appropriée.

Les méthodologies proposées sont applicables à toutes les sortes d'eau, aux sédiments, aux boues et aux extraits de coquillages.

Les normes :

- ISO 10705-1 (1996) pour les F-spécifiques RNA bacteriophages,
 - ISO/DIS 10705-2 (1999) pour les coliphages somatiques,
 - ISO/DIS 10705-4 (2000) pour les bactériophages infectant *Bacteroides fragilis*
- sont données en annexe 17, 18 et 19.

Références

ABBASZADEGAN M., HUBER M.S., GERBA C.P. and PEPPER I.L. (1993). Detection of *Entérovirus* in groundwater with the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., **59** : 1318-1324.

ABBASZADEGAN M., STEWART P. and LE CHEVALIER M. (1999). A strategy for detection of viruses in ground water by PCR. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 444-449.

AHMED A.U. and SORENSEN D.L. (1995). Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. Water Environnement Research, **67**, 143-150.

ALAIN R. and BERTHIAUME L. (1993). Electron Microscopy. pp 99-109. In Payment and Trudel, Methods and Techniques in Virology. Marcel Dekker (New York).

ALAIN R., NADON F., SEGUIN C., PAYMENT P. and TRUDEL M. (1987). Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. J. Virol. Method., **16** : 209-216.

ALBERT J.A., WAHLBERG J., LUNDEBERG J., COX S., SANDSTROM E., WAHREN B. and UHLEN M. (1992). Persistence of azidothymidine-resistant human immunodeficiency virus type 1 RNA genotypes in post-treatment sera. J. Virol., **66**, 5627-5630.

ALBERT M. (1989). Extraction des virus entériques des boues résiduares et des sédiments, Thèse de doctorat, Metz, 181 p.

ALBERT M. and SCHWARTZBROD L. (1991). Recovery of *Entérovirus* from primary sludge using three elution concentration procedures. Wat. sci. Tech., **24**, 225-228.

ALBERT M., VANNESSON C. and SCHWARTZBROD L. (1995). Recovery of somatic coliphages in shellfish. Wat. Sci. Tech., **31**, 453-465.

ALBERTSSON P.A. (1958). Particle fractionation in liquid two-phase systems. The composition of some phase systems and the behavior of some model particles in their application to the isolation of cell walls from microorganisms. Biochim. Biophys. Acta, **27**, 378-395.

ALLARD A., GIRONES R., JUTO P. and WADELL G. (1990). Polymerase chain reaction for detection of *Adénovirus* in stool samples. J. Clin. Microbiol., **28** : 2659-2667.

ALOUINI M.D. and SOBSEY S. (1995). Evaluation of an extraction-precipitation method for recovering hepatitis A virus and *Poliovirus* from hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*). Wat. Sci. Tech., **5-6**, 465-469.

ANDO T., MONROE S.S., GENTSCH J.R., JIN Q., LEWIS D.C. and GLASS R.I. (1995). Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. J. Clin. Microbiol., **33** : 64-71

ANDRE M., FONTANA A. et HUGUES B. (1995). Intérêt de l'utilisation de la méthode en

milieu liquide dans l'isolement et la numération des virus en milieu hydrique. Communication au 4^o congrès de la Société Française de Microbiologie, Tours.

APAIRE-MARCHAIS V., ROBERTSON B.H., AUBINEAU-FERRE V., LE ROUX M.G., LEVEQUE F., SCHWARTZBROD L. and BILLAUDEL S. (1995). Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. Appl. Environ. Microbiol., **61** : 3977-3980.

ARMON R., ARELLA M. and PAYMENT P. (1988). A highly efficient second-step concentration technique for bacteriophages and enteric viruses using ammonium sulfate and tween 80. Can. J. Microbiol., **34**, 651-655.

ATMAR R.L., METCALF T.G., NEIL F.H. and ESTES M.K. (1993). Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 631-635.

ATMAR R.L., NEIL F.H., ROMALDE J.L., LE GUYADER F., WOODLEY C.M., METCALF T.G and ESTES M.K. (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3014-3018.

ATMAR R.L., NEILL F.H., WOODLEY C.M., MANGER R., FOOT G.S., BURKHARDT W., LEJA L., Mc GOEVEN E.R. ; LE GUYADER F., METCALF T.G. and ESTES M.K. (1996). Collaborative evaluation of a method for the detection of *Norwalk like virus* in shellfish tissues by PCR. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 254-258.

BATES J. and GODDARD M.R. (1980). Recovery of seeded viruses from activated sludge. In "Viruses and wastewater treatment" symposium of Surrey, Goddard M. & Butler M. ed.

BEAULIEUX F., SEE D.M., LEPARC-GOFFART I., AYMARD M. and LINA B. (1996). Use of magnetic beds versus guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform RNA extraction followed by polymerase chain reaction for rapid, sensitive detection of *Entérovirus* RNA. Res. Virol., **148**, 11-15.

BELLIOT G., LAVERAN H. and MONROE S.S. (1997). Detection and genetic differentiation of human *Astroviruses* : phylogenetic grouping varies by coding region. Arch. Virol., **142** : 1323-1334.

BEMISS J.A., LOGAN M.M., SAMPLE J.D. and RICHARDS G.P. (1989). A method for the enumeration of *Poliovirus* in selected molluscan shellfish. J. Virol. Meth., **26**, 905-909.

BERG G. and DAHLING D.R. (1980). Method for recovering viruses from river water solids. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 850-853.

BERG G., BERMAN D. and SAFFERMAN R.S. (1982). A method for concentrating viruses recovered from sewage sludges. Can J. Microbiol., **28**, 553-556.

BERG G., BERMAN D., CHANG S.L. and CLARKE N.A. (1966). A sensitive quantitative method for detecting small quantities of viruses in large volumes of water. Am. J. Epidem., **83**, 196-203.

BERG G., DAHLING D.R. and BERMAN D. (1971). Recovery of small quantities of

- viruses from clean waters on cellulose membrane filters. Appl. Microbiol., **22**, 608-614.
- BERG G., SAFFERMAN R.S., DAHLING D.R., BERMAN D. and HURST C.Y. (1984). « U.S. Environmental Protection Agency Manual of Methods for Virology ». Publication EPA-600/4-84-013, EPA, Cincinnati, OH.
- BERIL C., BOHER S. and SCHWARTZBROD L. (1991). Detoxification by Sephadex LH20 of seafood concentrates for *Rotavirus* assay. Wat. Sci. Tech., **24**, 417-421.
- BERMAN D., ROHR M.E. and SAFFERMAN R.S. (1980). Concentration of *Poliovirus* in water by molecular filtration. Appl. Environ. Microbiol., **40** : 426-428.
- BIER M., BRUCHNER G.C., COOPER F.C. and ROY H.E. (1967). Concentration of bacteriophage by electrophoresis. In « Transmission of Viruses by the Water Route », G. BERG, Ed. Interscience Publishers, New York, **57-75**.
- BITTON G., CHOU Y.J. and FARRAH S.R. (1982). Techniques for virus detection in aquatic sediments. J. Virol. Methods, **4**, 1-8.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M., AGBALIKA F., LAVERAN H. and DELOINCE R. (1987). Concentration of hepatitis A. Water Res., **21**, 683-686.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M. and DELOINCE R. (1989). Hepatitis A virus concentration from experimentally contaminated distilled, tap, waste and seawater. Wat. Sci. Tech., **21**, 255-258.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M. et DELOINCE R. (1986). Seconde étape de concentration du virus de l'hépatite A à partir d'une eau contaminée : comparaison entre la précipitation par le polyéthylène glycol et la floculation organique. Acta. microbiol. Helv., **31**, 29-40.
- BOHER S. (1991). Analyse virologique des huîtres et études des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale. Thèse Université, Nancy, 206 p.
- BOHER S. and SCHWARTZBROD L. (1993). Study of viral purification of oysters. Wat. Sci. Tech., **27**, 55-60.
- BOOM R., SOL J.A., SALIMANS M.M., JANSEN L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M. and VAN DER NORRDA J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol., **28**, 495-503.
- BORREGO J.J., CORNAX R., PRESTON D.R., FARRAH S.R., Mc ELHANEY B. and BITTON G. (1991). Development and application of new positively charged filters for recovery of bacteriophages from water. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 1218-1222.
- BOSCH A., GAJARDO R., ABAD F.X., DIEZ J.M. and JOFRE J. (1991). Concentration of hepatitis A virus in environmental samples. Wat. Sci. Tech., **24**, 229-234.
- BOSCH A., LUCENA F. and JOFRE J. (1986). Fate of human enteric viruses (*Rotaviruses* and *Entéroviruses*) in sewage after primary sedimentation. Wat. Sci. Tech., **18**, 47-52.

BOSCH A., PINTO R.M. and ABAD F.X. (1995). Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. Wat. Sci. Techn., **31**, 447-451.

BOSCH A., SANCHEZ G., LE GUYADER F., VANACLOCHA H., HAUGARREAU L. and PINTO R.M. (2000). Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. 1st world water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

BRASHEAR D.A. and WARD R.L. (1982). Comparison of methods for recovering indigenous viruses from raw wastewater sludge. Appl. Environ. Microbiol., **43**, 1413-1418.

CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N. (1987). Single step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroforme extraction. Anal. Biochem., **162**, 156-159.

CLIVER D.O. (1975). Virus associated with wastewater solids. Environ. Letters, **10**, 215-223.

CLIVER D.O., ELLENDER R.D. and SOBSEY M.D. (1983). Methods to detect viruses in foods : testing and interpretation of results. J. Food Protect., **46**, 345-357.

COOKSON J.T. and NORTH W.J. (1967). Adsorption of viruses on activated carbon. Equilibria and Kinetics of the attachment of *Escherichia coli*, bacteriophage T4, on activated carbon. Environ. Sci. Tech., **1**, 46-52.

CRANCE J.M., DELOINCE R., LECHEVALLIER C., CREVAT D., LAVERAN H. et FONTANGES R. (1983). Libération du virus de l'hépatite A dans le milieu de culture lors de sa répllication dans les cellules PLC/PRF/5. C.R. Acad. Sci., **297**, 111-114.

CROCI L., DE FELIPE G., GIZZARELLI S., TOTI L., AGRIGENTO S., AMATO C., LOMBARDI F., NOVELLO F. and SANTORO R. (1984). Methodology for the determination of *Polioviruses* in edible lamellibranch molluses. Microbiologie-Aliments-Nutrition, **2**, 85-90.

CROMEANS T.L., NAINAN O.V. and MARGOLIS H.S. (1997). Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 2460-2463.

DE LEON R., MATSUI S.M., BARIC R.S., HERRMANN J.E., BLACKLOW N.R., GREENBERG H.B. and SOBSEY M.D. (1992). Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. J. Clin. Microbiol., **30**, 3151-3157.

DENG M.I., DAY S.P. and CLIVER D.O. (1994). Detection of hepatitis A virus in environmental samples by antigen-capture PCR. Appl. Environ. Microbiol., **60** : 1927-1933.

DIVIZIA M., RUSCIO V., DEGENER A.M. and PANA A. (1998). Hepatitis A virus detection in wastewater by PCR and hybridization. Microbiologica, **21**, 161-167.

DIVIZIA M., SANTI A.L. and PANA A. (1989). Ultrafiltration : an efficient second step for hepatitis A virus and *Poliovirus* concentration. J. Virol. Methods, **23** : 55-62.

DUBOIS E., LE GUYADER F., HAUGARREAU L., KOPECKA H., CORMIER M. and

- POMMEPUY M. (1997). Molecular epidemiology survey of *Rotaviruses* in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction length polymorphism assay. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 1794-1800.
- ELLENDER R.D. and SWEET B.H. (1972). Newer membrane concentration process and their application to the detection of virus pollution of waters. Water Res., **6**, 741-746.
- ENGLAND B. (1970). Protamine sulfate precipitation of reovirus and *Adénovirus* for their assay on sewage and effluents. Bacterial Proc., **194**, 202-206.
- Environmental Protection Agency (1992). Standards for the disposal of sewage sludge. EPA Washington D.C. : federal register, 9387-9404.
- ERLICH H.A., GELFAND D. and SNINSKY J.J. (1991). Recent advances in the polymerase chain reaction. Science, **252** : 1643-1651.
- FARRAH S.R. and BITTON G. (1978). Elution of *Poliovirus* adsorbed to membrane filters. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 982-984.
- FARRAH S.R., GIRARD M.A., TORANZOS G.A. and PRESTON D.R. (1988). Adsorption of viruses to diatomaceous earth modified by in situ precipitation of metallic salts. Z. Gesamte Hyg., **34**, 520-521.
- FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C. and MELNICK J.M. (1978) Concentration of *Poliovirus* from tap water onto membrane filters with aluminium chloride at ambient pH levels. Appl. Environ. Microbiol., **35**, 624-626.
- FARRAH S.R., SCHEUERMAN P.R. and BITTON G. (1981). Urea-lysine method for recovery of *Entéroviruses* from sludges. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 455-458.
- FENG Y. and XU X. (1993). A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by polymerase chain reaction. J. Virol. Methods, **43**, 77-84.
- FOLIGUET J.M. et MICHELET S. (1969) L'élimination des *Entérovirus* au cours du traitement des eaux de distribution publique. Rev. Hyg. Med. Soc., **17**, 175-206.
- FUCHS F., LEPARC I., KOPECKA H., GARIN D. and AYMARD M. (1993) Use of cRNA digoxigenin-labelled probes for detection of *Entéroviruses* in humans and in the environment. J. Virol. Methods, **42**, 217-226.
- GAERTNER H. (1967). Retention and recovery of *Polioviruses* on a soluble ultrafilter. In « Transmission of Viruses by the Water Route » G. BERG, Ed. Interscience Publishers, New York, 121-127.
- GANTZER C., MAUL A., AUDIC J.M. and SCHWARTZBROD L. (1998). Detection of infectious *Entéroviruses*, *Entérovirus* genomes, somatic coliphages and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 4307-4312.
- GANTZER C., MUSSEAU S. and SCHWARTZBROD L. (1999). Personal communication.

- GANTZER C., SENOUCI S., BERIL C. et SCHWARTZBROD L. (1995). Détection des *Entérovirus* par RT-PCR et cultures cellulaires après concentration sur laine ou poudre de verre. Application aux eaux usées épurées. Communication au 4^e Congrès de la Société Française de Microbiologie, Tours.
- GARIN D., FUCHS F., GRANCE J.M., DELOINCE R., AYMARD M. and BARTOLI M. (1993). Validation of an ultrafiltration process to concentrate viruses from large volumes of water. Environmental Tech., **14**, 397-400.
- GENTHE B., GERICKE M., BATEMAN B., MJOLI N. and KFIR R. (1995). Detection of enteric *Adénovirus* in South African waters using gene probes. Wat. Sci. Tech., **31**, 345-350.
- GENTSCH J.R., GLASS R.I., WOODS P., GOUVEA V., GORZIGLIA M., FLORES J., DAS B.K. and BAHN M.K. (1992). Identification of group A *Rotavirus* gene 4 types by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol., **30**, 1365-1373.
- GERBA C.P. (1984). Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. Adv. Appl. Microbiol., **30**, 133-168.
- GERBA C.P. and GOYAL S.M. (1982). Methods in environmental virology. Microbiology Series, vol 7, Ed. Marcel Dekker, Inc. New York and Basel, 151-160.
- GERBA C.P., MARGOLIN A.B. and HELWLETT M.J. (1989). Application of gene probes to virus detection in water. Wat. Sci. Tech., **21**, 147-154.
- GILGEN M., GERMANN D., LUTHY J. and HUBNER P. (1997). Three step isolation method for sensitive detection of *Entérovirus Rotavirus*, hepatitis A virus and small round structured viruses in water samples. Int. J. Food Microbiol., **37**, 189-199.
- GILGEN M., WEGMULLER B., BURKHALTER P., BUHLER H.P., MULLER U., LUTHY J. and CADRIAN U. (1995). Reverse transcription PCR to detect *Entéroviruses* in surface water. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 1226-1231.
- GIRONES R., ALLARD A., WADELL G. and JOFRE J. (1993). Application of PCR for the detection of *Adénovirus* in polluted waters. Wat. Sci. Tech., **27**, 235-242.
- GIRONES R., PUIG M., ALLARD M., LUCENA F., WADELL G. and JOFRE J. (1995). Detection of *Adénovirus* and *Entérovirus* by PCR amplification in polluted waters. Wat. Sci. Tech., **31**, 351-358.
- GLASS J.S., VAN SLUIS R.J. and YANKO W.A. (1978). Practical method for detecting *Poliovirus* in anaerobic digested sludge. Appl. Environ. Microbiol., **35**, 983-985.
- GODBOLE S.H., ILLAVIA S.J. and RAWAL B.D. (1966). A method for the examination of large volumes of water samples for the detection of virus pollution in suspended cell culture. Environ. Hlth. (India) **8**, 70-72.
- GODDARD M.R., BATES J. and BUTLER M. (1981). Recovery of indigenous *Entéroviruses* from raw and digested sewage sludges. Appl. Environ. Microbiol., **42**, 1023-1028.

GOUVEA V., GLASS R.I., WOODS P., TANIGUCHI K., CLARK H.F., FORRESTER B. and FANG Z.Y. (1990). Polymerase chain reaction amplification and typing of *Rotavirus* nucleic acid from stool specimens. J. Clin. Microbiol., **28**, 276-282.

GOUVEA V., SANTOS N., TIMENETSKY M. do C. and ESTES M.K. (1994). Identification of Norwalk virus in artificially seeded shellfish and selected foods. J. Virol. Methods, **48**, 177-187.

GRABOW W.O.K., BOTMA K.L., DE VILLIERS J.C., CLAY C.G. and ERASMUS B. (1999b). Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedure for the detection of *Polioviruses* in wastewater. Bull. WHO, **77**, 973-980.

GRABOW W.O.K., PUTTERGILL D.L. and BOSCH A. (1993). Plaque assay for *Adenovirus* type 41 using the PLC/PRF/5 liver cell line. Water Sc. Tech., **27**, 321-327.

GRABOW W.O.K., TAYLOR M.B., CLAY C.J. and DE VILLIERS J.C. (1999a). Molecular detection of viruses in drinking water. Implications for safety and disinfection. Second conference of the international life science institute : the safety of water disinfection : Balancing chemical and microbial risks. Miami (USA) Novembre 1999.

GRABOW W.O.K., TAYLOR M.B. and VILLIERS J.C. (2000). New methods for the detection of viruses call for review of drinking water quality guidelines. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

GRAFF J., TICEHURST J. and FLEHMIG B. (1993). Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture PCR. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 3165-3170.

GREEN J., HENSHILWOOD K., GALLIMORE C.I., BROWN D.W.G. and LEES D.N. (1998). A nested transcriptase PCR Assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 858-863.

GREENING G., DAWSON J. and LEWIS G. (2000a). Use of integrated cell culture-PCR (ICC-PCR) to determine *Poliovirus* survival in river water. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

GREENING G.E., SIMMONS G. and DAWSON J. (2000). Detection and identification of *Norwalk-like viruses* (NLV) in oysters associated with outbreaks of gastroenteritis in New Zealand. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

GROSSOWITZ N., MERCADO A. and GOLDBLUM N. (1960). A simple method for concentration of live and formaldehyde inactivated *Poliovirus*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **103**, 872-874.

GUTTMAN-BASS N. and ARMON R. (1983). Concentration of simian *Rotavirus* SA-11 from tap water by the membrane filtration and organic flocculation. Appl. Environ. Microbiol., **45**, 850-855.

GUTTMAN-BASS N., CATALANO-SHERMAN J. and HOSTOVSKY T. (1984). Efficiency of virus recovery in water : effect of inorganic and organic chemicals. Monogr.

Viro., **15**, 111-118.

HAFLIGER D., GILGEN M., LUTHY J. and HUBNER P. (1997). Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. Int. J. Food Microbiol., **37**, 27-36.

HALE A.D., GREEN J., BROWN D.W.G. (1996). Comparison of four RNA extraction methods for the detection of small round structured viruses in faecal specimens. J. Viro. Methods, **57**, 195-201.

HAMPARIAN V.V., OTTOLENGHI A.C. and HUGUES J.H. (1985). *Entéroviruses* in sludge : multiyear experience with four wastewater treatment plant. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 280-286.

HENSHILWOOD K. and LEES D. (2000). The application of molecular techniques to the investigation of gastroenteric infection associated with molluscan shellfish. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

HILL W.F., AKIN E.W. and BENTON W.H. (1971). Detection of viruses in water : A review of methods and application. Water Res., **5**, 967-995.

HILL W.F., AKIN E.W., NETON W.H., MAYHEW C.J. and METCALF T.G. (1974). Recovery of *Poliovirus* from turbid estuarine water on microporous filters by the use of celite. Appl. Microbiol., **27**, 506-512.

HOMMA A., SOBSEY M.D., WALLIS C. and MELNICK J.L. (1973). Virus concentration from sewage. Water Res., **7**, 945-950.

HURST C.J., DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S. and GOYKE T. (1984). Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples. Can. J. Microbiol., **30**, 1253-1263.

HURST C.J., FARRAH S. R., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1978). Development of quantitative methods for the detection of *Entéroviruses* in sewage sludges during activation and following land disposal. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 81-89.

HURST C.J. and GOYKE T. (1986). Improved method for recovery of enteric viruses from wastewater sludge. Wat. Res., **20**, 1321-1324.

JAKUBOWSKI W., HILL W.F. and CLARKE N.A. (1975). Comparative study of four microporous filters for concentrating viruses from drinking water. Appl. Microbiol., **30**, 58-65.

JANSONS J. and BUCENS M.R. (1986). Virus detection in water by ultrafiltration. Water Res., **20**, 1603-1606.

JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1993). Application of RT-PCR for the detection of enteric viruses in oysters. Water Sci. Technol., **27**, 49-53.

JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1995). Development of a molecular method for the detection of enteric viruses in oysters. J. Food. Prot., **58**, 1357-1362.

JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1996). A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 2074-2080.

JOHNSON J.H., FIELDS J.E. and DARLINGTON W.A. (1967). Removing viruses from water by polyelectrolytes. Nature, **213**, 665-667.

JORET J.C., BLOCK J.C., LUCENA-GUTIERREZ F., SCHWARTZBROD L., HUGUES B. and PLISSIER A. (1980). Virus concentration from secondary wastewater : comparative study between epoxy fiberglass and glass powder adsorbants. Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechn., **10**, 245-252.

JORET J.C. and WULLENWEBER M. (1983). Comparative study on methods to recover indigenous viruses from samples of activated sewage sludge. Zbl. Bakt. Hyg., **177**, 482-489.

JOTHIKUMAR N., CLIVER D.O. and TADESSE W.M. (1998). Immunomagnetic capture PCR for rapid concentration and detection of hepatitis A virus from environmental samples. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 504-508.

KATZENELSON E., FATTAL B. and HOSTOVESKY T. (1976). Organic flocculation : an efficient second step concentration method for the detection of virus from water. Appl. Environ. Microbiol., **32**, 638-639.

KEOHAVONG P. and THILLY W.G. (1989). Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 9253-9257.

KOPECKA H., DUBROU S., PREVOT J., MARECHAL J. and LOPEZ-PILA J.M. (1993). Detection of naturally occurring *Entéroviruses* in waters by reverse transcription, Polymerase Chain Reaction and hybridization. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 1213-1219.

KOPECKA H., PREVOT J., GIRARD M., FUCHS F. et AYMARD M. (1988). Intérêt des sondes ARNc (Ribosondes) synthétisées in vitro dans la détection des *Entérovirus* par hybridation moléculaire. Ann. Inst. Pasteur/Virol., **139**, 217-225.

KOSTENBADER J.R. and CLIVER D.O. (1983). Membrane filter evaluations using *Poliovirus*. J. Virol. Methods, **7**, 253-257.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M., THOMAS M.Z. and VICALE T.J. (1978). Efficiency of beef extract for the recovery of *Poliovirus* from wastewater effluents. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 544-548.

LAVERAN H., BEYTOUT D. et CHARRIER F. (1976). Adsorption d'*Entérovirus* sur des membranes en nitrate de cellulose : influence de sels minéraux, de détergents et du sérum de veau. Ann. Microbiol. (Inst. pasteur), **127A**, 439-446

LE GUYADER F., APAIRE-MARCHAIS V., BRILLET J. and BILLAUDEL (1993). Use of genomic probes to detect hepatitis A virus and *Entérovirus* RNAs in wild shellfish and relationship of viral contamination to bacterial contamination. Appl. Environ. Microbiol., **59**, 3963-3968.

LE GUYADER F., DUBOIS E., MENARD D. and POMMEPUY M. (1994). Detection of hepatitis A virus, *Rotavirus*, and *Entérovirus* in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 3665-3671.

LE GUYADER F., MENARD D., DUBOIS E., HAUGARREAU L., KOPECKA H. and POMMEPUY M. (1997). Use of an RT-PCR internal control to evaluate viral removal. Wat. Sci. Technol., **35**, 461-465.

LE GUYADER F., NEIL F.H., ESTES M.K., MONROE S.S., ANDO T. and ATMAR R.L. (1996). Detection and analysis of small round-structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 4268-4272.

LEES D.N., HENSHILWOOD K. and DORE W.K. (1994). Development of a method for detection of *Entéroviruses* in shellfish by PCR with *Poliiovirus* as a model. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2999-3005.

LEMON S.M., BINN L.N. and MARCHWICKI R.H. (1983). Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell culture. J. Clin. Microbiol., **17**, 834-839.

LEPARC I., FUCHS F., KOPECKA H. and AYMARD M. (1993). Use of the polymerase chain reaction with a murine model of Picornavirus induced Myocarditis. J. Clin. Microbiol., **31**, 2890-2894.

LEWIS G.D. and METCALF T.G. (1988). Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human *Rotavirus*, from oyster, water and sediment samples. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1983-1988.

LODDER W.J., NIJST A., HOLWERDA A., LEENEN E.J. and DE RODA HUSMAN A.M. (2000). Presence of Norwalk-like *Calicivirus* in Dutch surface waters. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

LOGAN K.B., REES G.E., SEELEY N.D. and PRIMROSE S.B. (1980). Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater : Evaluation of positive charged microporous filters. J. Virol. Methods, **1**, 87-97.

LOPEZ-SABATIER E.I., DENG M.Y. and CLIVER D.O. (1997). Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in american oyster (*Crassostrea virginica*). Lett. Appl. Microbiol., **24**, 101-104.

LUCENA F. (1999). Personnal communication.

LUCENA F., MUNIESA M., PUIG A., ARAUJO R. and JOFRE J. (1995). Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. J. Virol. Methods, **54**, 121-130.

LUDHOLN B. and NIELSEN A.L. (1980). Methods for detection of virus in wastewater, applied to samples from small scale treatment systems. Water Res., **14**, 169-173.

MA J.F., NARANJO J. and GERBA C.P. (1994a). Evaluation of Mk filters for recovery of *Entéroviruses* from tap water. App. Environ. Microbiol., **60**, 1974-1977.

MA J.F., STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994b). Cell culture and PCR determination of *Poliovirus*, inactivation by disinfectants. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 4203-4206.

MARX F.E., TAYLOR M.B. and GRABOW W.O.K. (1995). Optimization of a PCR method for the detection of *Astrovirus* type 1 in environmental samples. Wat. Sci. Tech., **31**, 359-362.

MELNICK J.L., EMMONS J., OPTON E.M. and COFFEY J.M. (1964). *Coxsackieviruses* from sewage ; methodology including evaluation of grab sample and gauze pad collection procedures. Am. J. Hyg., **59**, 185-195.

METCALF T.G., ECKERSON D. and MOULTON E. (1980). A method for recovery of viruses from oysters and hard and soft clams. J. Food Protect., **43**, 89-90.

METCALF T.G., ECKERSON D., MOULTON E. and LARKIN E.P. (1980). Uptake and depletion of particulate-associated *Polioviruses* by the soft shell clams. J. Food. Protect., **43**, 87-88.

METCALF T.G., JIANG X., ESTES M.K. and MELNICK J.L. (1988). Nucleic acid probes and molecular hybridization for detection of viruses in environmental samples. Prog. Med. Virol., **35**, 186-214.

METCALF T.G., MOULTON E. and ECKERSON D. (1980). Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 141-152.

MIGNOTTE B., MAUL A. and SCHWARTZBROD L. (1999). Comparative study of techniques used to recover viruses residual urban sludge. J. Virol. Met., **78**, 71-80.

MIGNOTTE B., TERVER D. and SCHWARTZBROD L. (1997). Comparative study of *Poliovirus* techniques from mussel tissues. Marine Poll. Bull., **34**, 875-879.

MONCEYRON C. and GRINDE B. (1994). Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR. J. Virol. Methods, **46**, 157-166.

MONPOEHO S., FERRE V., COSTA M., ARNAL C. and BILLAUDEL S. (2000). Real-time RT-PCR with an internal positive control for the quantification of *Enteroviruses* in sludge. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

MONPOEHO S., MIGNOTTE-CADIERGUES B., MAUL A., BILLAUDEL S. and SCHWARTZBROD L. (2000a). Quantification of *Entéroviruses* in urban sludge by RT-PCR and cell culture : comparative study of extraction techniques. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

MULLIS K.B. (1990). The unusual origin of the polymerase chain reaction. Scient. Amer., **262**, 56-65.

NUPEN E.M. and BATEMAN B.W. (1985). The recovery of viruses from drinking water by means of an in-line electropositive cartridge filter. Water Sci. Technol., **17**, 63-69.

PAYMENT P., GERBA C.P., WALLIS C. and MELNICK J.L. (1976). Methods for concentrating viruses from large volumes of estuarine water on pleated membranes. Water Res., **10**, 893-896.

PAYMENT P. and TRUDEL M. (1979). Efficiency of several microfiberglass fibers for recovery of *Poliovirus* from tap water. Appl. Environ. Microbiol., **38**, 365-368.

PAYMENT P. and TRUDEL M. (1985). Concentration and purification of viruses by molecular filtration and ultracentrifugation methods. Chap. 34. In Biotechnology : Applications and research (Cheremisinoff et Ouellette). Technomic Publishing Co (Basel).

PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J. and GIRONES R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish : human *Adénovirus* detection by PCR as an index of human viruses. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3376-3382.

PINTO R.M., ABAD F.X., GAYARDO R. and BOSCH A. (1996). Detection of infectious *Astroviruses* in water. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 3073-3077.

PINTO R.M., DIEZ J.M., GAJARDO R. and BOSCH A. (1994). Detection of fastidious enteric viruses by cell culture and molecular hybridization. IAWQ Biennal Intern. Conf. Budapest.

PINTO R.M., VILLENA C., LE GUYADER F., GUIX S., CABALLERO S., POMMEPUY M. and BOSCH A. (2000). *Astrovirus* detection in wastewater samples. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

PRESTON D.R., CHAUDRY G.R. and FARRAH S.R. (1990). Detection and identification of *Poliovirus* in environmental samples using nucleic acid hybridization. Can. J. Microbiol., **36**, 664-669.

PRESTON D.R., VASUDEVAN T.U., BITTON G., FARRAH S.R. and MOREL J.L. (1988). Novel approach for modifying microporous filters for virus concentration from water. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 1325-1329.

PREVOT J., DUBROU S. and MARECHAL J. (1993). Detection of human hepatitis A virus in environmental water by an antigen-capture polymerase chain reaction method. Wat. Sci. Tech., **27**, 227-234.

PUIG M., JOFRE J., LUCENA F., ALLARD A., WADELL G. and GIRONES R. (1994). Detection of *Adénoviruses* and *Entéroviruses* in polluted waters by nested PCR amplification. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2963-2970.

RAMIA S. and SATTAR S.A. (1979). Water second step concentration of viruses in drinking and surface using polyethylene glycol hydroextraction. Can. J. Microbiol., **25**, 587-592.

RAO V.C., SULLIVAN R., READ R.B. and CLARKE N.A. (1968). A simple method for concentrating and detecting viruses in water. J. Am. Water Works Assoc., **60**, 1288-1294.

REGAN P.M. and MARGOLIN A.B. (1997). Development of a nucleic acid capture probe with reverse transcriptase-polymerase chain reaction to detect *Poliovirus* in groundwater. J. Virol. Methods, **64**, 65-72.

REYNOLDS K.A., GERBA C.P. and PEPPER I.L. (1995). Detection of *Entéroviruses* in marine waters by direct RT-PCR and cell culture. Wat. Sci. Tech., **31**, 323-328.

REYNOLDS K.S., GERBA C.P. and PEPPER I.L. (1997). Rapid PCR based monitoring of infectious *Entéroviruses* in drinking water. Wat. Sci. Tech., **35**, 423-427.

RIBAS F., HUGUET J.M. et PERRAMON J. (1986). Contrôle d'*Entérovirus* dans l'approvisionnement de Barcelone par l'eau de surface du fleuve Llobregat. Aqua., **1**, 33-44.

RICHARDSON K.J., MARGOLIN A.B. and GERBA C.P. (1988). A novel method for liberating viral nucleic acid for assay of water samples with cDNA probes. J. Virol. Meth., **22**, 13-21.

ROMALDE J.L., ESTES M.K., SZUCS G., ATMAR R.L., WOODLEY C.M. and METCALF T.G. (1994). In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 6, 1921-1926.

ROSE J.B., SINGH S.N. GERBA C.P. and KELLEY L.M. (1984). Comparison of microporous filters for concentration of viruses from wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 989-992.

SAFFERMAN R.S., ROHR M.E. and GOYKE T. (1988). Assessment of recovery efficiency of beef extract reagents for concentrating viruses from municipal wastewater sludge solids by the organic flocculation procedure. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 309-316.

SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B. and ERLICH H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**, 487-491.

SAIKI R.K., SCHARF S., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A. and ARNHEIM N. (1985). Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, **230**, 1350-1354.

SARRETTE B.A., DANGLLOT C.D. and VILAGINES R. (1977). A new and simple method for recuperation of *Entérovirus* from water. Water Res., **11**, 355-358.

SATTAR S.A. and RAMIA S. (1979). Use of talc-celite layers in the concentration of *Entéroviruses* from large volumes of potable waters. Water Res., **13**, 637-643.

SATTAR S.A. and WESTWOOD J.C.N. (1976). Comparison of four effluents in the recovery of indigenous viruses from raw sewage. Can. J. Microbiol., **22**, 1586-1589.

SCARLATTI G., LEITNER T., HALAPI E., WAHLBERG J., MARCHISIO P., CLERICI-SCHOELLER M.A., WIGZELL H., FENYO E.M., ALBERT J., UHLEN M. and ROSSI P. (1993). Comparison of variable region 3 sequences of human immuno-deficiency virus type 1 from infected children with the RNA and DNA sequences of the virus population of their

- mothers. Proc. Natl. Acad. Sci., **90**, 1721-1725.
- SCHEUERMANN P.R., FARRAH S.R. and BITTON G. (1986). Development of a method for the recovery of *Entéroviruses* from aerobically digested wastewater sludges. Water Res., **1**, 15-19.
- SCHWAB K.J., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1993). Development of PCR methods for enteric virus detection in water. Wat. Sci. Tech., **27**, 211-218.
- SCHWAB K.J., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1996). Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 2086-2094.
- SCHWAB K.J., NEILL H., ESTES M.K. and ATMAR R.L. (1998). Improvements in the RT-PCR detection of enteric viruses in environmental samples. Wat. Sci. Tech., **38**, 83-86.
- SCHWARTZBROD L. et LUCENA-GUTIERREZ F. (1978). Concentration des *Entérovirus* dans les eaux par adsorption sur poudre de verre : proposition d'un appareillage simplifié. Microbia, **4**, 55-58.
- SCHWARTZBROD L. and MATHIEU L. (1986). Virus recovery from wastewater treatments plants sludges. Water Research, **20**, 1011-1013.
- SEIDEL G., OSWALD A., GERBA C.P., YANKO W., JACKSON J. and CASTILLO M. (2000). Application of ICC-PCR for the detection of non-CPE producing *Entéroviruses* at recharge facilities. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.
- SENOUCI S., MAUL A. and SCHWARTZBROD L. (1996). Comparison study on three protocols used to concentrate *Poliovirus* type 1 from drinking water. Zbl. Bakt. Hyg., 307-317.
- SHAN S., DESSLBERGER U. and McKEE T.A. (1997). The development of an antigen capture polymerase chain reaction assay to detect and type human *Entéroviruses* . J. Virol. Methods, **65**, 139-144.
- SHIEH Y.S.C., BARIC R.S. and SOBSEY M.D. (1997). Detection of low levels of enteric viruses in metropolitan and airplane sewage. Appl. Environ. Microbiol., **63** : 4401-4407.
- SHIEH Y.-S.C., WAIT D., SOBSEY M.D. (1995). Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for *Entérovirus* detection by the polymerase chain reaction. J. Virol. Methods, **54**, 51-66.
- SHIELDS P.A. and FARRAH S.R. (1983). Influence of salts on electrostatic interactions between *Poliovirus* and membrane filters. Appl. Environ. Microbiol., **51**, 526-531.
- SHIELDS P.A. and FARRAH S.R. (1986). Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. Appl. Environ. Microbiol., **51**, 211-213.
- SHIELDS P.A., LING T.F., TJATHA V., SHAW D.O. and FARRAH S.R. (1986). Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating

bacteriophages in water. Water Res., **20**, 145-151.

SHIMOHARA E., NASHIOA M. and KANEKO M. (1986). Studies of procedures for recovery of viruses from activated sludges. Wat. Sci. Tech., **18**, 149-156.

SOARES A.C., STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994). Effect of anaerobic digestion on the occurrence of *Entéroviruses* and *Giardia* cysts in sewage sludge. Environ. Science Health Part A, **29**, 1887-1897.

SOBSEY S. and ALOUINI M.D. (1995). Evaluation of an extraction-precipitation method for recovering hepatitis A virus and *Poliovirus* from hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*). Wat. Sci. Techn., **5-6**, 465-469.

SOBSEY M.D., CARRICK R.J. and JENSEN H.R. (1978). Improved methods for detecting enteric viruses in oysters. Appl. Environ. Microbiol., **36**, 121-128.

SOBSEY M.D. and GLASS J.S. (1980). *Poliovirus* concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. Appl. Environ. Microbiol., **40**, 201-210.

SOBSEY M.D. and JONES B.L. (1979). Concentration of *Poliovirus* from tap water using positively charged microporous filters. Appl. Environ. Microbiol., **37**, 588-595.

SOBSEY M.D., OGLESBEE S.E. and WAIT D.A. (1985). Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 1457-1463.

SOBSEY M.D., SCHWAB K.J. and HANDZEL T.R. (1990). A simple membrane filter method to concentrate and enumerate male specific RNA coliphage. J. Am. Water Works Assoc., **82**, 52-59.

SOBSEY M.D., WALLIS C., HENDERSON M. and MELNICK J.L. (1973). Concentration of *Entéroviruses* from large volumes of water. Appl. Microbiol., **26**, 529-534.

SOULE H., GENOULAZ O., GRATACAP-CAVALLIER B., CHEVALLIER P., LIU J.X. and SEIGNEURIN J.M. (2000). Ultrafiltration and reverse transcription-polymerase chain reaction : an efficient process for *Poliovirus*, *Rotavirus* and hepatitis A virus detection in water. Water Res., 34, **1063-1067**.

STEINMAN J. (1981). Detection of *Rotavirus* in sewage. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 1043-1045.

STETLER R.E., MORRIS M.E. and SAFFERMAN R.S. (1992). Processing procedures for recovering enteric viruses from wastewater sludge. J. Virol., Methods, **40**, 67-75.

STETLER R.E., WALTRIP S.C. and HURST C.J. (1992). Virus removal and recovery in the drinking water treatment strain. Wat. Res., **26**, 727-731.

STEVENSON R.E., CHANG S.L., CLARKE N.A. and KABLER P.W. (1956). Concentration of dilute virus suspensions by alun flocculation. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **92**, 764-767.

STRAUB T.M., PEPPER I.L., ABBASZADEGAN M. and GERBA C.P. (1994). A method to detect *Entéroviruses* in sewage sludge-amended soils. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 1014-1017.

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994). Detection of naturally occurring *Entéroviruses* and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using PCR. Can. J. Microbiol., **40**, 884-888.

SWEET B.H. and ELLENDER R.D. (1972). Electro-osmosis : a new technique for concentrating viruses from water. Water Res., **6**, 775-779.

SWEET B.H., Mc HALE J.S., HARDY K.J., MORTON F., SMITH J.K. and KLEIN E. (1971). Concentration of virus from water by osmotic ultrafiltration. I. Biological aspect. Waters Res., **5**, 823-829.

TIERNEY J.T., FASSOLITIS A., VAN DONSEL D., RAO V.C., SULLIVAN R. and LARKIN E.P. (1980). Glass wool hydroextraction method for recovery of human *Entéroviruses* from shellfish. J. Food Protect., **43**, 102-104.

TORANZOS G.A., ALVAREZ A.J. and DVORSKY E.A. (1993). Application of the polymerase chain reaction technique to the detection of pathogens in water. Water Sc. Tech., **27**, 207-210.

TORANZOS G.A. and GERBA C.P. (1989). An improved method for the concentration of *Rotaviruses* from large volumes of water. J. Virol. Methods, **24**, 131-140.

TRAORE O., ARNAL C., MIGNOTTE B., MAUL A., LAVERAN H., BILLAUDEL S., and SCHWARTZBROD L. (1998). Reverse transcriptase PCR detection of *Astrovirus*, Hepatitis A virus and *Poliovirus* in experimentally contaminated mussels : Comparison of several extraction and concentration methods. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 3118-3122.

TRUDEL M. and PAYMENT P. (1993). Ultracentrifugation, pp. 67-81. In Payment and Trudel, Methods and Techniques in Virology, Marcel Dekker (New York).

TSAI Y.L., TRAN B., SANGERMANO L.R. and PALMER C.J. (1994). Detection of *Poliovirus*, hepatitis A virus, and *Rotavirus* from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2400-2407.

VAN DER VEEN A. (1995). Research on methods for the enumeration of enteric viruses and related indicators in shellfish. Thèse médecine. Pretoria, 269 p.

VANDEBOSSCHE G. (1994). Use of ionic detergents for *Entérovirus* recovery from wastewater. Microbiological Research, **149**, 231-240.

VILAGINES P., SARRETTE B., DANGLLOT C. et VILAGINES R. (1979). Détection d'*Entérovirus* par concentration sur poudre de verre en lit fluidisé à partir d'échantillons de 500 l d'eaux superficielles. Bull. Acad. Nat. Med., **163**, 668-673.

VILAGINES P., SARRETTE B., HUSSON G. and VILAGINES R. (1992). Définition des conditions optimales d'adsorption du *Poliovirus* type 1 sur la laine sodo-calcique : Application à des eaux de distribution et des eaux résiduaires. J. Fr. Hydrol., **23**, 101-117.

VILAGINES P., SARRETTE B. and VILAGINES R. (1982). Preformed magnesium hydroxide precipitate for second-step concentration of *Entéroviruses* from drinking and surface waters. Can. J. Microbiol., **28**, 783-787.

VILAGINES P., SARRETTE B. et VILAGINES R. (1988). Détection en continu du *Poliovirus* dans des eaux de distribution publique. C.R. Acad. Sci., **307**, 171-176.

WALLIS C., HENDERSON M. and MELNICK J.L. (1972). *Entérovirus* concentration on cellulose membrane. Appl. Microbiol., **23**, 476-480.

WALLIS C. and MELNICK J.L. (1967a). Concentration of *Entéroviruses* on membrane filters. J. Virol., **1**, 472-477.

WALLIS C. and MELNICK J.L. (1967b). Concentration of viruses on aluminium and calcium salts. Am. J. Epidem., **85**, 459-468.

WALLIS C., MELNICK J.L. and GERBA C.P. (1979). Concentration of viruses from water by membrane chromatography. Rev. Microbiol., **33**, 413-437.

WELLINGS F.M., LEWIS A.L. and MOUNTAIN C.W. (1976). Demonstration of solids associated virus in wastewater and sludge. Appl. Environ. Microbiol., **31**, 354-358.

WEST P.A. and WILLIAMS R.F. (1988). Modification of an american public health association (APHA) procedure for virological examination of pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Edit. APHA, Virology methods for oysters, 16 p.

WULLENWEBER M. and AGBALIKA F. (1984). *Entéroviruses* types in samples of activated sludge, Zbl. Bakt. Hyg., **B 178**, 522-526.

YAM W.C., CHAN M.W., IM S.W.K. and NG M.H. (2000). Direct detection of Hepatitis A and E viruses in shellfish and human stools using antigen-capture nested PCR. 1st World Water congress of the International Water Association (IWA) Paris, Juillet 2000.

YATES M.V., CITEK R.W., KAMPER M.F. and SALAZAR A.M. (1999). Detecting *Entéroviruses* in water : comparing infectivity, molecular and combination methods. Intern. Symposium Wat. Path. AWWA, Août 1999.

ANNEXE 1

CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR D'EAUX PAR ADSORPTION- ELUTION SUR POUDRE DE VERRE (PDV)

Principe

La poudre de verre borosilicatée concassée (Sovirel 4585.10), de granulométrie comprise entre 100 µm et 200 µm, est chargée négativement, quel que soit le pH du milieu environnant. Cette poudre de verre représente un excellent adsorbant pour les *Entérovirus* à un pH inférieur à leur pHi (point isoélectrique) (SARRETTE *et al.*, 1977). En effet, les *Entérovirus*, étant chargés positivement à un pH inférieur à leur point isoélectrique, s'adsorbent sur la poudre de verre chargée négativement.

La concentration s'effectue, par filtration ascensionnelle et dynamique au travers d'un lit fluidisé de poudre de verre, de l'échantillon d'eau à analyser, préalablement complémenté avec des cations trivalents qui favorisent l'adsorption virale (WALLIS *et al.*, 1972), puis acidifié à pH 3,5. Les virus adsorbés sur la poudre de verre sont ensuite élués à l'aide d'un tampon alcalin.

Préparation des échantillons d'eaux

Tous les échantillons d'eau à analyser sont additionnés d'une solution de chlorure d'aluminium 0,5 M, en quantité suffisante pour obtenir dans l'échantillon une concentration finale de $5 \cdot 10^{-4}$ M, puis acidifiés à pH 3,5 par addition d'HCl 2N, sous agitation constante.

Matériel de filtration et mode opératoire

Deux appareillages sont proposés.

Appareillage classique (PDVC)

L'appareillage proposé par SCHWARTZBROD et LUCENA-GUTIERREZ (1978), est en verre et comporte deux éléments (Figure 1).

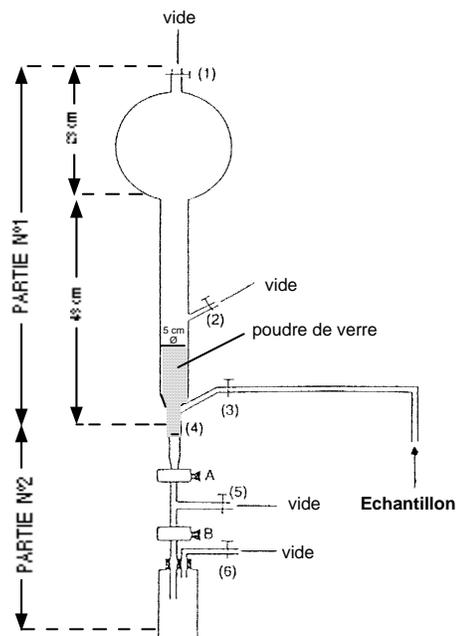


Figure 1

Ensemble de Filtration sur Poudre de Verre

Appareillage Classique (PDVC)

L'élément n°1 est formé par une colonne en verre pyrex (50 mm x 430 mm) prolongée dans sa partie supérieure par une chambre d'expansion sphérique (180 mm de diamètre) munie d'une tubulure d'évacuation (1). La partie basse de la colonne comprend 2 tubulures latérales (2 et 3) et son extrémité inférieure (4) est connectée à l'élément n°2 par l'intermédiaire d'un joint en caoutchouc souple.

L'élément n°2 est composé d'une tubulure en verre pyrex comprenant à sa partie supérieure un rétrécissement destiné à supporter un tampon de coton hydrophile. Cet élément comprend, par ailleurs, 2 robinets A et B et une tubulure latérale (5). Par sa partie inférieure, il est relié à un flacon de 125 mL muni d'un bouchon percé à deux entrées.

150 grammes de poudre de verre pyrex borosilicatée concassée (Réf. : Sovirel 4585.10) sont introduits dans l'élément n°1 par la tubulure (1). Les tubulures (1) (2) (3) et (5) sont équipées de tuyaux en caoutchouc bouchés à leur extrémité par du coton cardé.

L'ensemble de l'appareil est alors stérilisé par autoclavage à + 121°C pendant 30 min.

Le système de filtration est relié d'une part à une source de vide et d'autre part à un réservoir contenant l'échantillon d'eau par l'intermédiaire de la tubulure (3). Le branchement à la source de vide se fait par les tubulures (1) (2) (5) et (6).

Par ouverture du robinet (1) et de la tubulure (3), l'aspiration de l'eau dans la colonne entraîne la poudre de verre qui se met rapidement en suspension pour former un filtre dynamique s'étendant sur toute la hauteur de la colonne et jusqu'au tiers inférieur de la chambre d'expansion. Le débit de filtration est de 60 L⁻¹.

Lorsque tout l'échantillon d'eau à analyser est passé, le robinet de la tubulure (3) est fermé et la tubulure (1) est mise en communication avec l'atmosphère. Le robinet A et les tubulures (4) et (5) sont alors ouverts.

Lorsque la poudre de verre a décanté, l'eau surnageante dans la colonne est éliminée par la tubulure (2) puis aspirée par la tubulure (5) jusqu'à ce que le niveau d'eau arrive à 0,5 cm au dessus de la poudre de verre sédimentée.

Pour procéder à l'élution, il est introduit, par la tubulure (1), 150 mL d'une solution éluante stérile (glycine 50 mM 3 % d'extrait de boeuf) de pH 9,5, colorée au rouge de phénol 0,5%.

Les 30 premiers millilitres d'éluat sont recueillis dans le flacon de récupération connecté à la source de vide par la tubulure (6). Cet éluat est alors immédiatement neutralisé à pH 7,2 sous agitation magnétique, avec du HCl 1N. Il constitue le concentrat viral primaire ou éluat dont le volume est soigneusement noté.

Appareillage modifié (PDVM)

L'appareillage préconisé par SENOUCI *et al.* (1996) est réalisé en polycarbonate et comporte une colonne (40 mm x 500 mm) prolongée par une chambre d'expansion conique (185 mm de diamètre) munie d'une tubulure d'évacuation (1). La partie basse de la colonne comprend 3 tubulures latérales (2) (3) (4) et son extrêmité inférieure est équipée d'une fermeture amovible (5) (Figure 2).

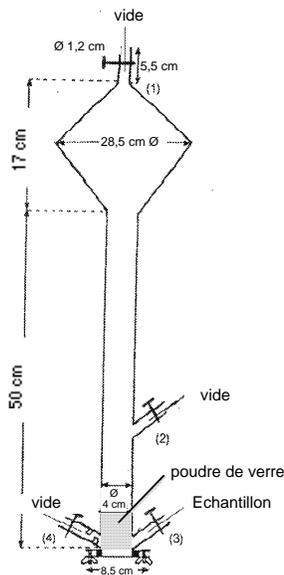


Figure 2 :
Ensemble de Filtration sur Poudre de Verre
Appareillage Modifié (PDVM)

170 grammes de poudre de verre pyrex borosilicatée concassée sont introduits dans l'appareil par la tubulure (1).

Les tubulures (2) (3) et (4) sont équipées de tuyaux en caoutchouc bouchés à leur extrémité par du coton cardé. Par ailleurs, la tubulure (4) comprend un rétrécissement supportant un tampon de coton hydrophile.

L'ensemble de l'appareillage ainsi préparé est alors stérilisé par autoclavage à 121°C, pendant 30 minutes.

Ce système de filtration est relié à l'échantillon par l'intermédiaire de la tubulure (3). Le branchement à la source de vide se fait par les tubulures (1) (2) et (4).

La première phase de la concentration, c'est à dire l'adsorption des virus sur la poudre de verre, est réalisée selon le même protocole que celui décrit pour l'appareillage classique.

A l'issue de cette première phase et lorsque tout l'échantillon d'eau est passé, le robinet de la tubulure (3) est fermé et la tubulure (1) est connectée avec l'atmosphère.

Après décantation de la poudre de verre, l'eau surnageante est éliminée dans sa totalité par les tubulures (2) et (4).

La fermeture amovible (5) est alors enlevée et 150 mL de solution éluante à pH 9,5 (glycine 50 mM 3% d'extrait de boeuf et additionnée de rouge de phénol à 0,5 %) sont ajoutés par la partie supérieure de l'appareillage (1). Ceci provoque la chute de la poudre de verre et du liquide d'éluat dans un becher préalablement placé sous le système de filtration.

Le mélange obtenu est soumis à une agitation magnétique pendant 10 minutes de façon à obtenir l'éluat des virus.

Après une décantation de 2 minutes, le liquide surnageant est recueilli puis il est immédiatement neutralisé à pH 7,2 avec du HCl 1N. Son volume est, par ailleurs, soigneusement déterminé. Il constitue le concentrat viral primaire ou éluat.

ANNEXE 2

CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR D'EAUX PAR ADSORPTION-ELUTION SUR LAINE DE VERRE (LDV)

Principe

Cette méthode d'adsorption-élution est réalisée sur de la laine de verre sodocalcique ensimé et ne nécessite aucun préconditionnement des échantillons d'eau. La concentration s'effectue par filtration de l'échantillon au travers de laine de verre prétraitée. L'adsorption des particules virales se fait par l'intermédiaire des charges électrostatiques et hydrophobes présentes à la fois à la surface des particules virales et sur celle de la laine de verre (VILAGINES *et al.*, 1992). L'élution des virus est ensuite réalisée, à l'aide d'un tampon alcalin (Norme AFNOR XPT90-451, Mars 1996).

Mode de filtration

La laine de verre sodocalcique ensimé (Réf. : Rantigny 725 Saint Gobain) est compactée dans une cartouche cylindrique, en acier inoxydable, comportant un raccordement à ses deux extrémités, selon le protocole décrit par VILAGINES *et al.* (1992).

Le choix et les conditions d'utilisation des cartouches sont fonction du type d'eau et du volume de l'échantillon à analyser (Tableau 1).

Tableau 1 : Choix et conditions d'utilisation des filtres en laine de verre

Echantillon	Cartouche de laine de verre			Stérilisation du filtre par traitement séquentiel				Conditions d'utilisation	
	CARTER	LAINE DE VERRE		1. Traitement acide	2. Rinçage eau distillée	3. Traitement basique	4. Rinçage eau distillée stérile	Débit maximum	Volume analysable
Type d'eau	Diamètre (mm)	masse (g)	Compactage (g / cm ³)	(HCl : 1mol/L) (mL)	(mL)	(NaOH : 1 mol/L) (mL)	(Volume)	(L/h)	(L)
Consommation humaine	42	50	0,5	200	500	200	qsp pH 7	100	100L à 500L
	62	200	0,5	400	1000	400	qsp pH 7	300	100L à 1000 L
Mer et surface	20	5	0,5	20	50	20	qsp pH 7	10	10L à 20 L
	42	50	0,5	200	500	200	qsp pH 7	50	10L à 100L
Résiduaire	20	5	0,4	20	50	20	qsp pH 7	10	5L à 10L
	42	50	0,4	200	500	200	qsp pH 7	50	5L à 20L

Méthodologie

• Préparation de l'échantillon

L'échantillon est recueilli dans un récipient stérile ou désinfecté. Pour les eaux contenant du chlore libre, la neutralisation est obtenue par addition de thiosulfate de sodium (addition jusqu'à une concentration finale de 50 mg/L pour l'eau du robinet ; concentration à adapter en fonction de la concentration de chlore libre pour les autres types d'eau). Le thiosulfate de sodium peut être placé dans le réservoir de récolte de l'échantillon.

• Compactage de la laine de verre

Peser la quantité de laine de verre nécessaire et la répartir en trois fractions égales. Immerger séparément les trois fractions dans de l'eau distillée. Introduire la première fraction dans le carter choisi et la compacter à la masse spécifique désirée. Répéter la même opération pour les deux fractions restantes.

• Stérilisation du filtre constitué de laine de verre

Stériliser le filtre de laine de verre par passage d'une solution d'acide chlorhydrique à 1

mol/l. suivi d'un rinçage réalisé avec de l'eau distillée, puis d'un passage d'une solution¹¹³ de soude à 1 mol/l et ensuite d'eau distillée stérile jusqu'à obtention de la neutralité (Tableau 1).

- Concentration sur laine de verre

Disposer verticalement la cartouche de laine de verre. Filtrer l'échantillon d'eau par pression ou dépression en respectant les conditions de débit stipulées dans le tableau 1.

A la fin de l'étape de concentration, ne pas laisser le filtre de laine de verre à sec. Prendre la précaution de conserver dans la cartouche, une fraction du volume d'eau de l'échantillon analysé supérieur au volume de laine de verre.

- Elution des virus

Les volumes de la solution nécessaires à l'éluion des virus sont respectivement de 30 mL (carter : Ø=20 mm), 300 mL (carter : Ø=42 mm) et 800 mL (carter : Ø=62 mm).

Avant de commencer l'éluion :

- Eliminer le volume d'eau résiduel dans la cartouche.
- Installer un récipient contenant la solution éluante (glycine 0,05 M, 3 % d'extrait de boeuf, rouge de phénol à 0,5 %, pH 9,5) au dessus et à la verticale de la cartouche de laine de verre

- Placer un flacon stérile sous la cartouche de laine de verre pour recueillir le concentrat.

L'éluion doit être réalisée à l'aide de la solution qui doit traverser le filtre de laine de verre en observant deux temps d'arrêt d'une minute en procédant comme suit :

- Faire couler lentement l'éluant, par gravité, pression ou dépression, de façon à recueillir le premier tiers de l'éluat dans le flacon stérile placé en dessous. Arrêter l'injection et observer un temps d'arrêt de une minute. Répéter l'opération pour le deuxième tiers de la solution d'éluion. La dernière fraction est passée rapidement à travers le filtre de laine de verre.

Dès que débute le passage de la solution éluante à travers le filtre de laine de verre, recueillir la totalité du liquide qui s'écoule de la cartouche. L'éluat ainsi obtenu est

neutralisé à $\text{pH}=7,2 \pm 0,1$ avec de l'acide chlorhydrique à 3 mol/L sous agitation et¹¹⁴
constitue le concentrat primaire.

ANNEXE 3

CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR D'EAUX PAR ADSORPTION-ELUTION SUR FILTRES ELECTRONEGATIFS

Préparation de l'échantillon

L'échantillon est recueilli dans un récipient stérile. Pour les eaux contenant du chlore libre, la neutralisation est obtenue par addition de thiosulfate de sodium (addition jusqu'à une concentration finale de 50 mg/L pour l'eau du robinet ; concentration à adapter en fonction de la concentration de chlore libre pour les autres types d'eau). Le thiosulfate de sodium peut être placé dans le réservoir de récolte de l'échantillon. Le pH de l'échantillon est amené à 3,5 avec une solution HCl 1N sous agitation constante et des sels minéraux peuvent être utilisés pour faciliter l'adsorption virale. Généralement, il est ajouté une solution de $AlCl_3$ (concentration finale de 0,0005 M ou de $MgCl_2$ (concentration finale de 0,05 M). La composition des filtres utilisés est variable, par exemple mélange d'esters de cellulose (Millipore - HA) ou d'époxy-fibre de verre (Filterite - Duofine) ou de microfibre de verre borosilicaté - résine - époxy (Balston).

Mode opératoire

- Filtrer l'échantillon à un débit de 30 mL/cm²/min.(pour une membrane de 142 mm de diamètre cela représente un débit d'environ 5 L/min).
- Pour déplacer l'excès de sel des membranes (dans le cas d'addition dans l'eau de $AlCl_3$ ou de $MgCl_2$) les filtres peuvent être lavés avec une solution de NaCl 0,14 M, à raison de 1,5 mL de cette solution par cm² de membrane (ce qui représente environ 250 mL de solution pour une membrane de 142 mm de diamètre).
- Eluer les virus fixés sur les membranes avec une solution à pH alcalin : soit une solution

d'extrait de boeuf à 3 %, pH 9,5 ; soit du tampon glycine-NaOH 0,05 M, pH 9,5 additionné de 116
3 % d'extrait de boeuf ; soit encore du tampon glycine-NaOH 0,05 M, pH 9,5 additionné de
10 % de tryptose phosphate.

La solution éluante doit traverser lentement le filtre à raison de 0,50 mL/cm²/min.(ce qui
représente 80 mL de la solution éluante pour une membrane de 142 mm de diamètre).

Un deuxième passage de l'éluant peut être réalisé, si nécessaire, après avoir vérifié son pH. A
la fin de la deuxième élution, augmenter la pression pour réduire au maximum le volume du
liquide dans les tuyauteries ou dans la cartouche.

Lorsque le volume de l'éluant n'est pas très important (cas des membranes plates et des
cartouches Balston par exemple) le filtre peut être broyé dans le tampon d'élution et le liquide
récupéré par centrifugation (3000 g ; 3 min. ; 4°C).

- Neutraliser immédiatement l'éluat à l'aide d'une solution d'HCl 1N.
- Reconcentrer cet éluat si nécessaire.

ANNEXE 4

CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR D'EAUX PAR ADSORPTION-ELUTION SUR FILTRES ELECTROPOSITIFS

Préparation de l'échantillon

L'échantillon est recueilli dans un récipient stérile. Pour les eaux contenant du chlore libre, la neutralisation est obtenue par addition de thiosulfate de sodium (addition jusqu'à une concentration finale de 50 mg/L pour l'eau du robinet ; concentration à adapter en fonction de la concentration de chlore libre pour les autres types d'eau). Le thiosulfate de sodium peut être placé dans le réservoir de récolte de l'échantillon.

Le pH de l'eau doit être inférieur à 7 de façon à permettre une fixation optimale des virus sur le matériel filtrant.

Les filtres utilisés sont, par exemple, constitués de cellulose à charge modifiée (AMF, CUNO - Zetaplus et Virozorb 1 MDS).

Mode opératoire

Il est identique à celui décrit pour l'adsorption-élution sur filtres électronégatifs mais sans addition de sels minéraux, ni acidification.

ANNEXE 5

CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR PAR ULTRAFILTRATION TANGENTIELLE

Matériel d'ultrafiltration

Il existe plusieurs types de matériel dont le choix dépend du volume à traiter. Le poids moléculaire de rétention des membranes (PMNL) va de 1000 à 1 000 000 de daltons. La composition des membranes est soit cellulosique, soit polysulfonique.

Préparation de l'échantillon

Généralement il n'est pas nécessaire de prétraiter l'eau à analyser. Cependant, l'apport de 1 à 3 % d'extrait de boeuf peut améliorer le rendement et, dans le cas d'utilisation de membranes cellulosiques, évitera une éventuelle adsorption virale sur ces membranes. Ceci est réalisé soit par addition d'extrait de boeuf dans l'eau, soit en prétraitant les membranes avec une solution d'extrait de boeuf.

Mode opératoire

- Monter les membranes selon les instructions du fabricant (le nombre de membranes est déterminé par le volume d'eau à traiter).

- Laver abondamment les membranes à l'eau distillée pour éliminer le liquide de conservation (avec 2 à 10 litres d'eau selon la surface des membranes).

- Réaliser une circulation en cycle fermé de quelques minutes pour prétraiter le système avec l'échantillon (dans le cas où l'extrait de boeuf est additionné dans l'eau).

- Faire circuler l'échantillon

- Arrêter l'appareil lorsque le récipient contenant l'échantillon est presque vide et laisser tomber la pression à zéro.

- Placer le tuyau de retour dans le récipient de recueil du rétentat et remettre en marche la pompe pour récupérer le liquide occupant le volume mort.

- Laver les membranes avec une solution d'extrait de boeuf (0,3-3%), pH 9,5-10,0, d'un volume égal au 3/4 du volume mort, tout en laissant le tuyau de retour en place (solution d'extrait de boeuf déversée dans le liquide du rétentat).

- Contrôler le pH du rétentat et le ramener à la neutralité si nécessaire.

- Le rétentat peut être reconcentré soit par ultrafiltration à l'aide d'un appareil prévu pour traiter les petits volumes (sans ajouter d'extrait de boeuf dans le rétentat obtenu précédemment), soit par une autre méthode de reconcentration.

Régénération des membranes

Elle consiste à enlever les protéines, les microorganismes et les molécules accumulées à la surface des filtres ou des tuyaux de l'appareil. Elle est effectuée à la fin des manipulations et avant la mise en oeuvre de la technique de conservation des membranes. Différentes solutions peuvent être utilisées (fabriquées au laboratoire ou fournies par la fabricant).

- Faire passer dans l'appareil :

- * soit une solution de régénération : 50 g de tétraborate de sodium - 25 g d'acide citrique - 200 mL d'une solution d'hypochlorite de sodium à 15 % - 20 l d'eau distillée.

- * soit de l'eau oxygénée (4 à 10 volumes).

- * soit de l'hypochlorite de sodium (5 à 10 ppm).

- * soit une solution de NaOH 0,1 M. Cette solution peut solubiliser les protéines, les lipides et les polysaccharides ; elle peut être portée à 50°C et sa concentration peut être plus élevée (jusqu'à 1 M). Cette solution est surtout recommandée dans le cas où les membranes ont été prétraitées avec l'extrait de boeuf ou lors d'engorgement par des matières organiques.

* soit une solution de détergents à 0,1 % (Triton X 100, SDS, ...) à condition de réaliser par¹²⁰ la suite un lavage soigneux de l'appareil. Les volumes de solution de régénération à faire passer sont de 1 litre pour les appareils de petit volume et de 4-5 litres pour les appareils de grand volume.

- Laver les membranes avant la conservation ou la réutilisation avec un autre échantillon.

Conservation des membranes

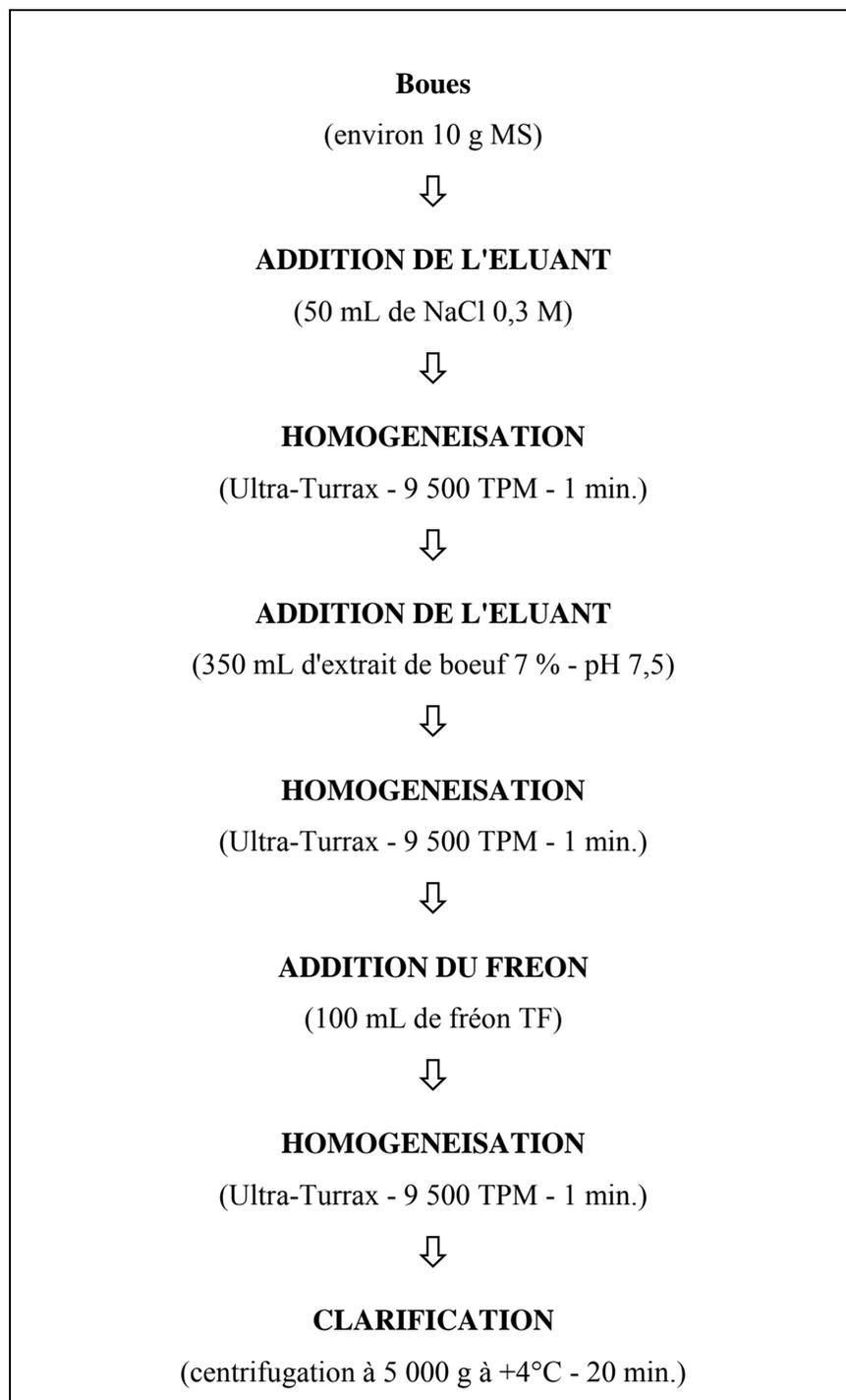
Elles peuvent être conservées dans l'appareil ou remises dans une enveloppe en plastique avec un minimum de liquide. Cette conservation nécessite un traitement à l'aide de solutions recommandées par les fabricants ou réalisées au laboratoire. Cependant, elle doit impérativement se faire après la régénération de la membrane.

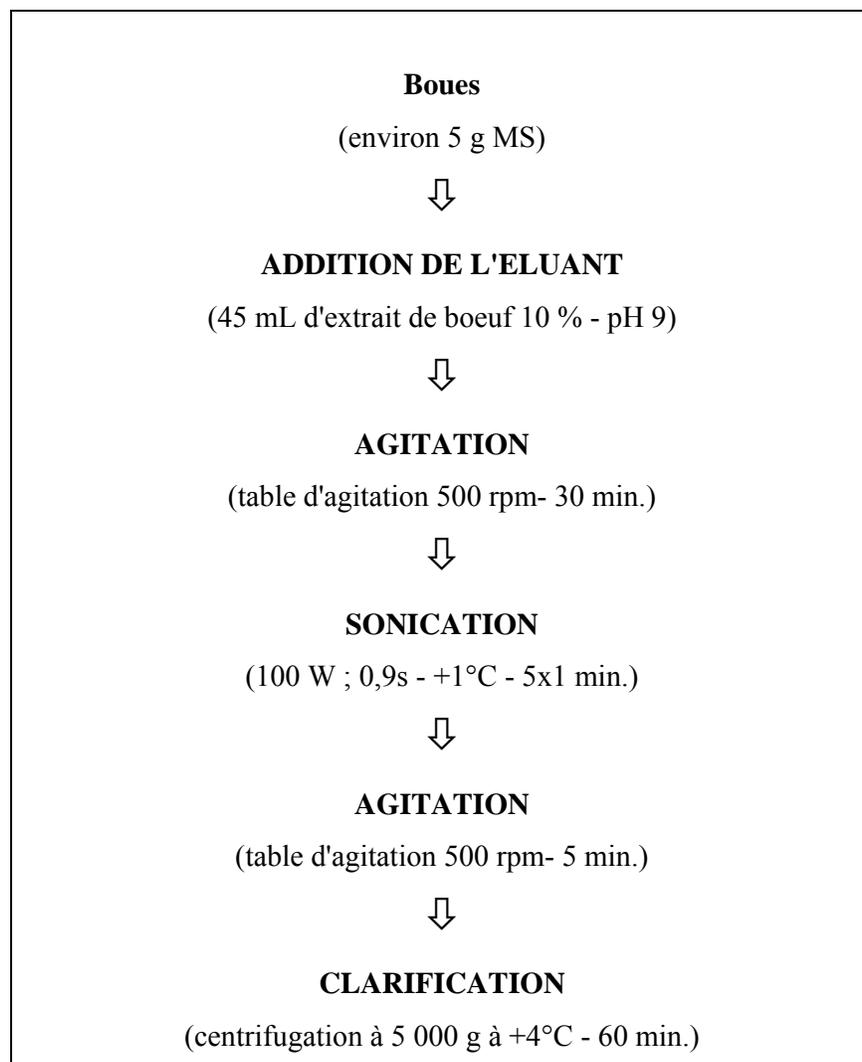
Les membranes peuvent être traitées.

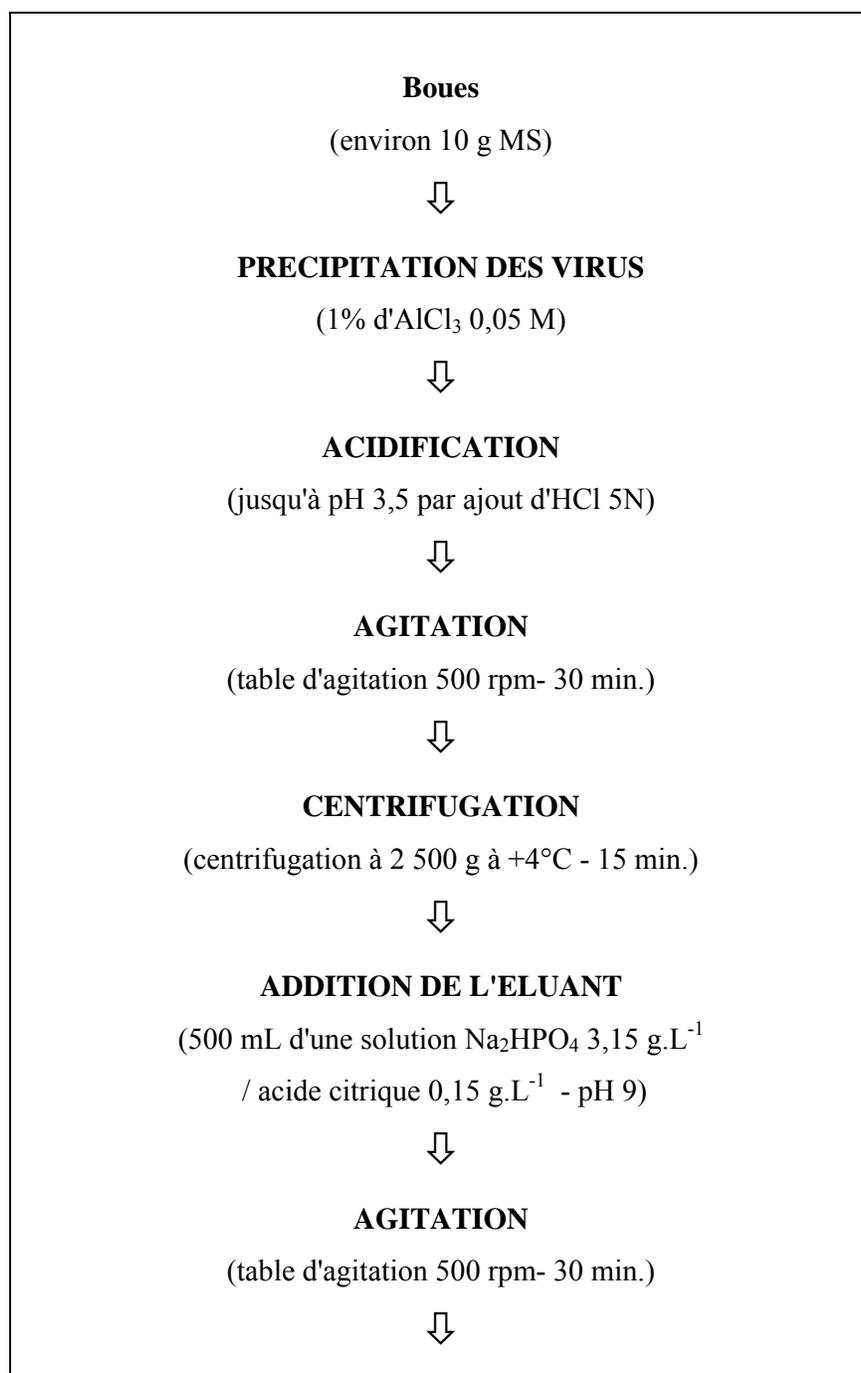
* soit avec de l'eau oxygénée à 7 volumes pendant 15-20 min.

* soit avec une solution de formaldéhyde à 0,1 % pendant quelques minutes (à partir d'une solution commerciale à 37 %).

* soit avec une solution d'azide de sodium à 0,1 %.

ANNEXE 6**Technique 1 : Extraction des virus à partir des boues par une solution NaCl 0,3 M / extrait de boeuf 7 % (d'après Alouini & Sobsey, 1995)**

ANNEXE 7**Technique 2 : Extraction des virus à partir des boues par une solution d'extrait de boeuf 10 %****(d'après Ahmed & Sorensen, 1995)**

ANNEXE 8**Technique 3 : Extraction des virus à partir des boues par une solution Na_2HPO_4 3,15 g.L⁻¹ / acide citrique 0,15 g.L⁻¹****(d'après Soares *et al.*, 1994)**

CLARIFICATION

(centrifugation à 15 300 g à +4°C - 10 min.)

ANNEXE 9**Technique 4 : Extraction des virus à partir des boues par une solution borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 %**

(d'après Albert et Schwartzbrod, 1991)

Boues

(environ 10 g MS)

**CENTRIFUGATION**

(centrifugation à 1 500 g à +4°C - 15 min.)

**ADDITION DE L'ELUANT**

360 mL de tampon borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 % - pH 9)

**HOMOGENEISATION**

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

**AGITATION**

(agitation magnétique - 15 min.)

**SONICATION**

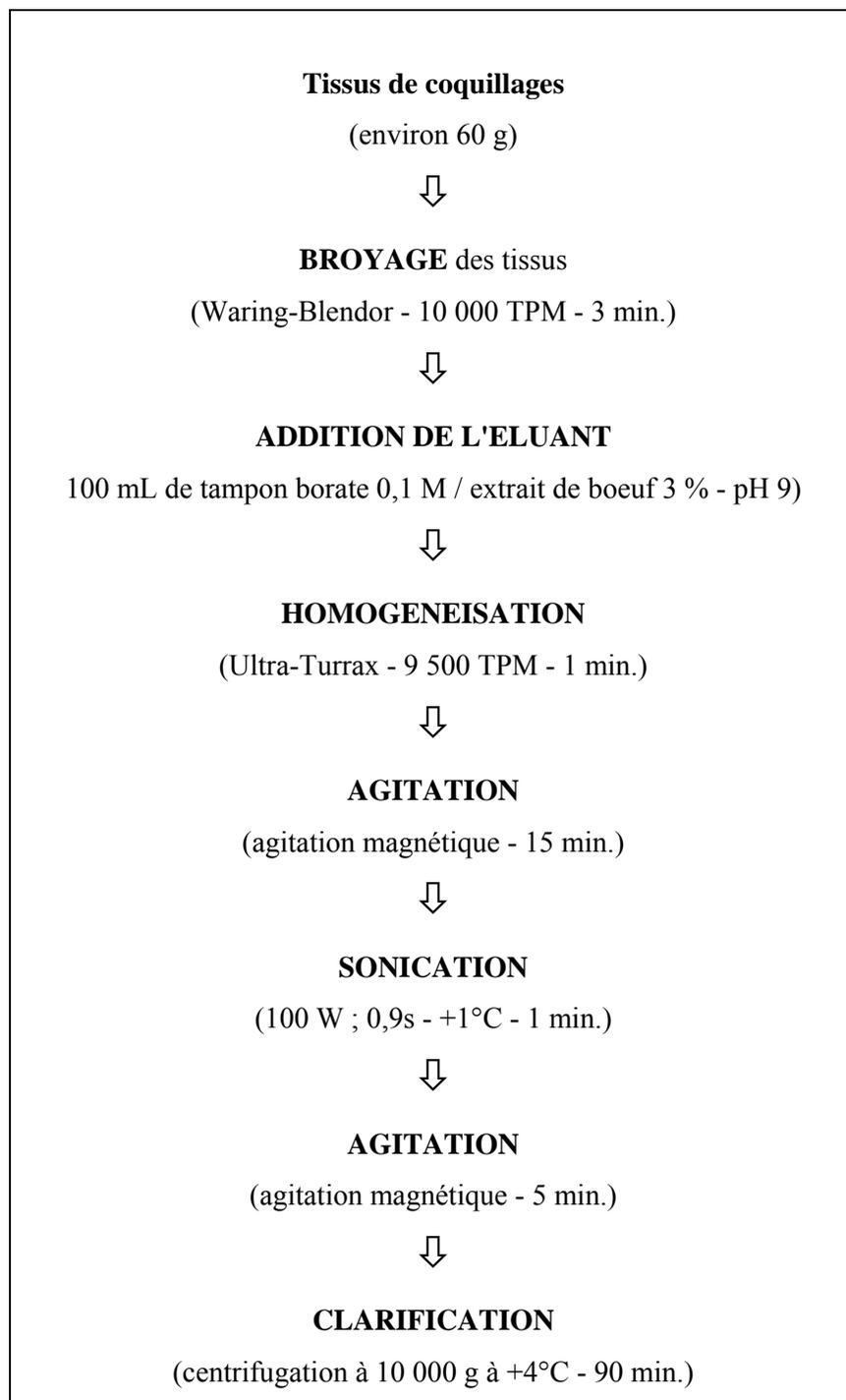
(100 W ; 0,9s - +1°C - 1 min.)

**CLARIFICATION**

(centrifugation à 10 000 g à +4°C - 45 min.)

ANNEXE 10

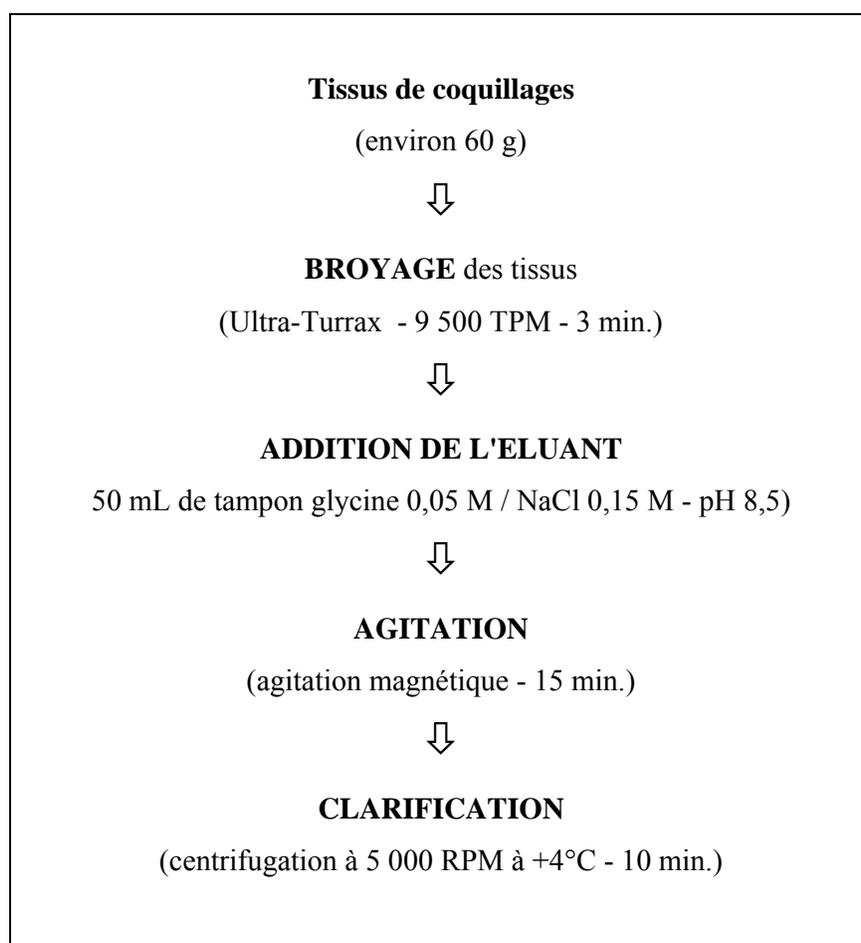
Technique 1 : Extraction des virus à partir des coquillages par une solution borate 0,1 M / extrait de boeuf 3 %
(d'après Boher and Schwartzbrod, 1993)



ANNEXE 11

Technique 2 : Extraction des virus à partir des coquillages par une solution glycine 0,05 M / NaCl 0,15 M

(d'après SOBSEY *et al.*, 1978 ; LEWIS and METCALF, 1988 et VAN DER VEEN, 1995)



ANNEXE 12**Technique 3 : Extraction des virus à partir des coquillages par une solution NaCl / extrait de bœuf****(d'après ALOUINI and SOBSEY, 1995)****Tissus de coquillages**

(environ 60 g)

**BROYAGE** des tissus avec 50 mL de NaCl 0,3 M

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

**ADDITION DE L'ELUANT**

350 mL de NaCl 0,3 M / extrait de boeuf 7 % - pH 7,5)

**HOMOGENEISATION**

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

ANNEXE 13**Extraction-Clarification des virus à partir des coquillages par une solution NaCl / extrait de boeuf / fréon****(d'après ALOUINI and SOBSEY, 1995)****Tissus de coquillages**

(environ 60 g)

**BROYAGE** des tissus avec 50 mL de NaCl 0,3 M

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

**ADDITION DE L'ELUANT**

350 mL de NaCl 0,3 M / extrait de boeuf 7 % - pH 7,5)

**HOMOGENEISATION**

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

**ADDITION DE FREON TF**

100 mL de fréon TF

**HOMOGENEISATION**

(Ultra-Turrax - 9 500 TPM - 1 min.)

**CLARIFICATION**

(centrifugation à 5 000 TPM à +4°C - 20 min.)

ANNEXE 14**Concentration des virus par floculation organique****(d'après KATZENELSON *et al.*, 1976)****ACIDIFICATION de l'extrait**(par ajout de NCl 0,1 M jusqu'à pH 3,5)**AGITATION**

(agitation magnétique - 30 min.)

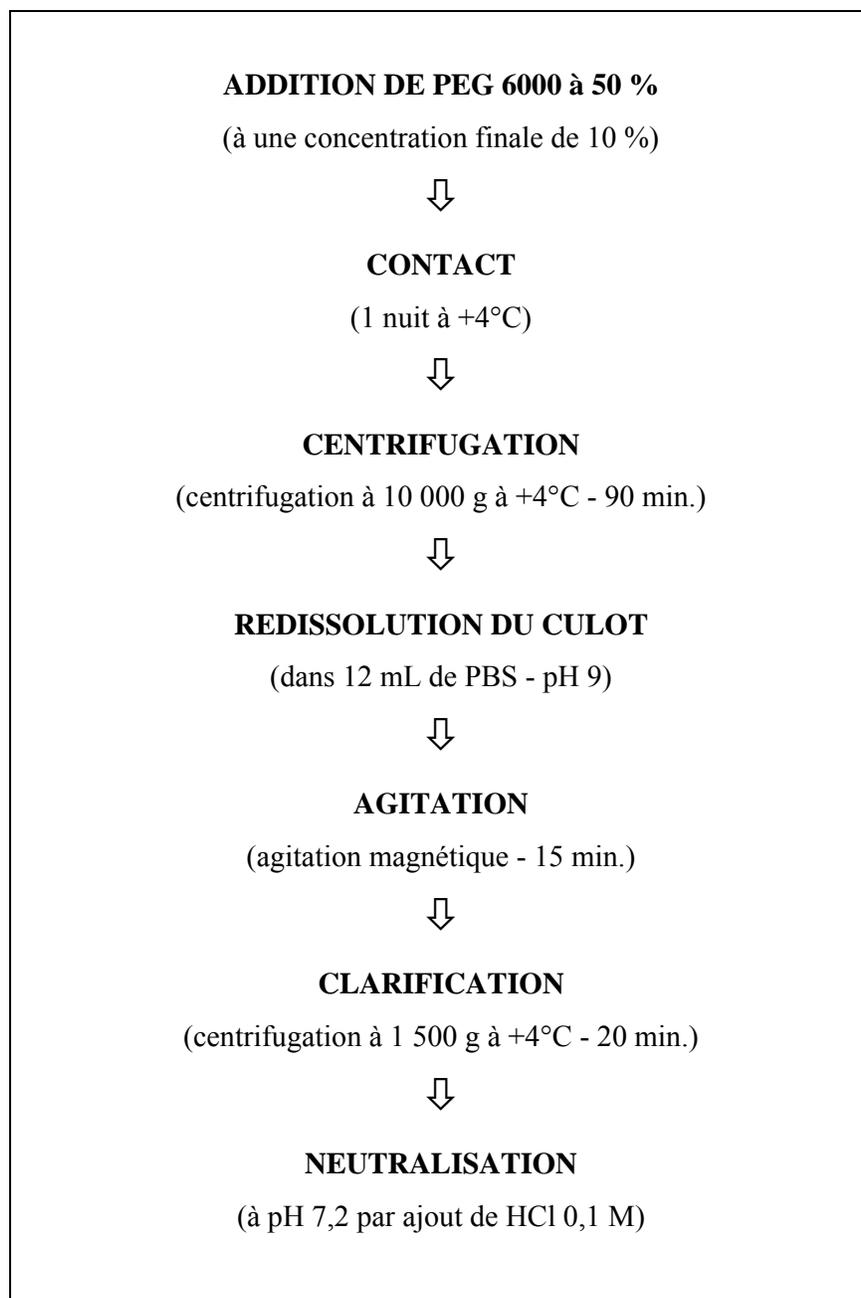
**CENTRIFUGATION**

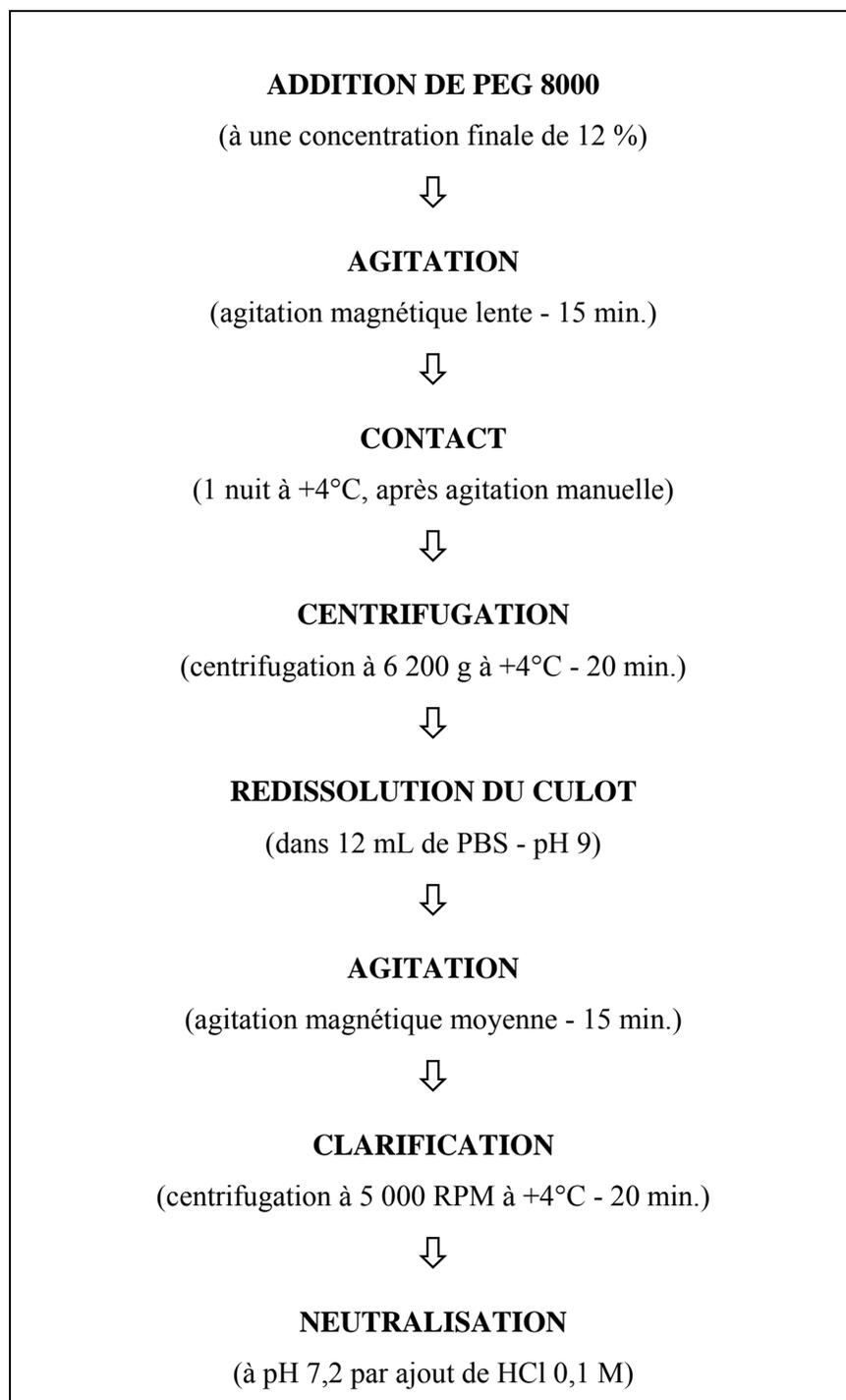
(centrifugation à 3 000 g à +4°C - 15 min.)

**REDISSOLUTION DU CULOT**(dans 12 mL de Na_2HPO_4 0,15 M - pH9)**CLARIFICATION**

(centrifugation à 1500 g à + 4°C - 20 min.)

**NEUTRALISATION**(à pH 7,2 par ajout de HCl 0,1 M)

ANNEXE 15**Concentration des virus par précipitation avec le PEG 6000 (d'après LEWIS and METCALF (1988) et ALBERT *et al.*, 1995)**

ANNEXE 16**Concentration des virus par précipitation avec le PEG 8000 (d'après ALOUINI and SOBSEY, 1995)**

Chapitre 4

DEVENIR DES VIRUS DANS LES EAUX

Dans les eaux, le devenir des virus dépend d'un certain nombre de paramètres qu'il est difficile d'isoler car ils interfèrent entre eux. La situation dans l'eau est particulièrement complexe car les virus entériques y sont rarement à l'état libre et isolés mais se présentent la plupart du temps sous forme agrégée ou associée soit à la matière organique soit à des particules en suspension.

De ce fait dans les eaux ces virus sont plus ou moins protégés de l'action des facteurs inactivants présents dans le milieu naturel (température, pH, facteurs biologiques). De plus, lors des traitements d'épuration des eaux leur comportement est extrêmement différent de celui de virus isolés notamment en ce qui concerne la sensibilité aux agents oxydants.

1. Inactivation naturelle

En milieu naturel l'association des virus à de la matière organique ou à des particules en suspension joue un rôle protecteur fondamental. A l'opposé, on considère en général que le paramètre température est certainement le facteur inactivant le plus important dans le milieu hydrique. En fait, il apparaît que l'inactivation naturelle des virus entériques dans les eaux dépend de la température, du type de virus, de la catégorie d'eaux et plus précisément de sa teneur en matières en suspension et en microorganismes, ainsi que d'autres paramètres tels que pH, exposition à la lumière, etc...

Ainsi dans de l'eau tamponnée stérile, la survie du *Poliovirus* de type 1 est de 296 jours pour une température comprise entre +18° C et +23° C alors qu'à +4° C le processus d'inactivation est considérablement plus lent puisque, en partant d'une eau contenant 10⁵ NPPUC

L⁻¹, SCHWARTZBROD *et al.*, (1975) ont calculé qu'il faudrait entre 10 et 15 ans pour obtenir la disparition de la totalité des particules infectieuses présentes dans l'eau.

BIZIAGOS *et al.*, (1988) étudiant la survie du *Poliovirus* de type 1 et du virus de l'hépatite A dans de l'eau minérale rapportent que les deux virus persistent très longtemps à +4°C et qu'après un an leur titre a baissé respectivement de 1,16 et 0,68 log. Par contre, à la température du laboratoire, le *Poliovirus* de type 1 n'est plus détecté après 300 jours et le virus de l'hépatite A après 360 jours.

En eau d'adduction BOSCH *et al.*, (1997) montrent que l'inactivation de l'*Astrovirus* type 4 est, après 60 jours de 2 log à 4°C et de 3,6 log à 20°C.

En eau souterraine YAHYA *et al.*, (1993) montrent qu'après 80 jours à 7°C, il n'y a pas d'inactivation significative du phage MS₂. Par contre à 23°C en 10 jours l'abattement est de 5 log.

En eau de rivière SPRINGTHORPE *et al.*, (1993) observent que, dans l'eau de rivière la survie des phages MS₂ est identique à celle du HAV et du *Poliovirus* mais après seulement 24 heures de séjour.

Dans l'eau de mer CHUNG and SOBSEY (1993) constatent que les phages de *Bacteroides fragilis* ont la même survie ou une survie supérieure à celle des virus entériques pathogènes tels que HAV, *Poliovirus* et *Rotavirus*, que la température soit de 5° ou 25°C. Par contre, pour le phage MS₂ il est constaté à 25°C une plus forte inactivation que les virus entériques (Tableau 17).

Tableau 17
Temps en jours pour obtenir une inactivation de 99,99 %
des virus (T_{99,99}) (d'après CHUNG and SOBSEY, 1993)

	MS₂ phage	<i>B. fragilis</i> phage	<i>Poliovirus</i>	HAV	<i>Rotavirus</i>
Eau de mer 25°C	11	47	25	34	22
Eau de mer 5°C	125	5,6.10 ¹⁰	37	84	871

Dans les eaux usées, NASSER *et al.*, (1993) confirment que la survie du HAV et du *Poliovirus* 1 est très dépendante de la température mais ils rapportent que ce ne serait pas la cas pour le phage MS₂ qui présenterait la même durée de survie à 10°C et 30°C.

La lumière solaire a aussi une influence sur la survie des virus par action directe sur la particule virale et d'une manière indirecte par stimulation du développement de la microfaune. L'inactivation virale se produit pour une longueur d'onde inférieure à 370 nm (CUBBAGE *et al.*, 1979). Cette action solaire a été bien montrée par HURST (1988) qui rapporte qu'en l'absence de lumière solaire, le taux d'inactivation varie de 0,71 à 0,80 log par jour alors qu'en présence de lumière solaire ce taux varie de 1,33 log dans une eau très turbide à 2,38 log par jour dans une eau de faible turbidité. Ainsi, il est montré que la lumière solaire a une action inactivante sur les virus mais que celle-ci est diminuée en présence de matières en suspension qui, d'une part protègent les particules virales adsorbées et d'autre part, limitent la diffusion des rayons ultra-violets.

L'infectivité des virus entériques présents dans le milieu hydrique est aussi affectée par des variations de pH. Ainsi, pour des pH alcalins (≥ 11) rencontrés notamment lors de traitements par la chaux les virus sont inactivés (GRABOW *et al.*, 1978). De même, l'ammoniaque qui augmente le pH et possède une action toxique directe par fragmentation des acides nucléiques est

considéré par WARD (1978) comme inactivant les *Entérovirus*. Par contre ces virus résistent en général beaucoup mieux à des pH acides tel que pH 3.

La survie des virus est aussi affectée par la présence dans le milieu hydrique d'ions organiques ou inorganiques. Ainsi, la thermostabilisation des virus nus à ARN en présence de cations divalents a été bien montrée par WALLIS and MELNICK (1962). De plus, les ions di et trivalents protègent indirectement les virus en favorisant l'adsorption virale sur les argiles.

La pollution organique a été considérée comme un facteur favorable à la survie des virus notamment dans les sédiments estuariens (LA BELLE and GERBA, 1980) mais d'autres auteurs (WARD and ASHLEY, 1980) estiment que des détergents ioniques sont susceptibles d'altérer la stabilité des protéines capsidales des virus nus.

De nombreuses études ont été réalisées à propos de l'action de la salinité sur la survie des virus entériques et les résultats sont souvent discordants. Ainsi d'après KATZENELSON (1978) ou BABICH and STOTZKY (1979) la salinité n'a pas d'influence sur l'inactivation des virus entériques. Au contraire, SALO and CLIVER (1976) estiment que l'inactivation virale est toujours plus importante en solution saline que dans l'eau distillée.

DINCHERE and SCHWARTZBROD (1992) montrent que, dans une eau stérile sans matières en suspension, la salinité (14, 24 et 33 g L⁻¹) n'a pas d'influence sur l'inactivation du *Poliovirus 1*.

Par contre RAO et al. (1984) constatent une inactivation totale en 9 jours des *Poliovirus* et *Rotavirus* ensemencés dans de l'eau de mer naturelle. Cette dernière observation est à rapprocher de celle rapportée par CHUNG and SOBSEY (1992) qui, à 25°C et en eau de mer naturelle, ont observé des T99 de 11 à 12 jours pour des *Poliovirus* alors que dans les mêmes conditions mais en eau de mer synthétique stérile, DINCHERE and SCHWARTZBROD (1992) obtiennent un T90 de 18,6 jours. Ceci tendrait à montrer qu'à côté de facteurs physiques et chimiques, des facteurs biologiques jouent un rôle dans l'inactivation des virus entériques en milieu hydrique. L'étude de ces facteurs biologiques est délicate mais leur influence a été mise en évidence par

quelques expérimentations. Ainsi GIRONES *et al.*, (1989) mettent en évidence une activité antivirale d'origine biologique dans l'eau de mer vis-à-vis des *Poliovirus* et des *Rotavirus*.

Diverses algues (*Chlorella*) et bactéries provenant d'eaux usées, de surface ou de mer (*Vibrio*, *Flavobacterium*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*..) ont aussi été soupçonnées d'être à l'origine d'action antivirale. Mais, du fait des conditions expérimentales différentes, il est difficile de comparer les résultats et de déterminer précisément quelles espèces bactériennes provoquent l'inactivation virale en milieu naturel. Cependant, GIRONES *et al.*, (1989) ont isolé des bactéries marines du genre *Moraxella* possédant des propriétés antivirales spécifiques vis-à-vis des *Poliovirus*.

De la même façon WARD *et al.*, (1986) avaient isolé d'eaux de surface 27 souches bactériennes présentant une activité virucide en particulier vis à vis en *Entérovirus*. ENRIQUEZ *et al.*, (1993) ont montré que ces facteurs virucides d'origine biologique sont sensibles à la chaleur. Ils constatent en effet que pour obtenir un abattement de 4 log de *Poliovirus* dans une eau de puits à 37°C, il fallait 13 jours et que si la même eau avait été au préalable autoclavée 19 jours étaient nécessaires pour obtenir le même abattement.

Il a aussi été montré que le génome (ARN) du *Poliovirus* 1 est moins stable dans l'eau que dans la même eau autoclavée à 120°C pendant 20 minutes.

En résumé, les principaux facteurs qui peuvent influencer sur la survie des virus entériques dans les eau sont résumés dans le tableau 18.

Tableau 18
Principaux facteurs influant sur la survie des virus dans les eaux

Facteurs	Commentaires
Température	Facteur le plus important
Lumière solaire	Importance variable selon la turbidité de l'eau et la profondeur
Cations	Certains cations ont des propriétés thermostabilisantes.
	Certains cations favorisent l'adsorption aux matières en suspension.
Facteurs biologiques	Activité virucide potentielle de la microflore de l'eau.

Il est extrêmement difficile de fixer des valeurs réellement représentatives de la durée de survie des virus entériques dans les différentes catégories d'eaux, d'autant plus que les résultats varient beaucoup d'une étude à une autre.

Dans les eaux usées, LEFFLER and KOTT (1975) considèrent que, pour le *Poliovirus*, le T_{99,9} est de 42 jours à 18-25° C et de 231 jours à 4-8° C. De même, KOTT *et al.*, (1978) rapportent un T_{99,9} de 70 jours à 18-23° C pour le *Poliovirus* dans l'effluent d'un bassin d'oxydation. ENRIQUEZ *et al.*, (1995) montrent que, à 15°C dans des effluents primaires, le T₉₉ est de 28 et 40 jours respectivement pour *Poliovirus* 1 et *Adénovirus* 40 alors que dans les effluents secondaires il est respectivement de 19 et 43 jours.

Dans les eaux de rivière, FEACHEM *et al.*, (1983) rapportent, pour une température de 23 à 27° C, un T₉₀ de 25 heures pour le *Poliovirus* 1 et de 7 heures pour le *Coxsackievirus* A₁₃. Mais HURST and GERBA (1980) observent en eau de rivière à 20° C un T_{99,9} de 3 à 14 jours pour des virus entériques (*Poliovirus* 1, *Echovirus* 7, *Coxsackievirus* B₃ et *Rotavirus* SA11).

HURST *et al.*, (1989) montrent d'ailleurs que l'inactivation naturelle des virus entériques en eau de rivière est aussi très dépendante de la température. Ainsi, à 22°C, les T90 des *Coxsackievirus* B3 et du *Poliovirus* 1 sont respectivement de 4,1 et 4,5 jours alors qu'à 1°C les T90 sont, pour ces 2 virus, respectivement de 21 et 20 jours.

En eau de mer, VAUGHN and METCALF (1975) observent pour les *Coxsackievirus* B3 un T99 de 12 jours à 18-21° C et de 28 jours à des températures comprises entre 4°C et 15°C. CHUNG and SOBSEY (1992) rapportent des T99 à 25°C de 11 à 12 jours pour le *Poliovirus* 1 et de 19 à 20 jours pour le virus de l'hépatite A, tandis que ENRIQUEZ *et al.*, (1995) observent des T99 à 15°C de 18 et 77 jours respectivement pour *Poliovirus* 1 et *Adénovirus* 40 (Tableau n°19). Mais CALLAHAN *et al.*, (1995) rapportent dans des eaux de mer artificiellement contaminées et à la température de 20°C des T99 respectivement de 3,1 et 6 jours le *Poliovirus* 1 et le virus de l'hépatite A.

Tableau 19
Survie des virus entériques (T99 en jours)
(d'après ENRIQUEZ *et al.*, 1995)

	<i>Poliovirus</i> 1	HAV	<i>Adénovirus</i> 40	<i>Adénovirus</i> 41
Eau d'adduction				
+ 4°C	41	56	92	304
+ 15°C	24	-	87	124
+ 23°C	11	27	60	84
Eau de mer				
+ 15°C	18	-	77	85
Eaux usées				
• <u>Effluents primaires</u>				
+ 4°C	36	-	44	48
+ 15°C	28	-	40	43
• <u>Effluents secondaires</u>	49	-	58	47
+ 4°C	19	-	43	45
+ 15°C				

En eau d'alimentation stérile, QUIGNON *et al.* (1992) mettent en évidence pour le *Poliovirus 1*, un T99 de 61 jours à 25° C et de 506 jours à 4° C. ENRIQUEZ *et al.*, (1995), déterminant des T99 en eau d'adduction naturelle, obtiennent respectivement 24 et 11 jours à 15° et 23° pour *Poliovirus* et 87 et 60 jours pour *Adénovirus 40* (Tableau 12). Ces résultats confirment l'influence de la température et du type de virus sur la durée de survie. De même, en eau d'adduction déchlorée, ABAD *et al.*, (1997) observent que la durée de survie des *Astrovirus* est très dépendante de la température et du temps comme l'indique le tableau 20.

Tableau 20
Inactivation naturelle des Astrovirus en eau d'alimentation

Température	Durée	Abattement en log
4°C	60 jours	2 log
	90 jours	3,3 log
20°C	60 jours	3,2 log
	90 jours	5 log

Enfin, d'après ARAUJO *et al.*, (1997), les phages de *Bacteroides fragilis* seraient les plus résistants à l'inactivation naturelle dans les eaux par rapport, respectivement, aux phages F-spécifiques et aux coliphages somatiques.

Tous ces résultats et toutes ces valeurs concernant la survie ou l'inactivation des virus dans les eaux reposent sur la détermination du maintien ou d'une perte d'infectiosité des virus déterminée sur cultures cellulaires.

Cependant un certain nombre de virus entériques ne se multiplient pas (*Caliciviridae*) ou mal (HAV, *Rotavirus* humains) sur ces cultures cellulaires et leur détection est de plus en plus souvent réalisée par des techniques de biologie moléculaire notamment la RT-PCR. Dans ce cas il ne s'agit plus d'infectiosité, mais de présence ou de disparition du génome viral. Or, STRAUB *et al.*, (1995) constatent que, pour la détection des *Entérovirus*, les résultats obtenus sur cultures cellulaires et RT-PCR sont discordants, la perte d'infectiosité étant la plus rapide.

De même, les travaux de SOBSEY *et al.*, (1998) montrent que, aussi bien en eau souterraine qu'en eaux usées, la perte d'infectivité du virus est beaucoup plus rapide que la disparition du génome viral. Ainsi, dans des eaux contaminées par 10^6 UFP par mL avec du *Poliovirus 1* la perte d'infectivité en eau souterraine est de 1,2 log et de 2,4 log après respectivement 30 et 60 jours alors que la perte de génome (RT-PCR) est nulle après 30 jours et de 1 log après 60 jours (Tableau 21).

Tableau 21
Inactivation naturelle du *Poliovirus* et du Coliphage MS₂
(d'après SOBSEY *et al.*, 1998)

Temps (jours)	Log ₁₀ Réduction virale en eau souterraine				Log ₁₀ Réduction virale en eaux usées			
	<i>Poliovirus 1</i>		Phage MS ₂		<i>Poliovirus 1</i>		Phage MS ₂	
	Infectivité	RT-PCR	Infectivité	RT-PCR	Infectivité	RT-PCR	Infectivité	RT-PCR
4	0,6	0	0,5	0	0,5	0	1,2	0
10	1,4	0	1,5	1,0	0,6	0	1,8	1,0
30	1,2	0	3,5	1,0	0,9	0	2,1	2,0
60	2,4	1,0	4,3	2,0	2,4	1,0	>4,5	2,0

En ce qui concerne les coliphages MS₂ la perte d'infectivité est importante puisqu'elle atteint 3,5 log après 30 jours et 4,3 log après 60 jours. La disparition du génome est beaucoup plus lente (1 log et 2 log respectivement après 30 et 60 jours).

Il faut par ailleurs noter que ces résultats sont peu différents que le milieu hydrique soit constitué d'eau souterraine ou d'eaux usées (Tableau 21).

2. - Devenir des virus au cours des traitements d'épuration des eaux usées

Plusieurs types de traitement peuvent être appliqués aux eaux usées en vue de leur épuration. Dans certains cas (ex : sédimentation primaire) il s'agit d'un simple transfert de pollution, dans d'autres cas il y a inactivation virale (ex : désinfection par des oxydants).

2.1. - Epuration

La première étape de l'épuration des eaux usées est souvent constituée par une décantation primaire. Dans ce cas beaucoup de particules virales sont éliminées des eaux et transférées dans les boues. Les pourcentages d'élimination se situent entre 24 et 83 % pour RAO *et al.*, (1981), 75 % pour PAYMENT *et al.*, (1986). et entre 21 et 87 % pour AULICINO *et al.*, (1995). Compte tenu des concentrations élevées de virus dans les eaux usées brutes, des quantités importantes de virus demeurent présentes dans les effluents à l'issue de cette décantation.

La deuxième étape consiste le plus souvent en un traitement biologique par boues activées qui permet d'éliminer des quantités importantes de virus allant de 90 à 99 % pour WEKERLE (1986) et de 83 à 99,7 % avec une moyenne de 92,1 % pour AULICINO *et al.*, (1995). Au cours de cette opération les virus sont d'une part adsorbés par des particules de floc d'autre part, éliminés par l'action de la microflore des boues (HURST, 1989).

A l'issue d'un traitement faisant intervenir une décantation primaire, l'action des boues activées et une décantation secondaire, SCHWARTZBROD *et al.*, (1985) estiment, après étude pendant un an d'une station d'épuration traitant les eaux de 300 000 équivalents habitants, que, en moyenne, 69 % des virus entériques sont éliminés.

Certains systèmes sont conçus pour traiter les eaux usées de petites communautés et donnent de bons résultats en ce qui concerne l'élimination virale. Ainsi, NARANJO *et al.*, (1993) étudient une unité comprenant un traitement biologique (anoxique et aérobie) suivi par une ultrafiltration, passage à travers du charbon actif et désinfection par rayonnement ultra-violet. Ils constatent que, après l'ultrafiltration ils ne retrouvent ni *Rotavirus* SA 11, ni *Poliovirus* 1

(réduction > à 99,9998 %) mais que l'abattement en phages MS₂ est seulement de 99,93 %. Par contre, après l'étape de désinfection, l'abattement pour les phages MS₂ est > à 99,999 %.

L'efficacité du traitement par lagunage est extrêmement variable (de 0 à 99,9 %) et dépend considérablement du temps de séjour et de la température (HURST, 1989).

A titre indicatif, il est donné dans le tableau 22 le pourcentage d'élimination virale obtenu selon quelques procédés classiques d'épuration des eaux usées.

Tableau 22
Pourcentage d'élimination virale au cours de traitements d'épuration d'eaux usées (d'après WEKERLE, 1986)

TRAITEMENT	POURCENTAGE D'ELIMINATION DES VIRUS ENTERIQUES (%)
Sédimentation primaire	0 - 83
Lits bactériens	90 - 95
Boues activées	90 - 99
Bassins d'oxydation	90 - 99
Bassins de stabilisation	99,99
Fosse septique	50

Le traitement des eaux usées par des procédés physico-chimiques, consistant à ajouter aux eaux déjà épurées des réactifs tels que du sulfate d'alumine, permet de retenir des proportions très importantes de virus (85 à 95 % des *Poliovirus* 1). La floculation par de la chaux provoque non seulement la formation d'un floccule mais surtout une forte élévation du pH qui, par elle-même, provoque une inactivation virale. Ainsi, si la quantité de chaux ajoutée augmente le pH jusqu'à 8,3 ; l'inactivation du *Poliovirus* 1 sera de 43 % alors qu'elle sera de 99,9 % si le pH est augmenté jusqu'à 10,8 (SPROUL, 1976). De même ASANO et SAKAJI (1990) constatent une élimination virale de 5,2 log après coagulation en présence d'alun (150 mg L⁻¹) et de polymère anionique (0,2 mg/L⁻¹), floculation et filtration suivie par une désinfection par le chlore (la dose de chlore

résiduel étant d'environ 10 mg L⁻¹ et le contact étant de 2 heures). L'abattement viral passe de 5,2 à 5,4 log si la désinfection est réalisée par de l'ozone pendant 18 minutes.

Si le traitement est fondé sur une coagulation en présence d'alun (5 mg L⁻¹) et de polymère anionique (0,06 mg L⁻¹) une filtration et une désinfection avec une dose de chlore résiduel de 4 mg l⁻¹ pendant 2 heures, l'élimination virale est de 4,9 log.

Sur un plan global ROSE and GERBA (1991) rapportant les résultats d'études effectuées aux USA dans les états d'Arizona et de Floride montrent que :

- Après traitement des eaux usées par boues activées suivi par une chloration, 31 % des échantillons contenaient encore des *Entérovirus* à un taux moyen de 5 UFP/40 L⁻¹.

- Après traitement des eaux usées par boues activées et filtration sur sable suivi par une chloration ou un traitement par les ultra-violets, 8 % seulement des échantillons étaient positifs en *Entérovirus* avec une moyenne de 0,5 UFP 40 L⁻¹.

- Après traitement par bassin d'oxydation ou lagunage suivi par une chloration, 16 % des échantillons contenaient des *Entérovirus* avec une concentration moyenne de 2 UFP/40 L⁻¹.

Ils mettent aussi en évidence que, dans les eaux épurées issues d'un traitement par boues activées, les *Entérovirus* sont partiellement protégés de l'action du chlore.

Enfin, AULICINO *et al.*, (1995) montrent que la sédimentation primaire provoque un abattement qui varie de 21 % à 87 % alors que, après traitement par boues activées l'abattement varie de 83 % à 99,7 % avec une moyenne de 92,1 %. Ils constatent aussi que les virus sont moins facilement éliminés par ces traitements que les coliformes et streptocoques fécaux et que les *Réovirus* sont moins bien éliminés que les *Entérovirus* quel que soit le stade de traitement.

2.2. - Désinfection

Un certain nombre de paramètres conditionne l'efficacité des désinfectants sur les virus parmi lesquels l'état du virus dans le milieu hydrique, les caractéristiques du milieu, la nature du désinfectant et sa durée d'application (Annexes 17, 18, 19).

} Etat du virus dans le milieu hydrique

Les particules virales qui sont excrétées dans les selles sont souvent agrégées en réseau pseudo-cristallin et associées à des particules de matières fécales (WILLIAMS, 1985). Or, cette disposition en agrégats diminue sensiblement l'efficacité de la désinfection. En effet, les virions placés au centre des agrégats sont protégés de l'action du désinfectant sauf si celui-ci possède un fort pouvoir pénétrant. De même, l'association des virus sur des éléments particuliers organiques augmente la résistance à l'inactivation par le chlore. Ceci a été observé pour les *Poliovirus* dans les matières fécales par HEJKAL *et al.*, (1979) et dans les eaux usées par HARAKEH (1985).

} Caractéristiques du milieu

Les caractéristiques du milieu (pH, température et matières organiques) ont une importance considérable au niveau du processus d'inactivation.

L'inactivation est dépendante du pH, notamment lorsque les désinfectants sont à base de chlore. En ce qui concerne le chlore libre et les chloramines, l'inactivation virale la plus importante est obtenue à bas pH lorsque prédomine la forme HOCl (HOFF, 1986). Pour ce qui est du dioxyde de chlore, l'inactivation est maximale pour des pH élevés (SOBSEY, 1988). Ainsi, BERMAN and HOFF (1984) constatent que l'inactivation du *Rotavirus* SA 11 par 0,5 mg l⁻¹ de dioxyde de chlore est plus rapide à pH 10 qu'à pH 6.

Avec l'ozone il apparaît que l'inactivation du *Poliovirus* 1 est plus rapide à pH 7,2 qu'à pH 4,3 (ROY *et al.*, 1982) mais que pour des pH plus élevés (pH 8 à 10) il est observé une

diminution de l'inactivation du *Poliovirus* de type 1 (HARAKEH and BUTLER, 1985) ou du *Rotavirus* simien SA 11 (VAUGHN *et al.*, 1987).

La cinétique de désinfection est aussi influencée par la température de l'eau dans laquelle se trouvent les virus et HOFF (1986) indique que l'inactivation est plus rapide lorsque les températures sont plus élevées.

La présence de matières organiques dissoutes est susceptible de modifier profondément les conditions de désinfection. En effet, elles réagissent avec les oxydants tels que l'ozone ou le chlore et par voie de conséquence réduisent la quantité de désinfectant libre susceptible d'agir sur les virus. Ainsi HARAKEH and BUTLER, (1985) ont bien montré que l'inactivation par l'ozone du *Poliovirus* de type 1 dans les eaux était réduite par addition de peptone dans l'eau.

Enfin, la présence de matières en suspension (KANEKO, 1989) modifie aussi considérablement les conditions de désinfection, non seulement parce qu'elle augmente la demande en oxydant mais aussi parce que, dans le cas de l'utilisation des rayons UV, leur pénétration est considérablement diminuée.

} Nature du désinfectant

- Chlore libre

☞ En solution tampon sans demande en chlore, VAUGHN *et al.* (1986) obtiennent une réduction de 99,9 % de la charge en *Rotavirus* en 30 secondes avec un résiduel de chlore de 0,1 mg l⁻¹. De même GRABOW *et al.*, (1983) inactivent 99,99 % du virus de l'hépatite A en 150 secondes avec un résiduel de chlore libre compris entre 0,28 et 0,40 mg L⁻¹. PANA *et al.* (1984) inactivent complètement le virus de l'hépatite A en 10 minutes avec 5 ppm de chlore. Enfin, SOBSEY *et al.*, (1988) obtiennent l'inactivation de 99,99 % du virus de l'hépatite A après 6,5 minutes et 0,5 mg L⁻¹ de chlore résiduel. D'après les travaux de KESWICK *et al.*, (1985) le virus de Norwalk serait moins sensible au chlore libre que les autres virus entériques. Par ailleurs,

BERG *et al.*, (1989 et 1990) constatent une potentialisation par KCl de l'efficacité virucide du chlore libre sur le *Poliovirus* de type 1.

En ce qui concerne les *Astrovirus*, ABAD *et al.*, (1997) ont montré que, en eau d'adduction contenant $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore libre, après 1 heure l'abattement était de 2,4 log alors que après 2 heures il était inférieur à 3 log. Dans les mêmes conditions et en présence de 1 mg.L^{-1} de chlore libre les abattements étaient respectivement de 3 et 4,17 log respectivement après 1 et 2 heures de contact.

Enfin, en ce qui concerne l'action du chlore libre sur le génome, il a été montré notamment par MOORE et MARGOLIN (1994) que, en eau Milli Q, le génome du *Poliovirus* était beaucoup plus résistant au chlore que la particule infectieuse. Ainsi, si en présence de 1 mg.L^{-1} de chlore libre l'infectivité est diminuée de 2 log en 2 minutes, il n'y a pas de réduction du génome même après 60 minutes.

☞ En eaux usées brutes (après une sédimentation de 3 heures) MORRIS (1993) rapporte qu'avec un résiduel de $5,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore et un temps de contact de 20 minutes, il observe un pourcentage moyen d'inactivation de 92,95 % pour le *Poliovirus 2* alors que pour les coliformes fécaux et totaux il est $> \text{à } 99,994 \%$.

A partir d'eaux usées stérilisées par irradiation puis contaminées avec les indicateurs bactériens, du *Poliovirus 1* et des bactériophages F+ (MS₂), TREE *et al.*, (1997) montrent que l'inactivation par le chlore libre de *E. coli* et *Enterococcus faecalis* est rapide en comparaison de l'inactivation des phages F+ qui est faible. Le *Poliovirus 1* est plus sensible au chlore libre que les phages F+ mais plus résistant que les deux indicateurs bactériens (Tableau 23).

Tableau 23
Pourcentage de microorganismes survivant à l'action du chlore
(d'après TREE *et al.*, 1997)

Microorganisme	Dose de chlore (mg/L / temps de contact : 30 min.)		
	8	16	30
MS₂	62	36	10
<i>Poliovirus</i>	26	2	0,1
<i>E. coli</i>	>0,01	>0,01	>0,01

Ces résultats en confirment d'autres qui montrent que les indicateurs bactériens ne sont pas valables pour témoigner de l'inactivation des virus entériques au cours de la chloration des eaux usées (HAVELAAR and NIEUWSTAD, 1985 ; RIPPEY and WATKINS, 1992 ; MORRIS, 1993 ; TYRELL *et al.*, 1995). Ils montrent aussi que l'inactivation du *Poliovirus* est dose dépendante et que celle des phages F+ (MS₂) par le chlore est dose dépendante mais seulement pendant les 5 premières minutes de contact.

Il est possible que le phage MS₂ soit moins susceptible aux produits de dégradation du chlore que le *Poliovirus* .

Enfin, l'action du chlore doit être envisagée non seulement sur l'infectivité virale (données classiques), mais aussi sur le génome viral. SOBSEY *et al.*, (1998) montrent que, à la dose de 1 mg/litre de chlore libre et a un pH de 6, la perte d'infectivité est, après 1 minute, de 1,9 log et de 1,4 log respectivement pour le *Poliovirus* 1 et le coliphage MS₂ et supérieure respectivement à 3,8 log et 4,1 log après 3 minutes d'action. Par contre, en ce qui concerne le devenir du génome de ces mêmes virus, et dans les mêmes conditions, il n'y a pas de perte après une minute d'action et celle-ci est respectivement de 1 et 2 log après 3 minutes et de 2 et 3 log après 30 minutes (Tableau 24). Il y a donc une discordance très importante entre réduction d'infectivité et perte du génome. Le génome apparaît dans ce cas comme un mauvais témoin d'efficacité.

Tableau 24

Réduction de l'infectivité et du génome du *Poliovirus* 1 et du coliphage MS₂ par le chlore libre (d'après SOBSEY *et al.*, 1998)

Temps (min.)	pH	Log ₁₀ Réduction du <i>Poliovirus</i>		Log ₁₀ Réduction du Phage MS ₂	
		Infectivité	ST/RT-PCR*	Infectivité	ST/RT-PCR*
1	6	1,9	0	1,4	0
3	6	>3,8	1,0	>4,1	2,0
10	6	>3,8	1,0	>4,1	2,0
30	6	>3,8	2,0	>4,1	3,0

* Short amplicons detected by direct, heat-release RT-PCR

- Chloramines

Les chloramines sont de très médiocres virucides beaucoup moins actives que le chlore libre. Ainsi, SOBSEY (1988) montre que, pour inactiver 99,99 % d'une suspension de virus de l'hépatite A en solution tampon sans demande en chlore, l'action doit être poursuivie pendant 117 minutes en présence d'un résiduel de chloramines de 10 mg l⁻¹.

- Dioxyde de chlore

L'action du dioxyde de chlore sur les virus semble plus ciblée sur les protéines capsidales que sur l'acide nucléique. Ainsi SOBSEY *et al.*, (1998) montrent que, l'action du dioxyde de chlore est beaucoup plus importante au niveau de l'infectivité qu'au niveau du génome. Ainsi pour le *Poliovirus*, en tampon phosphate à 5°C et à pH 6, avec une dose de 1 mg.L⁻¹ de dioxyde de chlore pendant 30 minutes la perte est de 4 log pour l'infectivité alors qu'elle est seulement de 1 log pour le génome. La différence est encore plus nette pour le phage MS₂ pour qui, dans les mêmes conditions, il n'y a pas d'effet sur le génome alors que la perte d'infectivité est de 3,9 log (Tableau 25).

Tableau 25

**Réduction de l'infectivité et du génome du *Poliovirus* 1 et du coliphage MS₂ par le dioxyde de chlore (1 mg.L⁻¹)
(d'après SOBSEY *et al.*, 1998)**

Temps (min.)	pH	Log ₁₀ Réduction du <i>Poliovirus</i>		Log ₁₀ Réduction du Phage MS ₂	
		Infectivité	ST/RT-PCR*	Infectivité	ST/RT-PCR*
1	6	1,0	1,0	1,7	0
10	6	2,0	1,0	2,5	0
30	6	4,0	1,0	3,9	0

* Short amplicons detected by direct, heat-release RT-PCR

Dans des effluents FUJIOKA *et al.*, (1986) inactivent 99,4 % des *Poliovirus* de type 1 avec un résiduel de 1,9 mg L⁻¹ pendant 10 minutes.

Enfin, en ce qui concerne la susceptibilité de différents microorganismes au dioxyde de chlore, BOTZENHART *et al.*, (1993) montrent que la susceptibilité relative au dioxyde de chlore est *B. subtilis* (spores) < *E. coli* < *Legionella pneumophila* < phage Ø X 174 < phage MS₂.

• Ozone

L'ozone est un excellent agent inactivant qui élimine rapidement les virus, mais la présence de particules solides en suspension réduit sensiblement le taux d'inactivation (KANEKO, 1989).

HALL and SOBSEY (1993) travaillant sur HAV et phage MS₂ hautement purifiés, constatent que des doses d'ozone aussi faibles que 0,4 mg.L⁻¹ avec 1 résiduel de 0,1 mg.L⁻¹ inactivent HAV et MS₂ à pH 6-8. Ils observent aussi que, un mélange d'ozone et de peroxyde d'hydrogène (2 mg O₃ et 1 mg H₂O₂ L⁻¹) inactive les 2 virus aussi rapidement à pH 6-8, le résiduel d'ozone étant de 0,1 mg/litre.

Par contre, ils montrent qu'à pH 10 le phage MS₂ est plus résistant que le HAV à l'action du mélange ozone-H₂O₂ (2 mg O₃ et 1 mg H₂O₂ / L⁻¹) et que l'abattement obtenu est nettement plus faible qu'à pH6 (3,6 log versus > 5,4 log). De leur côté LAZAROVA *et al.*, (1998) rapportent

qu'une dose de 5 mg.L⁻¹ d'ozone pendant un temps de contact de 5 minutes provoque un abattement de 5 log du phage MS₂.

En eaux usées, JORET *et al.*, (1982) montrent que, en présence d'ozone, la pente de la courbe d'inactivation des virus entériques est environ la moitié de celle observée pour *E. coli* et les streptocoques fécaux. Ils constatent aussi qu'avec 3 mg L⁻¹ d'ozone, présence d'un résiduel d'ozone et un temps de contact de 19 minutes ils obtiennent l'inactivation de 1 log pour les virus entériques et de 2 log pour les bactéries fécales. Ils confirment qu'il existe une corrélation négative entre inactivation et concentration en matières organiques dans l'eau.

HARAKEH and BUTLER (1985) obtiennent 99,99 % d'élimination des *Rotavirus* humains dans un effluent avec 0,4 mg.L⁻¹ de résiduel d'ozone pendant 15 minutes.

Enfin, BOTZENHART *et al.*, (1993) constatent que la susceptibilité relative à l'ozone est *B. subtilis* (spores) < *Legionella pneumophila* < phage MS₂ < phage Ø X 174 < *E. coli*.

Quant à l'action de l'ozone respectivement sur la particule virale infectieuse et sur le génome (*Poliovirus*) en eau Milli Q, MOORE et MARGOLIN (1994) ont montré que, en 10 minutes il y avait un abattement de 3 log en ce qui concerne l'infectivité alors qu'il n'y avait aucun abattement du génome et que même après 60 minutes le génome était encore détecté. Ceci montre que génome et particule infectieuse réagissent d'une manière totalement différente vis à vis de l'ozone.

- Rayonnement ultra-violet

L'action désinfectante des rayons ultra-violets (U.V.) est indiscutable (SOBSEY, 1988) à 254 nm mais elle est très réduite par la présence dans l'eau de particules en suspension ou de matière organique dissoute. Leur utilisation est donc plus limitée au niveau de la désinfection des eaux usées. Cependant, HAVELAAR *et al.*, (1990 et 1991) ont montré qu'il était possible d'inactiver, par ce procédé, les phages ARN F spécifiques et les *Réovirus* présents dans des effluents.

En eau physiologique, WIEDENMANN *et al.*, (1993) montrent que, pour obtenir une réduction d'infectivité de 4 log, en eau physiologique, il faut une dose d'UV 4 fois supérieure pour les coliphages MS₂ par rapport au HAV.

Travaillant en tampon phosphate sans particule en suspension susceptible d'absorber le rayonnement, BATTIGELLI *et al.*, (1993) obtiennent une inactivation de 4 log (99,99 %) avec des doses de 9, 16, 29, 42 mW-s/cm² respectivement pour le phage Ø X 174, le HAV, le *Coxsackie* B5 et le *Rotavirus* SA11. Le coliphage MS₂ présente la plus grande résistance puisque la perte d'infectivité est inférieure à 1 log avec une dose de 25 mW-s/cm².

En fait on s'aperçoit que la dose classiquement recommandée de 16 mWs/cm² provoque une réduction de 99 % de tous les virus testés sauf du phage MS₂ mais que, pour obtenir une réduction de 99,99 %, des doses très supérieures doivent être employées.

En travaillant à partir d'eaux usées stérilisées par irradiation puis contaminées avec *E. coli*, *Poliovirus* 1 et bactériophages MS₂ (F+), TREE *et al.*, (1997) montrent que la susceptibilité relative au rayonnement ultra-violet en eaux usées est phage MS₂ < *Poliovirus* < *E. coli* (Tableau 26). Ils montrent aussi que l'inactivation du phage MS₂ suit une cinétique de premier ordre dose dépendante.

Tableau 26
Pourcentage de microorganismes survivant à l'irradiation U.V.
(d'après TREE *et al.*, 1997)

Microorganisme	UV dose mWsec/cm ²		
	10	20	30
MS ₂	19	5	1
<i>Poliovirus</i>	2	0,1	> 0,01
<i>E. coli</i>	> 0,01	> 0,01	> 0,01

Ces résultats confirment ceux de HAVELAAR *et al.*, (1987) qui considèrent que les indicateurs bactériens ne témoignent pas de l'inactivation des virus par les U.V. dans les eaux usées.

En fait, l'efficacité de la désinfection par les U.V. dépend bien entendu de la nature de l'eau mais aussi du type de virus. Ainsi, LAZAROVA *et al.*, (1998) rapportent que, une dose de 30 mW-s/cm² est capable de provoquer, en eaux usées épurées, un abattement de 6 log du phage Ø X 174 alors qu'il est nécessaire d'appliquer une dose de 100 mW-s/cm² pour obtenir un abattement de 5 log du phage MS₂. Cette dernière valeur est en accord avec celle rapportée par OPPENHEIMER *et al.*, (1993) qui utilisaient une dose de 75 mW-S/cm² pour obtenir, en eaux usées épurées, un abattement de 4 log du phage MS₂.

Enfin, il est clair que l'action inactivante des U.V. est très variable selon les virus en cause. Ainsi BATTIGELLI *et al.*, (1993) expérimentant en tampon phosphate constatent que, pour obtenir une inactivation de 99,99 % (4 log), les doses d'U.V. nécessaires sont très différentes selon les virus. Exprimée en mWs/cm² cette dose est de 9 pour le phage Ø X 174, de 16 pour le HAV, de 29 pour le *Coxsackievirus* B5 et de 42 pour le *Rotavirus* SA11. Pour une dose de 25 mWs/cm² l'abattement est inférieur à 1 log pour le phage MS₂ et supérieur à 3 log pour HAV, *Coxsackievirus* B5 et *Rotavirus* SA11. Les conclusions de WIEDENMANN *et al.*, (1993) sont peu différentes puisqu'ils montrent que, en eau physiologique, la dose d'U.V. nécessaire pour obtenir une réduction de 4 log est environ trois fois plus forte pour le phage MS₂ que pour le HAV.

En ce qui concerne l'action du rayonnement ultra-violet respectivement sur la particule virale infectieuse et sur le génome viral plusieurs études montrent que, paradoxalement (car l'acide nucléique est la cible naturelle des UV), les UV réduisent beaucoup plus l'infectivité que le génome. Ainsi, LE GUYADER *et al.*, (1997) désinfectant par action des U.V. des eaux usées traitées obtiennent (Tableau 27) une réduction de l'infectivité du *Poliovirus* nettement supérieure à celle du génome.

Tableau 27
Réduction de l'infectivité et du génome du *Poliovirus*
sous l'influence des U.V. (d'après Le Guyader *et al.*, 1997)

U.V.	Réduction en log(10) de <i>Poliovirus</i>	
	Infectivité	Génome (RT-PCR)
50 mW-1/cm ²	> 4 log	0,5 log
120 mW-1/cm ²	> 4 log	1 log
400 mW-1/cm ²	> 4 log	1,5 log

De même SOBSEY *et al.*, (1998) travaillant en eaux usées décantées montrent qu'avec une dose de 30 mW-sec/cm² l'infectivité du *Poliovirus* et du phage MS₂ est diminuée respectivement de 3,6 log et de 1,1 log. Pour une dose de 90 mW-sec/cm² la perte d'infectivité est supérieure à 5,5 log pour le *Poliovirus* 1 et seulement de 3 log pour le phage (Tableau 28). Par contre, en ce qui concerne le génome par contre, les résultats sont identiques pour les 2 virus. Les U.V. ne réduisent pas le génome pour des doses de 30 et 90 mW-s/cm² et pour des doses variant de 150 à 550 la réduction est seulement de 1 log.

Tableau 28
Réduction d'infectivité et du génome du *Poliovirus 1* et du Coliphage MS₂
par les U.V. (d'après SOBSEY *et al.*, 1998)

U.V. dose (mW-sec/cm ²)	Log ₁₀ <i>Poliovirus</i> réduction		Log ₁₀ Phage MS ₂ réduction	
	Infecti- vité	RT-PCR amplification	Infecti- vité	RT-PCR amplification
ST/RT-PCR		ST/RT-PCR		
30	3,6	0	1,1	0
90	> 5,5	0	3,0	0
150	> 5,5	1	4,8	1
350	> 5,5	1	> 6,6	1
550	> 5,5	1	> 6,6	1

En conclusion, il apparaît clairement que l'impact des oxydants sur le matériel viral est extrêmement différent selon qu'il s'agit du génome ou de la particule virale infectieuse. Le génome est beaucoup plus résistant que le virus proprement dit. Dans ces conditions il semble que les techniques de biologie moléculaire décelant le génome (PCR) ne semblent pas adaptées à l'évaluation de l'efficacité des procédés de désinfection des eaux.

Références

ABAD F.X., PINTO R.M., VILLENA C., GAJARDO R. and BOSCH A. (1997). *Astrovirus* survival in drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **63**, 3119-3122.

ARAUJO R., LASOBRAS J., PUIG A., LUCENA F. and JOFRE J. (1997). Abundance of bacteriophages of enteric bacteria in different freshwater environments. Wat. Sci. Tech., **35**, 125-128.

ASANO T. and SAKAJI R.H. (1990). Virus risk analysis in wastewater reclamation and reuse. In "Chemical water and wastewater treatment". HAHN H.H. and KLUTE R. ed. Springer Verlag. Berlin.

AULICINO F.A., MASTRANTONIO A., ORSINI P., BELLUCCI C., MUSCILLO M. and LAROSA G. (1995). Enteric viruses in a wastewater treatment plant in Rome. Water, Air, Soil Pollut., **91**, 327-334.

BABICH H. and STOTZKY G. (1979). Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in seawater and in lake water. Can. J. Microbiol., **25**, 1252-1257.

BATTIGELLI D.A., SOBSEY M.D. and LOBE D.C. (1993). The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by U.V. irradiation. Wat. Sci. Tech., **27**, 339-342.

BERG G., SANJAGHSAZ H. and WANGWONGWATANA S. (1989). Potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine by substances in drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 390-393.

BERG G., SANJAGHSAZ H. and WANGWONGWATANA S. (1990). KCl potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine at pH 9.0. Appl. Environ. Microbiol., **56**, 1571-1575.

BERMAN D. and HOFF J.C. (1984). Inactivation of simian *Rotavirus* SA 11 by chlorine, chlorine dioxide and monochloramine. Appl. Environ. Microbiol., **48**, 317-323.

BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M. and DELOINCE R. (1988). Long-term survival of hepatitis A virus and *Poliovirus* type 1 in mineral water. Appl. Environ. Microbiol., **54**, 2705-2710.

BOSCH A., PINTO R.M., VILLENA C. and ABAD F.X. (1997). Persistence of human *Astrovirus* in fresh and marine water. Wat. Sci. Tech., **35**, 243-247.

BOTZENHART K., TARCSON G.M. and OSTRUSCHKA (1993). Inactivation of bacteria and coliphages by ozone and chlorine dioxide in a continuous flow reactor. Wat. Sci. Tech., **27**, 363-370.

BUYONG N., CLIVER D.O., RONNER A.B. and KOSTENBADER K.D. (1993). Seasonal UV disinfection of treated urban effluent. 2. Virological findings. J. Environ. Sci. Health.

A28, 2299-2314.

CALLAHAN K., TAYLOR D.J. and SOBSEY M.D. (1995). Comparative survival of hepatitis A virus, *Poliovirus* and indicator viruses in geographically diverse seawaters. Wat. Sci. Tech., **31**, 189-193.

CHUNG and SOBSEY M.D. (1993). Comparative survival of indicator viruses and enteric viruses in sea water and sediment. Water Sci. Tech., **27**, 425-429.

CUBBAGE C.P., GANNON J.J., COCHRAN K.W. and WILLIAMS G.W. (1979). Loss of infectivity of *Poliovirus* I in river water under simulated field conditions. Wat. Res., **13**, 1091-1099.

DINCHERE M.L. and SCHWARTZBROD L. (1992). Inactivation of *Poliovirus* 1 in sea water : study of some parameters. Personal communication.

ENRIQUEZ C.E., ABBASZADEGAN M., PEPPER I.L., RICHARDSON K.J. and GERBA C.P. (1993). *Poliovirus* detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. Water Res., **27**, 1113-1118.

ENRIQUEZ C., HURST C.J. and GERBA C.P. (1995). Survival of the enteric *Adenovirus* 40 and 41 in tap sea and wastewater. Water Res., **29**, 2548-2553.

FEACHEM R.G., BRADLEY D.J., GARELICK H. and MARA D. (1983). *Entérovirus, Poliovirus* and similar viral infections. Sanitation and disease. Health aspects of excreta and wastewater management. J. Wiley and Sons ed.

FUJIOKA R.S., DOW M.A. and YONEYAMA B.S. (1986). Comparative disinfection of indicator bacteria and *Poliovirus* by chlorine dioxide. Wat. Sci. Tech., **21**, 215-219.

GERBA C.P., RILEY K. and NWACHUKU N. (2000). Assessment of disinfectant resistance of microorganisms on the US EPA's drinking water contaminant candidate list (CCL). 1st World Water Congress of the International Water Association (IWA). Paris 3-7 Juillet 2000.

GIRONES R., JOFRE J.T. and BOSCH A. (1989). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. Can. J. Microbiol., **35**, 1015-1021.

GRABOW W.O.K., GAUSS-MULLER V., PROZESKY O.W. and DEINHARDT (1983). Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. Appl. Environ. Microbiol., **46**, 619-624.

GRABOW W.O.K., MIDDENDORFF I.G. and BASSON N.C. (1978). Role of lime treatment in the removal of bacteria enteric viruses and coliphages in a wastewater reclamation plant. Appl. Environ. Microbiol., **35**, 663-669.

HALL R.M. and SOBSEY M.D. (1993). Inactivation of Hepatitis A virus and MS₂ by ozone and ozone-hydrogen peroxide in buffered water. Wat. Sci. Tech., **27**, 371-378.

HARAKEH M. (1985). Factors influencing chlorine disinfection of wastewater effluent contaminated by *Rotaviruses*, *Entéroviruses* and bacteriophages. In "Water chlorination chemistry, Environmental Impact and Health effects". JOLLEY R.L., LEWIS Publ. Chelsea.

HARAKEH M. and BUTLER M.J. (1985). Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. Ozone : Sciences and Engineering, **6**, 235-243.

HAVELAAR A.H., MEULEMANS C.C.E., POT-HOGEBOOM W.M. and KOSTER J. (1990). Inactivation of bacteriophage MS2 in wastewater effluent with monochromatic and polychromatic ultraviolet light. Wat. Res., **24**, 1387-1393.

HAVELAAR A.H. and NIEUWSTAD T.J. (1985). Bacteriophages and faecal bacteria as indicators of chlorination efficiency of biologically treated wastewater. J. Wat. Poll. Cont. Fed., **57**, 1084-1088.

HAVELAAR A.H., NIEUWSTAD TH.J., MEULEMANS C.C.E. and VAN OLPHEN M. (1991). F-Specific RNA bacteriophages as model viruses in UV disinfection of wastewater. Wat. Sci. Tech., **24**, 347-353.

HAVELAAR A.H., POT-HOGEBOOM W.M., KOOT W. and POT R. (1987). F-specific bacteriophages as indicators of the disinfection efficiency of secondary effluent with ultraviolet radiation. Ozone Sci. Eng., **9**, 353-368.

HEJKAL T.W., WELLINGS F.M., LAROCK P.A. and LEWIS A.L. (1979). Survival of *Poliovirus* within organic solids during chlorination. Appl. Environ. Microbiol., **38**, 114-118.

HOFF J.C. (1986). Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants EPA/600/2/86/607. US Environmental Protection Agency. Cincinnati. OH.

HURST C.J. (1988). Effect of environmental variables on enteric virus survival in the surface fresh water in "Proceedings international conference on water and wastewater microbiology". Newport Beach.

HURST C.J. (1989). Fate of viruses during wastewater sludge treatment processes. Crit. Rev. Env. Control, **18**, 317-343.

HURST C.J., BENTON W.H. and Mc CLELLAN K.A. (1989). Thermal and water source effects upon the stability of *Entéroviruses* in surface freshwater. Can. J. Microbiol., **35**, 474-480.

HURST C.J. and GERBA C.P. (1980). Stability of simian *Rotavirus* in fresh and estuarine water. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 1-5.

JORET J.C., BLOCK J.C., HARTEMANN P. and RICHARDS Y. (1982). Wastewater disinfection : Elimination of fecal bacteria and enteric viruses by ozone. Ozone Science Engineer, **4**, 91-99.

KANEKO M. (1989). Effects of suspended solids on inactivation of *Poliovirus* and T2-phage

by ozone. Wat. Sci. Tech., **21**, 215-219.

KATZENELSON E. (1978). Survival of viruses in "Indicators of viruses in water and food"., BERG G., ed., Ann. Arbor Science Publ.

KESWICK B.H., SATTERWHITE T.K., JOHNSON P.C., DUPONT H.L., SECOR S.L., BITSURA J.A., GARY G.W. and HOFF J.C. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 261-264.

KOTT Y., BEN-ARI H. and VINOKUR L. (1978). Coliphage survival as viral indicator in various wastewater quality effluents. Prog. Wat. Techn., **10**, 337-346.

LA BELLE R.L. and GERBA C.P. (1980). Influence of estuarine sediment on virus survival under fields conditions. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 749-755.

LAZAROVA V., JANEX M.L., FIKSDAL L., OBERG C., BARCINA I. and POMMEPUY M. (1998). Advanced wastewater disinfection technologies : Short and long term efficiency. Wat. Sci. Tech., **38**, 109-117.

LE GUYADER F., MENARD D., DUBOIS E., HAUGARREAU L., KOPECKA H. and POMMEPUY M. (1997). Use of an RT-PCR internal control to evaluate viral removal. Wat. Sci. Tech., **35**, 461-465.

LEFFLER E. and KOTT Y. (1975). Virus survival in water and wastewater. Israel J. Med. Sci., **11**, 511-512.

MOORE N.J. and MARGOLIN A.B. (1994). Efficacy of nucleic acid probes for detection of *Poliovirus* in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone and UV radiation. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 4189-4191.

MORRIS R. (1993). Reduction of microbial levels in sewage effluents using chlorine and peracetic acid disinfectants. Wat. Sci. Tech., **27**, 387-393.

NARANJO J.E., GERBA C.P., BRADFORD S.M. and IRWIN J. (1993). Virus removal by an one-site wastewater treatment and recycling system. Wat. Sci. Tech., **27**, 441-444.

NASSER A.M., TCHORCH Y. and FATTAL B. (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ Bacteriophages, HAV and *Poliovirus* 1 in wastewater and ground water. Wat. Sci. Tech., **27**, 401-407.

OPPENHEIMER J.A., HOAGLAND J.E., LAINE J.M., JACANGELO J.G. and BHAMRAH A. (1993). Microbial inactivation and characterization of toxicity and β -products occurring in reclaimed wastewater disinfected with U.V. radiation. Proc. WEF Speciality Conf. Series, TT043,13.

PANA A., PATTI A.M., ZARATTI L., GRELLA A. and PAROLI E. (1984). Chlorine action on hepatitis A virus infectivity. L'Igiene Moderna, **81**, 454-458.

PAYMENT P., FORTIN S. and TRUDEL M. (1986). Elimination of human enteric viruses during conventional wastewater treatment by activated sludge. Can. J. Microbiol., **32**, 922-925.

QUIGNON F., THOMAS F., BOTTERO J.Y., DUGUET J.P. et SCHWARTZBROD L. (1992). Inactivation du *Poliovirus* dans l'eau : Influence de certains paramètres. Journées Information Eaux-Poitiers.

RAO V.C., LAKHE S.B., WAGHMARE S.V. and RAMAN V. (1981). Virus removal in primary settling of raw sewage. J. Environ. Eng. Div. Am Soc. Civ. Eng., **107**, 57-59.

RAO V.G., SEIDEL K.M., GOYAL S.M., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1984). Isolation of *Entérovirus* from water, suspended solids and sediments from Galveston bay : survival of *Poliovirus* and *Rotavirus* adsorbed to sediments. Appl. Environ. Microbiol., **48**, 404-409.

RIPPEY S.R. and WATKINS W.D. (1992). Comparative rates of disinfection of microbial indicator organisms in chlorinated sewage effluents. Wat. Sci. Tech., **26**(9-11), 2185-2189.

ROSE J.B. and GERBA C.P. (1991). Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida USA. Wat. Sci. Tech., **23**, 2091-2098.

ROY D., ENGELBRECHT R.S. and CHIAN E.S.K. (1982). Comparative inactivation of six *Entéroviruses* by ozone. J. Am. Water Works Assoc., **74**, 660-664.

SALO R.J. and CLIVER D.O. (1976). Effects of acid pH on the infectivity and physical integrity of *Entéroviruses*. Arch. Virol., **52**, 269-282.

SCHWARTZBROD J., DIXNEUF P., SCHWARTZBROD L., BROCHET J.C. et FOLIGUET J.M. (1975). Etude du comportement du virus poliomyélique de type 1 dans différents milieux hydriques. Rev. Epidem. Méd. Soc. et Santé Publi., **23**, 235-252.

SCHWARTZBROD L., VILAGINES P.H., SCHWARTZBROD J., SARETTE B., VILAGINES R. and COLLOMB J. (1985). Evaluation of the viral population in two wastewater treatment plants ; study of different sampling technics. Wat. Res., **11**, 1353-1356.

SOBSEY M. (1988). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. Wat. Sci. Tech., **3**, 179-196.

SOBSEY M.D., BATTIGELLI D.A., SHIN G.A. and NEWLAND S. (1998). RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. Wat. Sci. Tech., **38**, 91-94.

SOBSEY M., FUJI T. and SHIELDS P.A. (1988). Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochlorine. In "Proceedings of the international conference for water and wastewater microbiology". International Association for water pollution research and control. Pergamon Press. New York.

SPRINGTHORPE W.S., LOH C.L., ROBERTSON W.J. and SATTAR S.A. (1993). In situ

survival of indicator bacteria, MS₂ phage and human pathogenic viruses in river water. Wat. Sci. Tech., **27**, 413-420.

SPROUL O.J. (1976). Removal of viruses by treatment processes. In "Viruses in water". BERG G., BODILY H.L., LENNETTE E.H., MELNICK J.L. and METCALF T.G. eds Am. Publ. Health Assoc. Washington.

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1995). Comparison of PCR and cell culture for detection of *Entéroviruses* in sludge amended field soils and determination of their transport. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 2066-2068.

TREE J.A., ADAMS M.R. and LEES D.N. (1997). Virus inactivation during disinfection of wastewater by chlorination and UV irradiation and the efficacy of F+ bacteriophage as a viral indicator. Wat. Sci. Tech., **35**, 227-232.

TYRRELL S.A., RIPPEY S.R. and WATKINS W.D. (1995). Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents using chlorine and ozone. Wat. Res., **29**, 2483-2490.

VAUGHN J.M., CHEN Y.S. and THOMAS M.Z. (1986). Inactivation of human and simian *Rotaviruses* by chlorine. Appl. Environ. Microbiol., **51**, 391-394.

VAUGHN J.M., CHEN Y.S., LINDBURG K. and MORALES A. (1987). Inactivation of human and simian *Rotaviruses* by ozone. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 2218-2221.

VAUGHN J.M. and METCALF T.G. (1975). Coliphages as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising in estuarine waters. Wat. Res., **9**, 613-616.

WALLIS C. and MELNICK J.L. (1962). Cationic stabilization : a new property of *Entérovirus*. Virology, **16**, 504-506.

WARD R.L. (1978). Mechanism of *Poliovirus* inactivation by ammonia. J. Virol., **26**, 299-305.

WARD R.L. and ASHLEY C.S. (1980). Effects of wastewater sludge and its detergents on the stability of *Rotavirus*. Appl. Environ. Microbiol., **39**, 1154-1158.

WARD R.L., KNOWLTON D.R. and WINSTON P.E. (1986). Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water. Appl. Environ. Microbiol., **52**, 450-459.

WEKERLE J. (1986). Agricultural use of sewage sludge as a vector for transmission of viral disease. In "Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge : Knowledge and needs". BLOCK J.C., HAVELLAAR A.H. and L'HERMITE P. Elsevier Applied Science Publ.

WIEDENMANN A., FISCHER B., STRAUB U., WANG C.H., FLEHMIG B. and SCHOENEN D. (1993). Disinfection of hepatitis A virus and MS₂ coliphage in water by ultraviolet irradiation : comparison of U.V. susceptibility. Wat. Sci. Tech., **27**, 335-338.

WILLIAMS F.A. (1985). Membrane-associated viral complexes observed in stools and cell culture. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 523-526.

YAHYA M.T., GALSOMIES L., GERBA C.P. and BALES R.C. (1993). Survival of bacteriophages MS₂ and PRD₁ in ground water. Wat. Sci. Tech., **27**, 409-412.

ANNEXE 17

Inactivation des virus entériques par le chlore d'après GERBA *et al.*, (2000)

Virus	Type d'eau	Résiduel de chlore libre mg/L	Température (°C)	pH	Durée (min.)	Pourcentage de réduction virale	Ct 99 mg/min/L
<i>Coxsackie B₅</i>	Eau du robinet	11,8	25	8,1	5	99	59
<i>Adénovirus 5</i>		0,2	25	7,5	30	99	6
<i>Coxsackie B₅</i>	Eau sans demande en chlore	0,51	5	6	3,4	99	1,73
		0,48	5	7,81	4,5	99	2,16
		0,50	5	9,93	66	99	33
		0,46-0,49	5	6	0,3	99	0,14
		0,48	5	10	1,5	99	0,72
<i>Echo virus 1</i>		0,48	5	6	0,5	99	0,24
		0,48	5	7,81	1,2	99	0,56
		0,49	5	10	96	99	47
<i>Echo virus 5</i>		0,5	5	6	1,3	99	0,65
		0,5	5	10	27	99	13,5
<i>Echo virus 1</i>	Eau d'estuaire	0,5	2	7,8	26,1	99,99	13,1
<i>Echo virus 7</i>					7,1		3,6
<i>Echo virus 9</i>					12,4		6,2
<i>Echo virus 11</i>					13,4		6,7
<i>Echo virus 12</i>					14,5		7,25
<i>Echo virus 29</i>					20		10

<i>Coxsackie A5</i>	Eau d'estuaire	0,5	2	7,8	6,8	99,99	3,4
<i>Coxsackie A9</i>					8,5		4,3
<i>Coxsackie B1</i>					16,2		8,1
<i>Coxsackie B3</i>					39,5		19,8
<i>Coxsackie B5</i>					4,8		2,4
<i>Adénovirus 3</i>					12,5		6,25
<i>Adénovirus 7</i>					13,5		6,75
<i>Adénovirus 12</i>							
<i>Feline Calicivirus</i>	?	100	?	?	1	94,2	

ANNEXE 18

Inactivation des virus entériques par les dérivés chlorés et l'ozone d'après GERBA *et al.*, (2000)

Oxydant	Virus	Type d'eau	Résiduel de chlore libre mg/L	Température (°C)	pH	Durée (min.)	Pourcentage de réduction virale	Ct 99 mg/min/L
Dioxyde de chlore	<i>Coxsackie B₅</i>	?	13,25	15	7,2	?	99	-
	<i>Echovirus 1</i>		15,25					
	<i>Coxsackie B₃</i>		3	?	7	30	Virus tués	-
	<i>Echovirus 11</i>							
	<i>Adénovirus 7</i>							
Chloramines	<i>Adénovirus 3</i>	Eau SDC*	5	25	6	10	99	50
			10			5		60
			20					
Ozone	<i>Coxsackie A₉</i>	Eau SDO**	0,032	?	?	0,16	99	0,0043
			0,012			0,53	99,2	0,0033
	<i>Coxsackie B₅</i>	?	0,25	20	7,2	5,5	99	0,64
						10		2,6
	<i>Echovirus 1</i>		0,26					

*SDC = Sans Demande en Chlore

**SDO = Sans Demande en Ozone

ANNEXE 19

Inactivation des virus entériques par le rayonnement ultra-violet d'après GERBA *et al.*, (2000)

Virus	Type d'eau	Dose d'UV MW/s/cm²	Pourcentage de réduction virale
<i>Adénovirus 40</i>	Eau stérile	30	90
		124	99,99
<i>Adénovirus 41</i>		111,8	
<i>Coxsackie A9</i>	Eaux usées	1,66	99
<i>Echovirus 1</i>		1,25	
<i>Echovirus 11</i>		1,41	

Chapitre 5

DEVENIR DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES BOUES

Quel que soit le procédé de traitement des eaux usées urbaines, il se traduit par la production de grandes quantités de boues. Ces boues sont susceptibles de subir un certain nombre de traitements et elles peuvent aussi être stockées.

Nous envisageons successivement l'influence du stockage et de différents traitements sur le devenir des virus dans les boues.

1. Stockage des boues et virus entériques

L'épandage des boues sur des terrains agricoles ou forestiers nécessite généralement leur stockage (CORITON *et al.*, 1999), qui permet d'adapter les périodes d'épandage des boues aux besoins des plantes et à l'accessibilité des sols. Ce stockage peut être réalisé en cuves, en lagunes ou à l'air libre sur des aires de stockage, pendant des durées qui varient de 4 à 6 mois.

Les boues constituent un milieu relativement hostile pour les micro-organismes pathogènes, tant au point de vue chimique que biologique. Ceux-ci sont en effet soumis à des phénomènes de prédation, mais aussi à l'action de substances inactivantes sécrétées par d'autres germes. Ainsi, certaines bactéries, comme les flavobactéries, *Klebsiella* ou encore *Aerobacter*, peuvent participer à l'inactivation des virus, le plus souvent de manière directe (REHN & SCHWARTZBROD, 1993 ; WARD, 1982) ou indirecte, notamment par production d'enzymes protéolytiques (KNOWLTON & WARD, 1987 ; CLIVER et HERRMANN, 1972). KATAYOSHI *et al.* (1983) ont ainsi isolé une bactérie phototrophique (*Rhodospseudomonas capsulata*) capable de produire une substance ayant une activité virucide pour les coliphages et les *Poliovirus*. Par ailleurs, les protozoaires peuvent se nourrir de virus (SEPP *et al.*, 1994). Les détergents anioniques, l'ammoniac (RAO *et al.*, 1988 ; HURST, 1989), les métaux lourds ou les solvants contribuent également à l'inactivation des virus (TRAUB *et al.*, 1986).

De nombreux autres facteurs interviennent dans la survie des micro-organismes comme la siccité de la boue, le pH ou la teneur en matières volatiles. L'inactivation est d'ailleurs le résultat de l'action simultanée de plusieurs facteurs. Ainsi, l'altération des protéines capsidales des virus, engendrée par la température, pourrait permettre à certains composés de pénétrer dans les particules virales et d'inactiver le génome viral. Une partie des virus présents dans les boues se trouve en effet incapable d'infecter les cellules hôtes (TURPIN *et al.*, 1993 ; ROSZAK *et al.*, 1996).

Mais en fait c'est la température atteinte par les boues au cours du stockage qui détermine essentiellement les temps de survie des micro-organismes (Tableau 29). L'effet inhibiteur de la température sur la survie des virus a été démontré par STRAUCH en 1989, en soumettant des boues à des températures de 50°C, 55°C et 60°C. Ces températures (rarement rencontrées pendant le stockage, si les boues sont correctement stabilisées), entraînent l'inactivation des *Entérovirus* en respectivement 60 heures, 10 heures et 15 minutes. En fait, l'inactivation des virus est plus lente lorsque les boues sont stockées à faible température. Ainsi, alors que les densités en *Entérovirus* chutent d'environ 1 log en 6 jours à 20°C, le même abattement est obtenu en 20 jours à 5°C (AHMED & SORENSEN, 1995) ou en 180 jours à 2°C (HURST en 1989). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par BERG *et al.*, 1988, qui ont démontré que les virus survivent pendant au moins 38 jours sans diminuer en nombre dans une boue stockée à 5°C, et par STEINMANN en 1978, qui a retrouvé des virus dans des boues après 15 semaines de stockage à 5°C.

Tableau 29
Survie des *Entérovirus* au cours du stockage des boues.

Durée de survie / abattement	Type de boue	Conditions	Références
<i>Entérovirus</i>			
15 min.	Fraîches	60°C	STRAUCH, 1989
10 h.	fraîches	55°C	STRAUCH, 1989
60 h.	fraîches	50°C	STRAUCH, 1989
1 log en 6 j.	DAN déshydratées	20°C	AHMED & SORENSEN, 1995
1 log en 20 j.	DAN déshydratées	5°C	AHMED & SORENSEN, 1995
1 log en 180 j.	?	2°C	HURST, 1989
0,4 log en 24 h.	DA	-7°C (CA)	SANIN <i>et al.</i> , 1994
4,8 log en 28 j.	DA	-7°C (CA)	SANIN <i>et al.</i> , 1994

D.A. : Digestion aérobie

D.A.N. : Digestion Anaérobie

C.A. : Contamination artificielle

Par contre, il a été montré par SANIN *et al.*, (1994) que des séries de congélations-décongélations naturelles liées aux conditions atmosphériques provoquaient un abattement très important (4,8 log en 28 jours) de *Poliovirus* ajoutés à des boues digérées.

2. Mode de traitement des boues

Les boues d'épuration fraîches, du fait de leur forte teneur en matières organiques, sont le siège de fermentations, qui se manifestent généralement par la production de gaz (méthane, hydrogène sulfuré), sources de nuisances olfactives (LARA *et al.*, 1999).

De ce fait, il est nécessaire de soumettre les boues à des traitements qui ont pour finalité, d'une part, leur stabilisation (minéralisation de la matière organique), qui limite les fermentations et, d'autre part, leur déshydratation qui réduit les volumes et donc les coûts de transport et d'élimination. Ces traitements sont susceptibles d'entraîner une inactivation des micro-organismes.

D'une manière générale, le traitement des boues est défini comme l'ensemble des opérations (stabilisation, déshydratation, stockage) visant à rendre leur destination finale fiable et sans nuisance.

Selon les procédés, les modes de stabilisation peuvent être réalisés simultanément au traitement des eaux (boues "activées" en aération prolongée, lagunage) ou dans des ouvrages spécifiques. Dans ce cas, les boues sont généralement stabilisées par digestion et éventuellement par des traitements complémentaires (post-traitements). Par ailleurs, ces boues se trouvant à l'état liquide, des traitements de concentration et de déshydratation leur sont appliqués pour les transformer en un produit pâteux.

Les principaux procédés de traitement des boues sont :

2.1. La stabilisation

Son rôle est avant tout de réduire le pouvoir fermentescible de la boue. Elle est réalisée soit par injection de réactifs chimiques (chaux vive par exemple) qui bloquent les réactions de fermentation soit le plus souvent par des méthodes biologiques anaérobies ou aérobies.

Les procédés de stabilisation biologique reposent sur l'action des microorganismes saprophytes qui dégradent la matière organique. Ceci est réalisé soit en anaérobiose (digestion anaérobie), soit en aérobiose (stabilisation aérobie).

Il existe trois types de digestion anaérobie et de stabilisation aérobie qui diffèrent par leur température de réalisation :

la digestion thermophile est réalisée à une température supérieure à 45°C,

la digestion mésophile est réalisée à une température comprise entre 25°C et 45°C,

la digestion psychrophile est réalisée entre 10°C et 20°C.

2.2. La Pasteurisation

La pasteurisation consiste à chauffer la boue, généralement entre 65 et 100°C, pendant au moins 30 minutes. A titre d'exemple, les couples température / temps appliqués aux boues peuvent être de 70°C pendant 25 min., 75°C pendant 20 min. ou 80°C pendant 10 min..

2.3. Réduction de la teneur en eau

La teneur en eau des boues peut être réduite par différents procédés d'épaississement ou de déshydratation, réalisés après leur conditionnement.

2.3.1. Conditionnement

Le conditionnement est réalisé à l'aide de divers polyelectrolytes (polymères de synthèse dont la molécule de base est l'acrylamide) ou de sels métalliques, tels que le chlorure ferrique, le chlorosulfate ferrique ("Clairtan") ou le sulfate d'alumine, qui déstabilisent les charges des particules et entraînent leur floculation.

2.3.2. Epaississement

L'épaississement des boues est le premier stade dans le processus de réduction de leur volume. Il permet d'augmenter la concentration en matière sèche d'un facteur compris entre 5 et 20, tout en conservant à la boue son caractère liquide (HAUBRY, 1994).

2.3.3. Déshydratation par évaporation naturelle (lits de séchage)

Les lits de séchage sont traditionnellement constitués d'une couche de sable. Cette couche drainante permet le ressuyage de l'eau interstitielle. L'évaporation permet ensuite à la boue d'atteindre des siccités de 30 à 35 %, qui se traduisent par l'apparition de fentes de retrait (craquelures). Les boues déshydratées forment ensuite une couche dure devant être enlevée avant que de nouvelles boues soient ajoutées au lit.

2.3.4. Déshydratation mécanique

Les procédés de déshydratation mécanique ont pour objectif de donner aux boues liquides une consistance plus ou moins solide. Les appareils les plus employés sont :

- 7 les filtres-presses à plateaux chambrés,
- 7 les centrifugeuses de types décanteuses continues,
- 7 les filtres à bande presseuse,

Dans tous les cas, la boue ne peut être déshydratée telle quelle, et une floculation préalable doit systématiquement être réalisée au moyen d'un conditionnement.

Selon la nature des produits de conditionnement et le type d'appareillage utilisés, les boues sont rendues pâteuses (15 à 30% de siccité) ou solides (30 à 50% de siccité).

2.3.5. Déshydratation par séchage thermique

Le séchage thermique est une opération physique qui permet la déshydratation des boues par évaporation de l'eau. Ce traitement permet l'obtention de boues séchées à 90-95% de siccité (SIMONSEN, 1999), utilisées comme fertilisant organique sous forme de granulés pouvant être conditionnés en sac (PAULSRUD *et al.*, 1999) ou incinérées (KREBS *et al.*, 1999 ; LUTS *et al.*, 1999).

2.4. Post traitement des boues

Dans certains cas, un traitement supplémentaire est instauré de façon à obtenir une meilleure stabilisation et une augmentation de la siccité.

2.4.1. Compostage

Le compostage est une forme de stabilisation aérobie thermophile en phase solide, qui est réalisée sur un support structurant et carboné (copeaux, sciures, paille, ordures ménagères, feuilles d'oliviers, ...). Le procédé fonctionne dans la mesure où les conditions aérobies sont maintenues en permanence et partout à l'intérieur de la masse en compostage. Il se déroule en trois étapes :

- 3 association des différents composants de manière à obtenir un mélange réactif homogène et un départ rapide en fermentation.

3 le compostage *sensu stricto*, mené dans des conditions de température thermophiles et qui consiste à poursuivre le développement de micro-organismes aérobies variés au-delà de la phase de croissance exponentielle des cellules, jusqu'à réaliser leur auto-oxydation. On observe la dégradation de la matière organique des boues (qui constituent une source de carbone et d'azote) le matériel est agité selon une fréquence appropriée de façon à favoriser l'activité des micro-organismes responsables du compostage.

1. la maturation consiste à poursuivre, après criblage, la phase d'auto-oxydation par stockage des boues compostées. Le compost obtenu par les différents procédés peut être laissé à mûrir 2 à 3 mois avant d'être utilisé en agriculture (HAUBRY, 1994).

Il existe 2 principaux types de compostage :

7 à l'air libre, sous forme de tas appelés andains, retournés périodiquement,

7 en aération forcée, soit en tas aérés par ventilation (pendant environ 4 semaines), soit en réacteurs (pendant environ 10 j.), ou en bennes mobiles ventilées (procédé de thermopostage).

2.4.2. Chaulage

Le traitement chimique le plus répandu consiste à ajouter de la chaux à la boue. Le chaulage entraîne en effet une augmentation de pH qui diminue l'activité des micro-organismes présents dans la boue, ce qui limite les fermentations et, par conséquent, les nuisances olfactives. Cette technique présente en outre l'avantage de transformer la boue en amendement calcique.

Le chaulage des boues est généralement réalisé avec de la chaux vive (CaO), qui a pour conséquence d'augmenter le pH (entre 9 et 13 selon AMER, 1997) et la température de la boue.

La chaux éteinte (Ca(OH)₂), moins caustique et irritante que la chaux vive, est généralement réservée au conditionnement des boues avant leur déshydratation (FURET, 1997).

2.4.3. Irradiation

L'irradiation a pour principale finalité une amélioration de la qualité sanitaire des boues (WARD, 1980). L'irradiation permet en effet d'augmenter l'aptitude des boues à être déshydratées tout en améliorant leur qualité microbiologique. Ce traitement consiste à soumettre la boue à des rayonnements corpusculaires émis par un accélérateur d'électrons (rayons β) ou à

des rayonnements électromagnétiques libérés par des isotopes radioactifs instables (rayons γ). Les rayons β étant peu pénétrants, la boue doit être traitée en couches très minces. En revanche, les rayons γ , plus pénétrants, permettent un conditionnement de la boue en cuves. Les doses employées sont comparables (WARD, 1980) et varient de 300 à 1000 Krad.

3. Inactivation des virus entériques au cours des traitements

Les traitements des boues sont susceptibles d'entraîner une inactivation appréciable des micro-organismes, s'ils mettent en œuvre un ou plusieurs des phénomènes suivants (E.P.A., 1992) :

- élévation conséquente de la température des boues (compostage, séchage thermique, pasteurisation, digestion aérobie ou anaérobie),
- utilisation de désinfectants chimiques (chaulage),
- application de radiations,
- inhibition de la multiplication bactérienne par réduction de la teneur des boues en matière organique (compostage, digestion aérobie ou anaérobie),
- diminution de la teneur en eau des boues (déshydratation, séchage thermique).

La réduction du niveau de contamination des boues est généralement exprimée en pourcentages d'abattement, déterminés en comparant les densités en micro-organismes avant et après traitement. L'élimination totale des micro-organismes est difficile à affirmer et il est préférable de raisonner en quantité inférieure au seuil de détection, que d'estimer 100% d'abattement. Ainsi, il est souhaitable, lorsque les données décrites dans la littérature le permettent, de calculer l'abattement réel en unité logarithmique (formule de conversion : $N \log = \frac{100}{(1-10^{-N})} \%$).

Enfin, les rendements d'élimination doivent être considérés en fonction des densités en micro-organismes dans les boues non traitées. Ainsi, lorsque les densités initiales atteignent 10^6 à 10^8 particules par gramme de boue, un abattement de 4 log (99,99%) conduit à une densité après traitement de 10^2 à 10^4 part.g⁻¹, ce qui reste élevé. Une réduction des densités de 3 à 6 unités logarithmiques (log) semble constituer l'efficacité minimale requise pour considérer le

traitement comme efficace vis à vis de l'élimination des micro-organismes (Tableaux 30, 31, 32, 33, 34).

3.1. Pasteurisation

Les résultats concernant l'inactivation sont très variables en fonction des micro-organismes, de la température et de la durée d'exposition. Quelques données sont rapportées dans le tableau 30. Il apparaît en fait que la pasteurisation doit être réalisée à 70°C pendant 30 minutes pour inactiver efficacement les *Entérovirus*, sans pour autant garantir leur élimination totale (TELES *et al.*, 1999 ; STRAUCH, 1989).

Tableau 30

Influence de la pasteurisation sur l'inactivation des micro-organismes

Virus	Abattement (log)	Elimination des virus	Références
<i>Entérovirus</i>			
70°C - 30 min.	0,4 à 0,9	NON ($4,9 \times 10^2$ UFP.100mL ⁻¹)	STRAUCH, 1989
70°C - 30 min.	(100%)	OUI	PIKE <i>et al.</i> , 1988

3.2. Digestions psychrophiles

Les travaux concernant l'hygiénisation des boues au cours de digestions réalisées à basse température sont peu fréquents, mais il apparaît clairement que l'inactivation des micro-organismes pathogènes au cours de digestions aérobies ou anaérobies psychrophiles est faible. MARTIN *et al.*, 1990 ont montré qu'une stabilisation aérobie à 8°C pendant 20 jours, entraîne des abattements des densités en *Entérovirus*, streptocoques fécaux, coliformes totaux et coliformes fécaux de respectivement 0,7, 0,3, 0,7 et 0,6 log.

3.3. Digestions mésophiles

Au cours des digestions mésophiles, l'action de plusieurs paramètres est déterminante, tels que le pH (PLACHY *et al.*, 1995 ; WARD, 1980), la présence d'ammoniaque (REIMERS *et al.*, 1998 ; SCHWARTZBROD, 1997 ; WARD, 1980 ; FENTERS *et al.*, 1979 ; WARD & ASHLEY, 1976) ou d'oxygène, ainsi que de micro-organismes par des phénomènes de

prédation, de compétition ou de production d'enzymes protéolytiques (KNOWLTON & WARD, 1987 ; WARD, 1982).

La réduction des densités en micro-organismes varie cependant considérablement en fonction du couple temps / température (Tableau 32). A partir de 35°C, l'influence de la durée est moins importante (WATANABE *et al.*, 1997), mais en dessous de cette température, les durées de mise en œuvre des digestions mésophiles doivent généralement atteindre 15 jours pour que la stabilisation des boues s'accompagne d'un effet hygiénisant. Mais, SPILLMANN *et al.*, 1987 et CARRINGTON *et al.*, 1991 estiment qu'une digestion anaérobie mésophile influence peu la viabilité des *Entérovirus*.

Tableau 31
Inactivation des *Entérovirus* au cours des process de digestion mésophile

Procédé	Abattement (log)	Elimination des virus	Références
<i>Entérovirus</i>			
<u>procédé anaérobie :</u>			
?	1,5	NON ($2,9 \times 10^0$ UI.10g ⁻¹)	HU <i>et al.</i> , 1995
35°C - 16 j.	0,5 à > 3	NON ($2,5 \times 10^3$ NPPUC.10g ⁻¹)	SOARES <i>et al.</i> , 1994
?	2	NON (8×10^1 NPPUC.100mL ⁻¹)	STRAUB <i>et al.</i> , 1994 ^a
?	1,3	NON	PALFI, 1993
34°C - 26 j.	1,4	NON (2×10^1 UFP.100mL ⁻¹)	CARRINGTON <i>et al.</i> , 1991
?	0,9	NON	TRAUB <i>et al.</i> , 1986
35°C - 15 à 20 j.	0,6	NON ($1,3 \times 10^1$ UFP.100mL ⁻¹)	SCHWARTZBROD & MATHIEU, 1986
35°C - 20 j.	1,1	NON ($4,1 \times 10^2$ UFP.100mL ⁻¹)	BERG & BERMAN, 1980
<u>procédé aérobie :</u>			
18°C - 20 j.	1	NON ($6,3 \times 10^1$ UFP.100mL ⁻¹)	MARTIN <i>et al.</i> , 1990
24°C - 20 j.	1,1	NON (5×10^1 UFP.100mL ⁻¹)	MARTIN <i>et al.</i> , 1990
26°C - 20 j.	1,3	NON ($3,1 \times 10^1$ UFP.100mL ⁻¹)	MARTIN <i>et al.</i> , 1990
38°C - 20 j.	> 3,2	OUI	MARTIN <i>et al.</i> , 1990
40°C - 15 j.	> 2,3	OUI	MARTIN <i>et al.</i> , 1990

En revanche, MARTIN *et al.*, 1990, ont démontré, en utilisant des modèles de régression élaborés à partir de données empiriques, qu'un abattement des densités en *Entérovirus* et en indicateurs bactériens de 2 log est obtenu : en 60 jours à 15°C, en 40 jours à 20°C, en 29 jours à 30°C et en 25 jours à 40°C.

En fait, la détermination de la contamination des boues en micro-organismes pathogènes avant et après stabilisation par digestion mésophile démontre sa faible efficacité à hygiéniser les boues.

Les virus sont en effet peu inactivés (HU *et al.*, 1995 ; SOARES *et al.*, 1994 ; PALFI, 1993 ; SPILLMANN *et al.*, 1987 ; GODDARD *et al.*, 1981 ; DUDLEY *et al.*, 1980), sauf si la température est supérieure à 38°C pendant au moins 15 jours (MARTIN *et al.*, 1990).

2.4. Digestion thermophile

La stabilisation aérobie thermophile est considérée par la réglementation américaine comme un traitement P.F.R.P. (Process to Further Reduce Pathogens) (E.P.A., 1992) si la boue liquide est brassée en présence d'air ou d'oxygène de façon à maintenir des conditions aérobies pendant 10 jours à 55-60°C. Ce n'est pas le cas de la digestion anaérobie thermophile, bien que toutes deux soient efficaces vis à vis de l'inactivation des pathogènes (NIELSEN & PETERSON, 1999), et qu'à température égale, les performances de la stabilisation aérobie soient similaires à celles de la digestion anaérobie (AHMED & SORENSEN, 1995). Une étude réalisée par HUYARD *et al.*, 1999 a d'ailleurs montré que la digestion anaérobie thermophile en 2 phases (2 j. à 60°C ; 10j à 37°C) pourrait être recommandée comme procédé P.F.R.P.. WATANABE *et al.*, 1997 avaient abouti à la même conclusion en ce qui concerne la digestion anaérobie menée à 55°C pendant au moins 10 jours.

On constate que l'inactivation des virus augmente rapidement lorsque la température mise en jeu au cours du procédé atteint 60°C (WARD, 1980). En fait, les micro-organismes subissent d'une part, une inactivation par la température, et d'autre part, une lyse due à l'action d'exo-enzymes (particulièrement des protéases) produites par le processus thermophile aérobie (HÄNER *et al.*, 1994).

Au cours des digestions thermophiles aérobies, l'inactivation virale peut être très rapide et atteindre 1,7 log par minute pour les *Coxsackievirus* (SPILLMANN *et al.*, 1987) et 1,2 à 3,5 log par heure (respectivement à 54,5 et 60°C) pour les bactériophages f2 (TRAUB *et al.*, 1986). Des durées similaires ont été observées au cours de digestions anaérobies : 4 log par heure pour les *Rotavirus* (SPILLMANN *et al.*, 1987), 0,9 log par minute pour les *Coxsackievirus* (SPILLMANN *et al.*, 1987) et 1,2 log par heure pour les bactériophages f2 (TRAUB *et al.*, 1986).

En fait de nombreux auteurs ont démontré qu'il est fréquent d'atteindre 2 à 4 log d'abattement des densités en *Entérovirus* (HUYARD *et al.*, 1999 ; CARRINGTON *et al.*, 1991 ; MARTIN *et al.*, 1990 ; BERG & BERMAN, 1980) lors d'une digestion anaérobie thermophile (Tableau 32).

Tableau 32

Inactivation des *Entérovirus* au cours des process de digestion thermophile

Procédé	Abattement (log)	Elimination des virus	Références
<i>Entérovirus</i>			
<u>procédé anaérobie</u> :			
55°C 2j., 37°C 10 j.	4	NON (CA)	HUYARD <i>et al.</i> , 1999 ^a
49°C - 20 j.	2,5	NON (1,7x10 ¹ UFP.100mL ⁻¹)	BERG & BERMAN, 1980
35°C - 4,2 j.	1	NON	SANDERS <i>et al.</i> , 1979
45°C - 5 j.	1	NON	SANDERS <i>et al.</i> , 1979
<u>procédé aérobie</u> :			
60 à 70°C - 3 à 5 j.	2,3	NON (2x10 ¹ UFP.100mL ⁻¹)	MARTIN <i>et al.</i> , 1990
55°C - 28 j.	4	NON (2,0x10 ¹ UFP.100mL ⁻¹)	CARRINGTON <i>et al.</i> , 1991
?	0,4 à 2,1	NON	STRAUCH, 1989
48 à 55°C - 15 à 20 j.	2,2	NON (3,2x10 ² UFP.100mL ⁻¹)	KABRICK & JEWELL, 1982

CA : contamination artificielle

2.5. Déshydratation

Les procédés de déshydratation mécanique confèrent aux boues un état pâteux (15 à 30% de siccité) ou solide (30 à 50% de siccité), susceptible d'être défavorable à la survie de certains micro-organismes. Ainsi, dans le cas des virus, la déshydratation entraîne leur inactivation par rupture des capsides virales et relargage de l'acide nucléique (WARD, 1980). La perte d'infectivité virale d'une boue semble proportionnelle à son taux de déshydratation (BRASHEAR & WARD, 1983).

La déshydratation sur lits de séchage peut permettre la réduction de la contamination microbiologique de boues digérées (digestion aérobie mésophile) de 2 à 4 log, à condition de faire intervenir des temps de rétention supérieurs à 40 jours (TSAI *et al.*, 1998). L'inactivation des *Entérovirus* (*Poliovirus*, *Coxsackievirus*) et des *Réovirus* peut alors atteindre 4 log (WARD et ASHLEY, 1977).

2.6. Compostage

Le compostage est considéré par la réglementation américaine comme un traitement P.F.R.P. (E.P.A., 1992) si la température de la boue est maintenue à plus de 55°C pendant 3 jours dans le cas d'un compostage en aération forcée ou à plus de 55°C pendant 15 jours dans le

cas d'un compostage par retournements successifs, avec au minimum 5 retournements. Ce post-traitement peut en effet être considéré comme efficace en terme d'hygiénisation pour de multiples raisons : la température atteinte (BIGOT *et al.*, 1997), le type de matériau utilisé, la durée du procédé et de l'étape de maturation, le développement d'une flore saprophyte rentrant en compétition avec les populations pathogènes, et la stabilisation durable de la matière organique.

Les procédés de compostage ont démontré leur capacité d'inactivation des virus. Ainsi, STRAUCH (1989) observe après un compostage de 70 à 80°C pendant 7 jours, un abattement des *Entérovirus* qui varie de 1,2 à plus de 4 log

La droite d'inactivation en fonction du temps et de la température montre bien l'influence de ces 2 paramètres sur l'inactivation des *Entérovirus*.

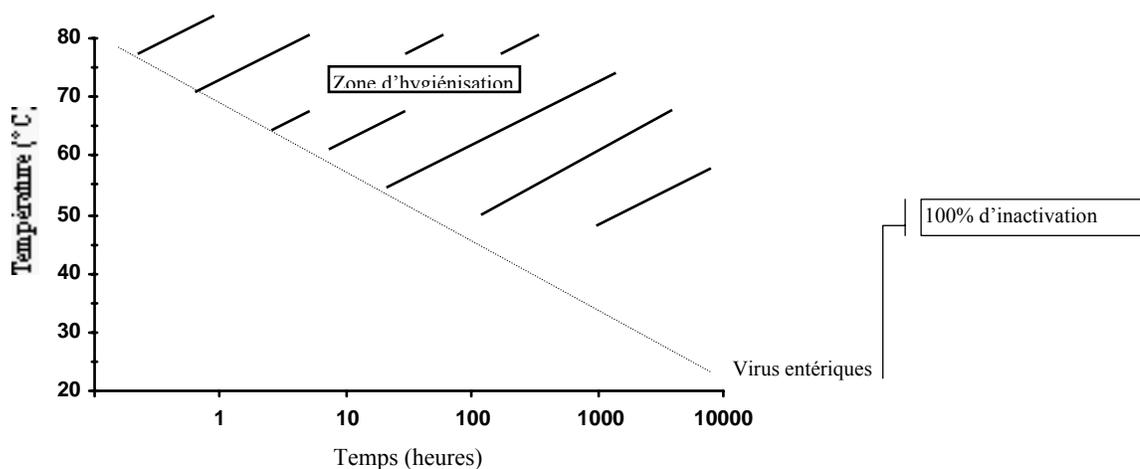


Figure 8

Effet hygiénisant du couple temps-température dans le cas du compostage de boues résiduaire et de matières de vidange (d'après Bigot *et al.*, 1997).

Cependant, il est absolument indispensable d'être assuré d'une température homogène dans toute la boue pour pouvoir obtenir une bonne inactivation.

2.7. Chaulage

Globalement, il apparaît que le chaulage peut être efficace pour inactiver les micro-organismes présents dans les boues lorsqu'il permet d'atteindre un pH supérieur à 12 (TSAI *et al.*, 1998).

La densité de virus peut être réduite considérablement si la boue atteint ou dépasse ce pH (PANCORBO *et al.*, 1988 ; STRAUCH, 1989 ; SCHWARTZBROD & MATHIEU, 1986 ; KOCH & STRAUCH, 1981). Cependant, la faible inactivation (environ 1 log) engendrée en quelques jours (HURST, 1989) montre qu'il est nécessaire de stocker la boue traitée pour augmenter l'inactivation virale (Tableau 33).

Tableau 33

Inactivation des *Entérovirus* au cours du chaulage des boues

Dose de chaux (p/p M.S.)	Type de boue	Abattement (log)	Références
1,5 Kg/m ³	Primaires	1 en 3 j.	HURST, 1989
3 Kg/m ³	Primaires	1 en 0,01 j.	HURST, 1989
1,5 Kg/m ³	Digestion anaérobie	1 en 7 j.	HURST, 1989
3 Kg/m ³	Digestion anaérobie	1 en 4 j.	HURST, 1989
5 Kg/m ³	Digestion anaérobie	1 en 0,465 j.	HURST, 1989
7 %	fraîches	(100%) en 24 h.	STRAUCH, 1989
10 %	fraîches	(100%) en 3 h.	STRAUCH, 1989

Par ailleurs, de façon à éviter une inactivation incomplète des micro-organismes, due à un mauvais mélange de la chaux et de la boue, le malaxage semble être un facteur important (FURET, 1997). Ces contraintes de réalisation expliquent que la réglementation américaine n'inclut pas le chaulage dans les traitements P.R.F.P., même si il a été démontré que le chaulage des boues permet de réduire la densité en pathogènes à un niveau non détectable si les conditions suivantes sont respectées :

- pH > 12 pendant plus de 72 heures,
- T° > 52°C pendant au moins 12 heures (à pH > 12),
- séchage de la boue à plus de 50% de M.S. après la période de 72 heures à pH > 12.

2.8. Traitement par irradiation

L'irradiation des boues est considérée par la réglementation américaine comme un traitement P.F.R.P. (E.P.A., 1992) si la boue est irradiée :

- 7 par des rayons bêta émis par un accélérateur assurant une dose minimale de 1 Mrad à 20°C,
- 7 par des rayons gamma émis par certains isotopes, tels que le Cobalt 60 et le Césium 137, à une dose minimale de 1 Mrad à 20°C.

L'irradiation par rayonnement bêta constitue un procédé inoffensif, qui ne laisse pas de radiation résiduelle dans la boue traitée. Par ailleurs, étant conduite à température ambiante, elle

conserve aux boues toutes leurs propriétés fertilisantes (HORAK, 1994). En revanche, les radiations gamma entraînent une augmentation de la température de la boue traitée. L'inactivation observée est donc d'autant plus forte que la température augmente, d'où le terme de "thermoradiation". Cependant, d'autres facteurs tels que l'humidité et la présence d'oxygène interviennent dans l'élimination des micro-organismes.

Les doses de rayonnement entraînant une inactivation virale sont, d'après WARD (1980) 10 fois plus fortes que celles nécessaires à l'inactivation des bactéries. Dans le tableau 34 sont rassemblées quelques données concernant l'efficacité de l'irradiation sur les *Entérovirus*.

Tableau 34
Inactivation des *Entérovirus* à la suite de l'irradiation des boues

	Abattement (log)	Elimination*	Références
<i>Entérovirus</i>			
"γ" Co ⁶⁰ 200 Krad	1,3 à 3,2	?	STRAUCH, 1989
"γ " ou "β" 150-500 Krad	1	NON	WARD, 1980
"γ " ou "β" 1 Mrad	3	NON	WARD, 1980

En conclusion, il est indiqué dans le tableau 35 à titre de synthèse l'influence des différents traitements sur la qualité microbiologique des boues.

Tableau 35

Influence des traitements sur la qualité microbiologique des boues

Type de traitement	Inactivation des micro-organismes	Elimination des micro-organismes
<i>Traitements très efficaces</i>		
Incinération	Totale	Systematique
Séchage thermique	Totale	Systematique
<i>Traitements efficaces</i>		
Pasteurisation	Importante (si > 70°C pendant 30 min.)	Pas systematique
Digestions thermophiles	Importante (si > 55°C pendant 10 j.)	
Lits de séchage	Importante (si > 200 j.)	
Compostage	Importante (si > 55°C pendant 2 sem.)	
Chaulage	Importante (si pH > 12 et stockage 20 j.)	
<i>Traitements peu efficaces</i>		
Digestions psychrophiles	Faible (sauf si > 90 jours)	Rare
Digestions mésophiles	Faible (sauf si > 50 jours)	
Irradiation	Faible (sauf si > 1 Mrad)	

D'une manière générale, l'action inactivante des procédés de stabilisation varie considérablement en fonction du type de micro-organisme considéré mais, les virus entériques ne présentent pas de résistance particulière vis à vis des traitements. Leur densité dans les boues fraîches étant généralement inférieure à 10^4 NPP.10g⁻¹ M.S., les traitements très efficaces ou efficaces permettent leur élimination des boues de façon quasi systématique.

Références

AHMED A.U. and SORENSEN D.L. (1995). Kinetics of pathogen destruction during storage of dewatered biosolids. Water Environ Res., **67**, 143-150.

AMER A.A. (1997). Destruction of sludge pathogenic bacteria using quick lime and cement dust. Egypt. J. Soil Sci., **37**, 343-354

BERG G. and BERMAN D. (1980). Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges. Appl. Environ. Microb. **39**, 361-368

BERG G., SULLIVAN G. and VENOSA A.D. (1988). Low-temperature stability of viruses in sludges. Appl. Environ. Microb., **54**, 839-841

BIGOT V., BOURMEAU E. et LEGEAS M. (1997). Le compostage et son effet hygiénisant. Ademe, journées techniques des 5 et 6 juin 1997 44-58.

CARRINGTON E.G., PIKE E.B., AUTY D. and MORRIS R. (1991). Destruction of faecal bacteria, *Entéroviruses* and ova of parasites in wastewater sludge by aerobic thermophilic and anaerobic mesophilic digestion. Wat. Sci. Technol., **24**, 377-380

CLIVER D.O. and HERRMANN J.E. (1972). Proteolytic and microbil inactivation of *Entéroviruses*. Water Res., **6**, 797-805.

CORITON G., LÉBOUCHER G. and BONNIN C. (1999). Saphyr : a flexible final route"Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities", october 13-15 1999, Athens, Greece 290-295.

DUDLEY D.J., GUENTZEL M.N., IBARRA M.J., MOORE B.E. and SAGIK B.P. (1980). Enumeration of potentially pathogenic bacteria from sewage sludges. Appl. Environ. Microb. **39**, 118-126.

Environmental Protection Agency (1992). Environmental Regulations and Technology : EPA/625/R-92/013, USEPA. Washington D.C. Control of pathogens and vector attraction in sewage sludge.

FURET G. (1997). Synthèse bibliographique sur l'effet hygiénisant du chaulage des boues d'épuration. Ademe, journées techniques des 5 et 6 juin 199759-67.

GODDARD M.R., BATES J. and BUTLER M. (1981). Recovery of indigenous *Entéroviruses* from raw and digested sewage sludges. Appl. Environ. Microb. **42**, 1023-1028.

HÄNER A., MASON C.A. and HAMER G. (1994). Death and lysis during aerobic thermophilic sludge treatment : characterization of recalcitrant products. Water Res., **28**, 863-869.

HAUBRY A. (1994). Les boues : caractéristiques, destinations finales, filières de traitementIn "les boues des stations d'épuration urbaines". Session de formation continue - Paris 7/10

novembre 1994. E.N.G.R.E.F., Cemagref (Ed), 295 p129-168.

HORAK P. (1994). Experimental destruction of Ascarid ova in sewage sludge by accelerated electron irradiation. Water Res., **28**, 931-941.

HU C.J., GIBBS R.A., HO G.E., PHILLIPS P. and UNKOVICH I. (1995). Pathogen densities in wastewater sludge treated by anaerobic digestion and dewatering 3rd Intl Conf. Appropriate Waste Mgmt Technologies for developing Countries, NEERI, Nagpur 23-31.

HURST C.J. (1989). Fate of viruses during wastewater sludge treatment processes. Crit. Rev. Environ. Control., **18**, 317-343.

HUYARD A., FERRAN B. and AUDIC J.M. (1999). Spiking a two phase anaerobic digestion pilot plant : an innovative approach to obtain a P.F.R.P. equivalency recommendation Water Environment Federation. 72th Annual Conference & Exposition, 9-13 octobre 1999, New Orleans, Louisiana.

HUYARD A., FERRAN B. and AUDIC J.M. (1999). The two phase anaerobic digestion process : sludge stabilization and pathogens reduction "Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities", october 13-15 1999, Athens, Greece 97-104.

KABRICK R.M. and JEWELL W.J. (1982). Fate of pathogens in thermophilic aerobic sludge digestion. Water Res., **16**, 1051-1060.

KNOWLTON D.R. and WARD L.R. (1987). Characterization of virucidal agents in activated sludge. Appl. Environ. Microb., **53**, 621-626.

KOCH K and STRAUCH D. (1981). Removal of polio and parvo viruses in sewage sludge by lime-treatment. Zbl. Hyg. Umweltmed., **174**, 335-347.

KREBS G., COMMERFORD P. and MAIER C. (1999). Sewage sludge drying by using alternative heat sources 551-558.

LARA A.I., BONNET B.R.P., ANDREOLI C.V., FERREIRA A.C. and PEGORINI E.S. (1999). Monitoring of the recycling of sewage sludge for use in agriculture in the state of Parana, Brazil "Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities 79-86.

LUTS D., DEVOLDERE K., BARTHOLOMEEUSEN W. and OCKIER P. (1999). Co-incineration of dried sewage sludge in coal fired power plants : a case study 535-542.

MARTIN J.H., BOSTIAN H.E. and STERN G (1990). Reductions of enteric microorganisms during aerobic sludge digestion. Water Res., **24**, 1377-1385.

NIELSEN B. and PETERSON G. (1999). Thermophilic anaerobic digestion and pasteurisation. Practical experience from Danish wastewater treatment plants "Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities",

october 13-15 1999, Athens, Greece 121-128.

PALFI A. (1993). Survival of *Entéroviruses* during anaerobic sludge digestion Proceedings of the 6th Int. Conf. "Advances in water pollution research", Jenkins S.H. Ed. Pergamon Press. Oxford.

PANCORBO O.C., BITTON G., FARRAH S.R., and GIFFORD G.E. (1988). *Poliovirus* retention in soil columns after application of chemical-and polyelectrolyte-conditioned dewatered sludges. Appl. Environ. Microb., **54**, 118-123.

PAULSRUD B., WIEN A. and TRANUM I. (1999). Stabilisation and disinfection of sludge from biological / chemical joint treatment of municipal and industrial (airport) wastewater"Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities", october 13-15 1999, Athens, Greece 169-176.

PIKE E. B., CARRINGTON E. G. and HARMAN S. A. (1988). Destruction of salmonellas, *Entéroviruses* and ova of parasites in wastewater sludge by pasteurisation and anaerobic digestion. Wat. Sci. Technol., **20**, 337-343.

PLACHY P., PLACHA I and VARGOVA M. (1995). Effect of physical-chemical parameters of sludge aerobic exothermic stabilization on the variability of *Ascaris suum* eggs. Helminthologia **32**, 233-237.

RAO C., METCALF T. G. and MELNICK J. L. (1988). Virus humains dans les sédiments, les boues et les sols. Bull. OMS, **64**, 341-356.

REHN Y. and SCHWARTZBROD L. (1993). Virucidal activity of an activated sludge supernatant. Zbl. Hyg. Umwelt. **194**, 481-489.

REIMERS R.S., DE SOCIO E.R. and BANKSTON W.S. (1998). Current/future advances in biosolids disinfection processing 71st Annual onference of the Water Environment Federation - Orlando 3-7445-7459.

ROSZAK D.B., GRIMES D.J. and COLWELL R.R. (1996). Viable but nonrecoverable stage of *Salmonella enteritidis* in aquatic systems. Can. J. Microbiol., **30**, 334-338.

SANDERS D.A., MALINA J.F., MOORE B.E., SAGIK B.P. and SORBER C.A. 1979 Fate of *Poliovirus* during anaerobic digestion J. Wat. Pollut. Control Fed. **51**, 333-343.

SANIN F.D., VESILIND P.A. and MARTEL C.J. (1994). Pathogen reduction capabilities of freeze/thaw sludge conditioning. Water Res., **28**, 2393-2398.

SCHWARTZBROD J., MATHIEU L., THEVENOT M.T., BARADEL J.M. et SCHWARTZBROD L. (1986). Analyse parasitologique et virologique des boues de station d'épuration. Tech. Sci. Munic., **3**, 149-153.

SCHWARTZBROD L. and MATHIEU L. (1986). Virus recovery from wastewater treatment plants sludges. Water Res., **20**, 1011-1013.

SEPP T., WANG A.L. and WANG C.C. (1994). *Giardia* virus resistant : *Giardia lamblia* lacks a virus receptor on the cell membrane surface. J. Virol., **68**, 1426-1431.

SIMONSEN N. (1999). Thermal sludge treatment in Denmark, examples of efficient drying and incineration"Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities", october 13-15 1999, Athens, Greece 487-495.

SOARES A.C., STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994). Effect of anaerobic digestion on the occurrence of *Entéroviruses* and giardia cysts in sewage sludge. J. Environ. Science Health **29**, 1887-1897

SPILLMANN S.K., TRAUB F., SCHWYZER M. and WYLER R. (1987). Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment. Appl. Environ. Microb., **53**, 2077-2081.

STEINMANN J. (1978). Detection and persistence of human pathogenic viruses in chemical sludge. Zbl. Hyg. Umweltmed., **167**, 470-477.

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1995). Comparison of PCR and cell culture for detection of *Entéroviruses* in sludge-amended field soils and determination of their transport. Appl. Environ. Microb., **61**, 2066-2068.

STRAUCH D. (1989). Improvements of the quality of sludge-microbial aspects. In sewage sludge treatment and use, (edited by Dirkzwager, A.H. & L'Hermite P.) Elsevier Appl. Sci. Res., London 160.-169.

TELES C.R., DA COSTA A.N. and GONCALVES R.F. (1999). Sludge production in primary stabilization ponds and its use to forest species cultivation in the southeast region of Brazil "Specialised conference on Disposal and Utilisation of Sewage Sludge : treatment Methods and Application Modalities", october 13-15 1999, Athens, Greece 448-452.

TRAUB F., SPILLMANN S.K. and WYLER R. (1986). Method for determining virus inactivation during sewage sludge treatment processes. Appl. Environ. Microb., **52**, 498-503.

TSAI C.T., LAI J.S. and LIN S.T. (1998). Quantification of pathogenic micro-organisms in the sludge from treated hospital wastewater. J. Appl. Microbiol., **85**, 171-176.

TURPIN P.E., MAYCROFT K.A., ROWLANDS C.L. and WELLINGTON E.M.H. (1993). Viable but non-culturable *Salmonellas* in soil. J. Appl. Bacteriol., **74**, 421-427.

WARD R.L. and ASHLEY C.S. (1977). Identification of the virucidal agent in wastewater sludge. Appl. Environ. Microb., **33**, 860-864.

WARD R.L. (1980). Virus survival during sludge treatment in Goddard M. & Butler M., *Viruses and Wastewater Treatment*, Pergamon Press, Oxford, 1981, 65-67.

WARD R.L. (1982). Evidence that microorganisms cause inactivation of viruses in activated sludge. Appl. Environ. Microb., **43**, 1121-1124.

WATANABE H., KITAMURA T., OCHI S. OZAKI M. (1997). Inactivation of pathogenic bacteria under mesophilic and thermophilic conditions. Wat. Sci. Technol., **35**, 25-32.

Chapitre 6

Devenir des virus entériques sur les sols et les cultures maraîchères

Dans de nombreux pays, en raison de l'insuffisance des ressources en eau, il est fait appel aux eaux usées pour l'irrigation des terrains agricoles. De plus, les boues provenant du traitement des eaux usées constituant un excellent engrais, elles sont de plus en plus utilisées en amendement agricole. Les virus entériques contenus dans ces eaux usées et ces boues sont ainsi déposés sur les cultures et sur le sol au niveau duquel ils sont susceptibles de survivre. Il y a alors création d'un risque pour la santé publique soit à la suite de la contamination de nappes d'eaux souterraines par migration des virus à travers les sols, soit par consommation de produits maraîchers contaminés.

1. Devenir des virus dans les sols

1.1. Survie

Les virus entériques sont incapables de se multiplier dans les sols et donc leur nombre ne peut que rester stable ou, le plus souvent décroître. De nombreux facteurs sont susceptibles d'influer sur la survie de ces virus dans le sol (Tableau 36) en agissant seuls ou en conjonction.

De nombreuses études ont montré que la chaleur associée à la perte d'humidité était le facteur d'inactivation le plus important (HURST *et al.*, 1980b ; YEAGER and O'BRIEN, 1979 ; STRAUB *et al.*, 1992 ; SOBSEY *et al.*, 1995 ; WEKERLE, 1986). Mais la chaleur a beaucoup plus d'effet nocif sur le pouvoir infectieux que sur le génome viral. Ceci a été bien montré pour le *Poliovirus 1* qui n'est plus infectieux après 15 minutes à 56°C alors que son génome peut encore être détecté après 15 minutes à 75°C en tampon phosphate (GANTZER *et al.*, 1996). A l'inverse l'humidité du sol, liée aux précipitations, améliore la survie des *Entérovirus* (BOUTIN, 1982 ;

BASTOS and MARA, 1995 ; DEPORTES *et al.*, 1995). Ainsi, BITTON *et al.*, 1984 ont montré que, dans des sols ayant reçu de la boue digérée, le *Poliovirus* 1 et l'*Echovirus* 1 survivent pendant plus de 35 jours au cours de la saison estivale humide et pendant moins de 8 jours au cours de la saison estivale sèche.

Tableau 36
Facteurs influant sur la survie des virus dans les sols
(d'après BITTON and GERBA (1984))

Facteurs	Commentaires
Température	L'élévation de température est facteur le plus préjudiciable
Dessication	Facteur très préjudiciable aux virus. La dessication augmente l'inactivation virale dans les sols.
Ensoleillement	Peut être préjudiciable directement au niveau de la surface du sol et indirectement par augmentation de la température.
pH	Affecte indirectement la survie des virus en contrôlant leur adsorption et leur désorption des particules de sol.
Cations	Certains cations (Mg) ont un effet de thermostabilisation des virus. Les cations peuvent aussi favoriser l'adsorption des virus sur les sols. Or, les virus semblent survivre plus longtemps à l'état adsorbé.
Nature du sol	Les argiles et les substances humiques augmentent la rétention d'eau par les sols et de ce fait augmentent la survie des virus sensibles à la dessication.
Facteurs biologiques	Pas de notion claire en ce qui concerne l'action de la microflore du sol alors que, il y a quelques évidences de synthèse de substances virucides par la microflore des eaux.

L'intensité de l'ensoleillement affecte la survie des virus d'une manière directe en agissant par l'intermédiaire des rayons ultra-violet sur la particule virale et indirectement en provoquant une élévation de la température et d'autre part en facilitant le développement d'une microfaune.

Cet effet de l'ensoleillement a été bien mis en évidence par HURST (1988), qui rapporte que, dans l'eau en l'absence de lumière solaire le taux d'inactivation virale est compris entre 0,7 et 0,8 log par jour alors que en plein ensoleillement le taux d'inactivation est de 2,4 log par jour.

Les durées de survie des virus entériques dans le sol, rapportées dans la littérature sont très variables puisqu'elles varient de 11 à 180 jours (Tableau 37), les températures basses prolongeant nettement la durée de survie mais des *Entérovirus* ont été retrouvés dans des sols plus de 6 mois après l'épandage de boues d'épuration (STRAUB *et al.*, 1995).

Tableau 37
Durée de survie des virus entériques dans le sol

Virus	Composition du sol	Température et humidité	Durée de survie (jours)	Références
<i>Entérovirus</i>	Sable	3 à 10°C	70 – 170	BAGDASARYAN (1964)
		18 à 23°C	25 - 110	
			15 - 25	
<i>Poliovirus</i>	Sable	Humide	91	LEFLER and KOTT (1974)
		Sec	88	
	Sable et terreau	4°C	84	DUBOISE <i>et al.</i> , (1976)
		Humide	(90% de réduction)	
		20°C	84	
<i>Entérovirus</i>		Humide	(99,999 % de réduction)	
		Eté humide	> 35	BITTON <i>et al.</i> , (1984)
Eté sec	< 8			
<i>Coxsackievirus</i>	Argile	-12 à 26°C	161	DAMGAARD-LARSEB <i>et al.</i> , (1977)
<i>Poliovirus</i>		15 à 33°C	11	TIERNEY <i>et al.</i> , (1977)
		-14 à 2°C	89-96	
<i>Poliovirus et Coxsackievirus</i>	Sable et terreau	37°C humidité à saturation	12	YEAGER and O'BRIEN (1979)
		4°C humidité à saturation	180	
<i>Poliovirus</i>	Argile	15°C	16	STRAUB <i>et al.</i> , (1992)
		27°C	7,5	
	Sable	15°C	10,5	
		27°C	6,5	

1.2. Adsorption des virus sur les sols

L'adsorption a aussi un important effet sur le devenir des virus dans les sols. Cette adsorption dépend en particulier du pH, du type de sol et du sérotype viral. Ainsi, le *Poliovirus* 1 s'adsorbe très bien sur l'argile (adsorption > à 99 %) et beaucoup moins sur les sols sableux

(44% à 87%). Par contre, les *Norwalk like-virus* s'adsorbent moins bien quel que soit la nature du sol (adsorption : 90%) sauf sur une argile dont la concentration en oxyde de fer est importante (adsorption : 99,9 %) (Tableau 38). Cette faible adsorption des *Norwalk like-virus* peut expliquer pourquoi ces virus atteignent les eaux souterraines et sont ensuite à l'origine d'épidémies de gastroentérites transmises par des eaux de boisson d'origine souterraine.

Tableau 38
Pourcentage d'adsorption du *Poliovirus 1* et de *Norwalk like-virus* sur des sols mis en suspension dans des eaux usées issues d'un traitement tertiaire
(d'après MESCHKE and SOBSEY, 1998)

Type de sol	<i>Poliovirus 1</i> (Infectivité)	Norwalk like-virus (génomé-RT PCR)
Kaolinite	99,9	90,0
Bentonite	99,7	90,0
Argile (Cecil clay loam)	99,9	99,9
Ponzer organic muck	44,7	90,0
Sable (sand-loam)	87,8	90,0
Sable (Carolla coarse sand)	52,8	45,0

De même BLANC et NASSER (1996) ont montré que le *Poliovirus 1* s'adsorbait beaucoup plus que le bactériophage MS2 sur un sol riche en terreau (99,3% versus 15,5%). Le pH joue un rôle fondamental dans les phénomènes d'adsorption et de desorption. En effet, les virus sont recouverts de groupements ionisables dont la charge est modifiée en fonction du pH. Ainsi la charge du virus est positive si le pH est inférieur au pHi et négative au dessus de ce pHi. Ces charges électriques variables en fonction du pH permettent au virus soit de s'adsorber sur des supports de charge opposée, soit de se désorber de supports de charge identique (BALES *et al.*, 1993). Le pHi des *Enterovirus* se situe entre 4 et 8,2.

Le type de sol est aussi important. Ainsi, l'adsorption est différente selon que le sol est sableux ou argileux. La plupart des virus s'adsorbent mieux sur l'argile que sur le sable comme le montre le tableau 38.

Enfin, GOYAL and GERBA (1979) ont montré que le *Poliovirus* et les virus *Coxsackie B₁* et *B₆* étaient bien adsorbés par la plupart des sols alors que les souches de *Coxsackie B₄* étaient mal

adsorbées. Cette même variabilité d'adsorption a été aussi observée avec différentes souches d'*Echovirus*.

En pratique, LANDRY *et al.*, (1980) ont montré que les virus s'adsorbaient sur les particules de terre en surface mais qu'à la suite d'arrosage il pouvait y avoir une désorption et migration des virus en profondeur. A la suite d'épisodes pluvieux ou d'irrigations successives, ils peuvent ainsi subir des séries d'adsorption-désorption et migrer progressivement vers les couches profondes.

La désorption des virus du sol est favorisée par la faible concentration ionique des liquides d'infiltration, en particulier l'eau de pluie a une concentration ionique très faible et serait donc un très bon éluant. Cependant, en règle générale les virus demeurent dans les couches superficielles du sol. Ainsi HURST *et al.*, (1980a), après contamination d'un sol avec du poliovirus, récupèrent 91 % des virus dans la couche supérieure de 2,5 cm, 5,6 % dans la couche comprise entre 2,5 et 10 cm et 3,4 % à 10-25 cm de profondeur.

De même LANDRY *et al.*, (1980) travaillant sur des carottes de sols contaminés avec du poliovirus, récupèrent 77 % des virus dans la couche supérieure de 5 cm, 11 % entre 5 et 10 cm, 8 % entre 10 et 25 cm et seulement 4 % entre 25 et 75 cm.

1.3. Migration des virus dans les sols

Les virus présents dans les eaux et les boues épandues sur les sols peuvent migrer à travers le sol et éventuellement contaminer les eaux profondes (Figure 9) (GERBA *et al.*, 1991 ; COLLINS et KENNEDY, 1992 ; HRUDEY *et al.*, 1992).

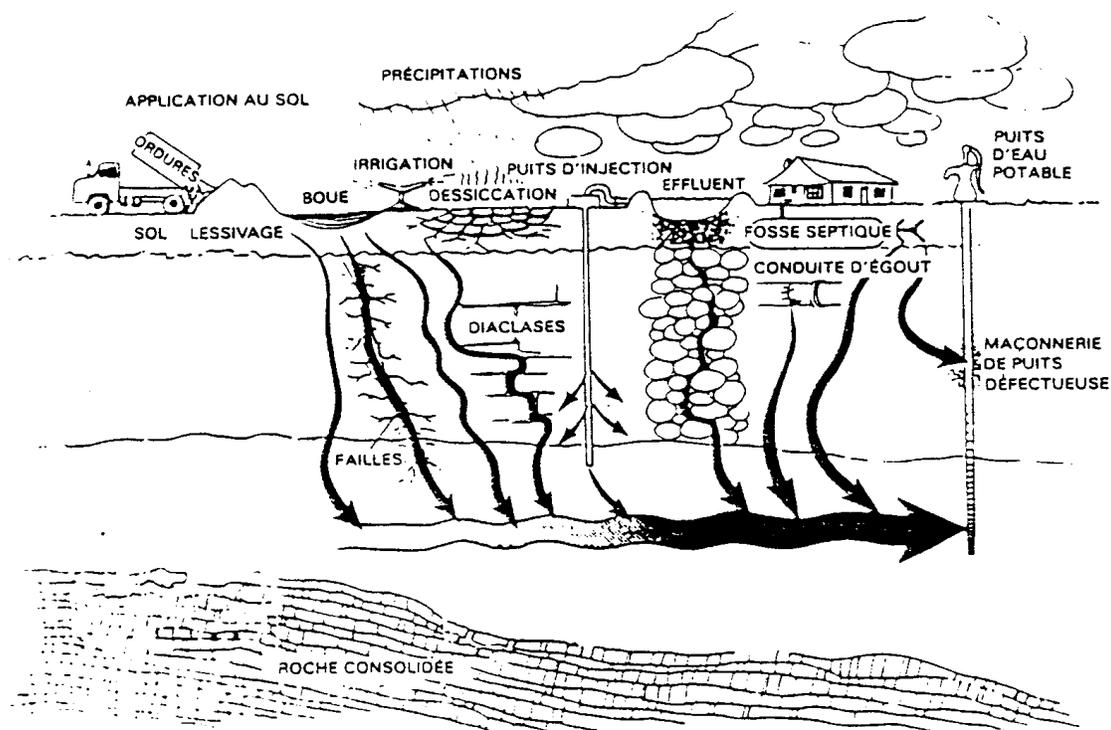


Figure 9

**Facteurs et voies de contamination des eaux souterraines par des virus entériques
(d'après RAO *et al.*, 1986)**

La migration des virus dans les sols est sous la dépendance d'un certain nombre de facteurs dont le rôle est plus ou moins important (Tableau 39)

Tableau 39
Facteurs influençant la migration des virus dans les sols
(d'après BITTON and GERBA,1984)

Facteurs	Commentaires
Type de sols	Les sols à fine texture retiennent les virus plus efficacement que les sols à texture légère. Les oxydes de fer augmentent la capacité d'adsorption des sols. Les sols boueux (muck soils) sont généralement de pauvres adsorbants.
pH	Généralement l'adsorption augmente quand le pH diminue.
Cations	L'adsorption augmente en présence de cations. Les cations facilitent la réduction des forces répulsives à la fois sur les virus et sur les particules de sol. L'eau de pluie peut désorber les virus à partir des sols du fait de sa faible conductivité.
Composés organiques solubles	Ils sont généralement en compétition avec les virus pour les sites d'adsorption. Les acides humiques et fulviques réduisent l'adsorption des virus sur les sols.
Type de virus	L'adsorption sur les sols varie avec les types et souches de virus. Les virus peuvent avoir différents points isoélectriques.
Vitesse de circulation de la suspension virale	Plus la vitesse est rapide, moins l'adsorption sur le sol est importante.

Le phénomène de migration peut être important soit à la suite de pluies intenses (KOWAL, 1982) à la suite d'un excès d'épandage sur les terres agricoles. En effet, alors que le taux normal d'application d'eau en irrigation est de 1 m³ d'eau par m² de sol et par an, certains taux de charge utilisés lors d'épandage peuvent atteindre 100 m³ par m² et par an.

En ce qui concerne la cinétique de migration des virus dans les sols, DIZER *et al.*, (1984) estiment que, si la vitesse d'infiltration de l'eau est de 0,50 mètre par jour, un maximum de 1 % des virus présents dans l'eau atteindra une profondeur de 80 cm après 50 jours. Par contre, si la vitesse d'infiltration de l'eau est de 5 mètres par jour, 1 % des virus atteindra une profondeur de 12 mètres au bout de 50 jours.

L'élimination des virus dépend en fait du type d'eau, de la nature du sol, de la vitesse d'infiltration et de la distance parcourue dans le sol comme l'indique le Tableau 40.

Tableau 40
Elimination des virus dans le sol
(d'après PETTYGROVE and ASANO, 1984)

TYPE DE VIRUS	NATURE DU LIQUIDE	NATURE DU SOL	VITESSE D'INFILTRATION	DISTANCE PARCOURUE	POURCENTAGE D'ELIMINATION (%)
Poliovirus type 1	Eau distillée 10 ⁻⁵ N sels de Ca et Mg	sable dunaire	1 à 2 ml/minute	20 cm	99,8 à 99,9
Poliovirus type 2	Eau distillée	low humic laterals	378 à 530 litres par jour et par pied	4 à 15 cm	96 à 99,3
Poliovirus type 2	Effluent secondaire d'eaux usées	gravier et sable		60 mètres	100
Virus Coxsackie	Eau de source	terre de jardin		91 cm	50
Virus entériques indigènes	Effluent secondaire d'eaux usées	terreau et sable		3 à 9 mètres	100

En fait, il apparaît que les sols à texture fine et les sols riches en argile retiennent mieux les virus que les sols à texture grossière et riches en sable ou en matière organique (SOBSEY *et al.*, 1995 ; SOBSEY & SHIELDS, 1987 ; SOBSEY *et al.*, 1986 ; GOYAL & GERBA, 1979). Ces derniers pourraient donc s'avérer de mauvais supports pour l'épandage de boues résiduaires urbaines.

Globalement, la mobilisation de la charge microbiologique contenue dans les boues est dépendante de plusieurs variables (CADILLON, 1994) :

- 7 le tonnage des boues par hectare,
- 7 le degré d'humidité de la boue,
- 7 les caractéristiques hydrodynamiques du sol et notamment son pouvoir filtrant : sa drainance doit être bonne mais sa perméabilité pas trop élevée. La vulnérabilité de la nappe sous-jacente est également à prendre en compte, ainsi que la protection de ressources en eau et l'existence de périmètres de protection autour des voies fréquentées et des habitations,
- 7 le degré de saturation en eau du sol, qui détermine les risques d'entraînement des micro-organismes,
- 7 le temps s'écoulant entre l'épandage et les premières pluies lessivantes et la mise en pâture du bétail.

En pratique des virus ont été effectivement isolés dans des eaux profondes situées à la verticale de champs de cultures maraîchères irriguées par des eaux usées. Ainsi, GOYAL *et al.*, (1984) ont isolé des virus entériques dans des puits dont la profondeur atteignait 27,5 m. Par contre, MOORE *et al.*, (1981) surveillant pendant trois ans un site d'irrigation par eaux usées, n'ont pas isolé de virus dans les eaux de puits mais seulement dans l'eau d'un lysimètre situés à 1,37 m de profondeur.

En fait, la migration des virus dans les sols et par voie de conséquence la contamination éventuelle des eaux souterraines dépend des caractéristiques du sol (nature, présence de fissures, degré de saturation en eau) des types de virus présents, de la pluviométrie. Mais il est important

de souligner que lorsque les virus ont atteint les eaux profondes, ils peuvent y survivre pendant des temps très longs notamment du fait des basses températures de ces milieux.

2. Devenir des virus entériques sur les végétaux

Dans les pays à climat aride ou dans les pays où les ressources en eau sont faibles, les eaux usées sont susceptibles d'être utilisées pour l'irrigation en agriculture. Or, ces eaux contiennent des quantités non négligeables de virus entériques (chapitre 2) qui risquent ainsi d'être transmis à l'homme, notamment par l'intermédiaire de produits agricoles contaminés.

L'irrigation de champs par ces eaux usées est une réalité à travers le monde et souvent elle est réalisée sur une large échelle. Ainsi, d'après BADAWY *et al.*, (1990) en Inde pendant l'année 1971 des fermes utilisaient en irrigation plus d'un million de m³ d'eau usée par jour. De même les eaux usées sont largement employées pour l'irrigation en Israël et en Afrique du Sud pour l'irrigation des champs, des forêts ou des parcs. Aux USA, ROSE (1986) indique que les Etats-Unis utilisent par jour près de 1 million de m³ d'effluent pour l'irrigation de cultures mais aussi de golfs, de parcs ou d'aires de jeux.

La réutilisation des eaux usées traitées ou non en agriculture est une pratique qui augmente régulièrement. Il est donc important de connaître le devenir de ces virus notamment sur les végétaux. Ceci ne peut être réalisé qu'avec des virus entériques susceptibles de se multiplier sur cultures cellulaires. En effet, la présence de génome viral ne témoigne pas de la présence de particules virales infectieuses.

L'analyse des travaux rapportés dans la littérature (Tableau 41) montre que les virus entériques peuvent survivre sur les végétaux irrigués par des eaux usées pendant des durées variables allant de quelques jours à près de 4 semaines selon les conditions (TIERNEY *et al.*, 1977 ; SADOVKI *et al.*, 1978 ; BADAWY *et al.*, 1990).

Tableau 41
Durée de survie des virus entériques sur les végétaux

VIRUS	LEGUMES	CONDITIONS	DUREE DE SURVIE (jours) (% de réduction)	REFERENCES
<i>Entérovirus</i>	Tomates	3-8°C	10 (90%)	BAGDASARYAN (1964)
<i>Poliovirus</i>	Radis	5-10°C	20 (99%)	BAGDASARYAN (1964)
<i>Poliovirus</i>	Tomates	22-25°C en serre	12	KOTT and FISHELSON (1974)
<i>Poliovirus</i>	Persil	15-31°C	2	KOTT and FISHELSON (1974)
<i>Poliovirus</i>	Laitue` Radis	Aspersion Été – automne	6	LARKIN <i>et al.</i> , (1976)
<i>Rotavirus</i>	Légumes	Stockage à température ambiante	25	BADAWY <i>et al.</i> , (1985)
<i>Poliovirus</i>	Turf grass	Irrigation 22°-41°C 4°-16°C	0,41 (99,8%) 1 (96%)	BADAWY <i>et al.</i> , (1990)
<i>Rotavirus</i>	Turf grass	Irrigation 22°-41°C 4°-16°C	0,41 (99,8%) 1 (99,5%)	

Une étude effectuée par WARD and IRVING (1987) sur des légumes irrigués par aspersion avec des eaux usées épurées et chlorées, artificiellement contaminées avec du *Poliovirus* 1 et des *Adénovirus* 6 a mis en évidence des durées de survie faibles (Tableau 42). Ainsi, en irriguant des laitues avec de l'eau usée contenant $3,9 \cdot 10^3$ U.I. L⁻¹ de *Poliovirus* 1, ils ne retrouvent pas de virus après 2 jours. Par contre sur des épinards, la durée de survie est plus longue puisqu'elle atteint 13 jours pour une contamination initiale du même ordre de grandeur.

En fait, la disparition des virus est rapide puisqu'en 24 heures il y a une réduction de 98,7 % des *Poliovirus* sur le céleri et de 96,4 % sur les tomates. Après 48 heures, l'abattement est de 99,7 % sur le céleri et les tomates, de 97,6 % sur les épinards et supérieur à 99 % sur les laitues. Il en est de même avec les *Adénovirus* puisque, sur des laitues irriguées avec des eaux contenant $1,9 \cdot 10^4$ *Adénovirus* par litre aucun virus n'est retrouvé après 24 heures.

A côté de la nature du légume envisagé, il apparaît que deux facteurs ont une influence fondamentale sur la durée de survie des virus sur les végétaux après irrigation. Il s'agit du niveau de contamination initiale et de la température associée à l'ensoleillement.

Tableau 42 - Durée de survie du *Poliovirus 1* et de l'*Adénovirus 6* sur des légumes (d'après WARD and IRVING, 1987)

LEGUMES	CONCENTRATION VIRALE DANS L'EAU D'IRRIGATION U.I. L ⁻¹	NOMBRE DE JOURS APRES IRRIGATION	VIRUS DETECTES SUR LES LEGUMES (U.I. 10kg ⁻¹)	MOYENNE DES TEMPERATURES		HAUTEUR DES PRECIPITATIONS (en mm et cumulatif)
				Maximales (°C)	Minimales (°C)	
Céleri	4,8.10 ³ <i>Poliovirus 1</i>	0	449			
		1	6	29,3	10,3	0
		2	1	32,9	12,1	0
		4	1	27,8	14,5	0,9
Epinards	9,4.10 ³ <i>Poliovirus 1</i>	0	3887			
		2	93	12,8	7,8	6,4
		5	6	13,3	6,5	10,8
		7	3	13,7	6,6	10,8
		9	ND**	14,5	7,3	10,8
		13	1	14,2	7,7	60,6
Laitue	3,9.10 ³ <i>Poliovirus 1</i>	0	440			
		2	ND	16,0	9,7	0,8
		6	ND	15,9	9,1	16,2
Tomate	2,6.10 ⁵ <i>Poliovirus 1</i>	0	12287			
		1	442	19,7	18,5	0,8
		2	35	20,4	14,3	7,8
		4	166	18,8	12,2	31,6
		6	14	19,5	11,5	31,6
Tomate	5,1.10 ² <i>Poliovirus 1</i>	0	11			
		1	ND	27,9	13,9	0
		2	ND	26,4	15,1	0
Laitue	1,9.10 ⁴ <i>Adénovirus 6</i>	0	6038			
		1	ND	24,9	17,4	0
		2	ND	21,4	12,2	33,6

*U.I. : Unités Infectieuses

**ND : Non Détecté

Ainsi, les durées de survie de 18 et 23 jours rapportées respectivement par GRIGOR'EVA *et al.*, (1965) et par TIERNEY *et al.*, (1977) sont obtenues sur des légumes arrosés avec des eaux usées contenant de $2,5 \cdot 10^8$ à $1 \cdot 10^{13}$ U.I. L⁻¹. Au contraire WARD and IRVING (1987) observent des durées de survie allant de 1 à 13 jours maximum si l'eau d'irrigation contient seulement entre $5,1 \cdot 10^2$ et $2,6 \cdot 10^5$ U.I. L⁻¹ de *Poliovirus* de type 1.

En ce qui concerne l'influence de la température et de l'ensoleillement les résultats des travaux réalisés par BADAWEY *et al.*, (1990) sur de l'herbe irriguée par des effluents secondaires provenant d'une station de traitement d'eaux usées artificiellement contaminées par du *Poliovirus* 1 et du *Rotavirus* SA11 sont tout à fait révélateurs. Ils montrent que, pendant l'été la concentration en *Rotavirus* et en *Poliovirus* est réduite de respectivement 99,7 % et 98% après 8 heures, la température variant de 22 à 41°C. Pendant l'hiver, ces pourcentages de réduction ne sont pas atteints même après 24 heures. Or, la température varie alors entre 4° et 16°C (Tableau 43).

D'autres travaux ont nettement mis en évidence l'influence de la température sur la survie des virus. Ainsi, KOTT and FISHELSON (1974) constatent, sur des tomates contaminées avec du *Poliovirus*, une survie virale de 12 jours à 22-25°C et de 5 jours à 37°C. Les conclusions sont identiques si l'on étudie les expériences de WARD and IRVING (1987) puisque, pour une dose contaminante à peu près identique (10^3 U.I. L⁻¹ de *Poliovirus*) sur du céleri, la durée de survie est de 4 jours lorsque la température maximale varie entre 27,8°C et 32,9°C, alors qu'elle atteint 13 jours lorsque la température maximale oscille entre 12,8°C et 14,2°C. Il est donc clair, que plus la température est basse, plus la survie est longue. Cette observation est d'ailleurs confirmée par des expériences de stockage de légumes en chambre froide à +4°C à l'abri de la lumière et en atmosphère humide. En effet, dans ces conditions de conservation, la durée de survie des *Poliovirus* de type 1 est très longue puisque sur des céleris contenant 926 U.I. 10kg⁻¹ le 1^{er} jour de stockage, 217 U.I. 10kg⁻¹ sont encore présents après 40 jours et 12 U.I. 10kg⁻¹ après 76 jours de maintien à +4°C (WARD et IRVING, 1987).

ASANO and SAKAJI (1990) ont tenté de prévoir sur un plan global la durée de survie des virus dans l'environnement en fonction du temps de séjour. Leur estimation indiquée dans le

tableau 44 permet d'avoir une vue synthétique sur la question, cependant, il est nécessaire de garder en mémoire que la résistance des virus entériques dans l'environnement varie en fonction de la température et du type de virus.

Tableau 43

Pourcentage de réduction des virus entériques sur l'herbe en fonction du temps
(D'après BADAUWY *et al.*, 1990)

Durée / Température	<i>Poliovirus 1</i>		<i>Rotavirus SA11</i>		Phage MS₂	
	Eté	Hiver	Eté	Hiver	Eté	Hiver
1 heure	24%		26%	-	-	-
3 heures	40%		90%	-	-	-
6 heures	82%	28%	98,9%	73%	95%	38%
8 heures	98%		99,7%		98%	
10 heures	99,8%		99,8%		99,8%	-
11 heures	>99,999%		99,9%			
12 heures		52%		86%		95%
16 heures		79%		99%		99,8%
24 heures		96%		99,5%		99,99%
40 heures		99,6%		>99,999%		99,99999%

**Tableau 44 - Prévision de survie des virus dans l'environnement en fonction du temps
(D'après ASANO and SAKAJI, 1990)**

DUREE (Jours)	PROPORTION DE VIRUS RESTANTE
1	0,5
3,3	0,1
6,7	0,01
10	0,001
13,4	10^{-4}
16,7	10^{-5}
20	10^{-6}
23	10^{-7}
27	10^{-8}
30	10^{-9}

En conclusion, il faut être parfaitement conscient que, même dans les régions au climat très chaud tels que l'Arizona (USA) il faut plus de 6 heures pour obtenir une réduction de 2 log de la contamination en *Entérovirus* et *Rotavirus*. Ceci signifie par exemple que, en cas d'irrigation d'un golf avec des eaux usées le matin, des virus entériques sont susceptibles d'être encore présents lorsque les joueurs seront sur le parcours dans la journée. La même situation peut d'ailleurs être retrouv e au niveau des pelouses irrigu es dans des parcs publics. Dans les 2 cas les joueurs ou les enfants sont susceptibles d'être en contact avec des virus entériques.

Par ailleurs, en ce qui concerne les légumes, il est clair, et ceci a été bien confirmé par CROCI *et al.*, (1991), que les végétaux irrigu es durant leur culture avec de l'eau contamin e retiennent des quantités non négligeables de virus entériques à leur surface. De plus, le stockage à +4 C non seulement n'accélère pas l'inactivation virale mais au contraire la ralentit. Il est donc extrêmement important de disposer de cultures maraîchères sans virus au moment de la récolte.

Références

- ASANO T. and SAKAJI R.H. (1990). Virus risk analysis in wastewater reclamation and reuse. In "Chemical water and wastewater treatment, HAHN H.H. and KLUTE R., ed., Springer Verlag, Berlin.
- BADAWY A.S., GERBA C.P. and KELLEY L.M. (1985). Survival of *Rotavirus* SA11 on vegetables. Food. Microbiol., **2**, 199-205.
- BADAWY A.S., ROSE J.B. and GERBA C.P. (1990). Comparative survival of enteric viruses and coliphage on sewage irrigated grass. J. Environ. Sci. Health, **A25**, 937-952.
- BAGDASARYAN G.A. (1964). Survival of viruses of the enterovirus group (Poliomyelitis, Echo, Cocksackie) in soil and on vegetables. J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol., **8**, 495-505.
- BALES R.C., LI S., MAGUIRE K.M., YAHYA M.T. and GERBA C.P. (1993). MS2 and *Poliovirus* transport in porous media : hydrophobic effects and chemical perturbations. Water Resources Res., **29**, 957-963.
- BASTOS R.K.X. and MARA D.D. (1995). The bacterial quality of salads crops drip and furrow irrigated with waste stabilization pond effluent : an evaluation of the WHO guidelines, Wat. Sci. Technol., **31**, 425-430
- BASTOS R.K.X. and MARA D.D. (1995). The bacterial quality of salads crops drip and furrow irrigated with waste stabilization pond effluent : an evaluation of the WHO guidelines, Wat. Sci. Technol., **31**, 425-430
- BITTON G. and GERBA C.P. (1984). Ground water pollution Microbiology. John Wiler Publ., New-York.
- BITTON G., PANCORBO O.C. and FARRAH S.R. (1984). Virus transport and survival after land application of sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol., **49**, 905-909.
- BLANC R. and NASSER A. (1996). Effect of effluent quality and temperature on the persistence of viruses in soil. Wat. Sci. Tech., **33**, 237-242.
- BOUTIN P. (1982). Risques sanitaires provenant de l'utilisation d'eaux polluées ou de boues de stations d'épuration en agriculture, T.S.M. - L'Eau, **12**, 547-557
- CADILLON M. (1994). La valorisation des boues de stations d'épuration pour le reboisement en contexte méditerranéen, *In* "les boues des stations d'épuration urbaines". Session de formation continue - Paris 7/10 novembre 1994. E.N.G.R.E.F., Cemagref (Ed), 295 p, 251-266
- COLLINS C.H. and KENNEDY D.A. (1992). The microbiological hazards of municipal and clinical wastes - a review. J. Appl. Bact., **73**, 1-6
- CROCI L., FIORE A., DE MEDICI D. and TAUTI L. (1991). Persistence of *Escherichia coli* an

Poliovirus 1 in contaminated vegetables. Microbiologie-Aliments-Nutrition, **9**, 257-262.

DAMGAARD-LARSEN S., JENSEN K.O., LUND E. and NISSEN B. (1977) Survival and movement of enterovirus in connection with land disposal of sludges. Wat. Res., **11**, 503-508.

DEPORTES I., BENOITGUYOD J.L. and ZMIROU D. (1995). Hazard to man and the environment posed by the use of urban waste compost : a review, Sci. Total Environ, **172**, 197-222

DIZER H., NASSER A. and LOPEZ J.M. (1984). Penetration of different human pathogenic viruses into sand column percolated with distilled water, groundwater or wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 409-415.

DUBOISE S.M., MOORE B.E. and SAGIK B.P. (1976). Poliovirus survival and movement in a sandy forest soil. Appl. Environ. Microbiol., **31**, 536-543.

GANTZER C., LEVI Y. and SCWHARTZBROD L. (1996). Effects of heat on the survival of infectious *Coxsackievirus* B3 and its genome in water. Zbl. Hyg. Umwelt, **199**, 76-83.

GERBA C.P., POWELSON D.K., YAHYA M.T., WILSON L.G. and AMY G.L. (1991). Fate of viruses in treated sewage effluent during soil aquifer treatment designed for wastewater. Reclamation and reuse. Wat. Sci. Technol., 2495-102

GOYAL M.S., KESWICK H.B. and GERBA C.P. (1984). Viruses in groundwater beneath sewage irrigated cropland. Wat. Res., **18**, 299-302.

GOYAL S.M. and GERBA C.P. (1979). Comparative adsorption of human *Enteroviruses*, simian *Rotavirus* and selected bacteriophages to soils, Appl. Environ. Microb., **38** (2), 241-247

GRIGOR'EVA L.V., GORODETSKII A.S., OMEL'YANETS T.G. and BOGDANENKO L.A. (1965). Survival of bacteria and viruses on vegetable crops irrigated with infected water. Hyg. Sanit., **30**, 357-361.

HRUDEY S.E., HRUDEY E.J. and LOW N.J. (1992). Health effects associated with waste treatment, disposal and reuse. Wat. Environ. Res., **64**, 593-599

HURST C.J. (1988). Proc. International conference on water and wastewater microbiology. Newport Beach.

HURST C.J., GERBA C.P., LANCE J.C. and RICE R.C. (1980a). Survival of enteroviruses in rapid-infiltration basins during the land application of wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **40**, 192-200.

HURST C.J., GERBA C.P. and CECH I. (1980b). Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. Appl. Environ. Microbiol., **40**, 1067-1079.

JANSONS J., EDMONDS L.W., SPEIGHT B. and BUCENS M.R. (1989). Movement of viruses after artificial recharge. Wat. Res., **23**, 293-299.

KOTT H. and FISHELSON L. (1974). Survival of enteroviruses on vegetables irrigated with chlorinated oxydation pond effluents. Israel J. Tech., **12**, 290-297.

KOWAL E. (1982). Health effects of land treatment : Microbiologica. United States Environmental Protection Agency. Health effect research laboratory, Cincinnati, OH 45268, 26.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M. and PENELLO W.F. (1980). Poliovirus retention in 75 cm soil cores after sewage and rainwater application. Appl. Environ. Microbiol., **40**, 1032-1038.

LARKIN E.P., TIERNEY J.T. and SULLIVAN R. (1976). Persistence of virus on sewage irrigated vegetables. J. Am. Soc. Civ. Engrs. Envir. Engng. Riv., **102**, 29-35.

LEFLER E. and KOTT H. (1974). Virus retention and survival in sand. In "Virus survival in water and wastewater systems". MALINA J.F. and SAGIK B.P., ed., Center for research in water resources. Austin, Texas.

MESCHKE J.S. and SOBSEY M.D. (1998). Comparative adsorption of *Norwalk virus*, *Poliovirus* 1 and F+ RNA, coliphage MS₂ to soils suspended in treated wastewater. Wat. Sci. Tech., **38**, 187-189.

MOORE B.E., SAGIK B.P. and SORBER C.A. (1981). Viral transport to ground water at a wastewater land application site. J. Water. Pollut. Control. Fed., **53**, 1492-1502.

PETTYGROVE G.S. and ASANO T. (1984). Irrigation with reclaimed municipal wastewater. A guidance manual. Lewis. Inc. ed.

RAO V.C., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1986). Virus humains dans les sédiments, les boues et les sols. Bull. O.M.S., **64**, 341-356.

ROSE J.B. (1986). Microbial aspects of wastewater reuse for irrigation. CRC Crit. Rev. Environ. Contr., **16**, 231-256.

SOBSEY M.D. and SHIELDS P.A. (1987). Survival and transport of viruses in soils : model studies, In "Human viruses in sediments, sludges and soils", V.C. RAO and J.L. Melnick (Ed), pp 155-177. CRC Press, Boca Raton, FL

SOBSEY M.D., HALL R.M. and HAZARD R.L. (1995). Comparative reductions of HAV, *Enteroviruses* and coliphage MS₂ in miniature soil columns, Wat. Sci. Technol., **31**, 203-209

SOBSEY M.D., SHIELDS P.A., HAUCHMAN F.H., HAZARD R.L. and CATON L.W. (1986). Survival and transport of hepatitis A virus in soil, grounwater and wastewater, Wat. Sci. Technol., **18** (10), 97-106

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1992). Persistence of viruses in desert soils amended with anaerobically digested sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol., **58**, 636-641.

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1995). Comparision of PCR and cell culture for detection of *Enteroviruses* in sludge-amended field soils and determination of their transport

, Appl. Environ. Microbiol., **61**, 2066-2068

TIERNEY J.T., SULLIVAN R. and LARKIN E.P. (1977). Persistence of poliovirus I in soil and on vegetables grown in soil previously flooded with inoculated sewage sludge or effluent. Appl. Environ. Microbiol., **33**, 109-113.

WARD B.K. and IRVING L.G. (1987). Virus survival on vegetables spray-irrigated with wastewater. Wat. res., **21**, 57-63.

WEKERLE J. (1986). Agricultural use of sewage sludges as a vector for transmission of viral disease. In "Epidemiological studies of risk associated with the agricultural use of sewage sludge : Knowledge and needs". BLOCK J.C., HAVELAAR A.H. and L'HERMITE P. ed. Elsevier Applied Science. London.

YEAGER J.G. and O'BRIEN R.T. (1979). Enterovirus inactivation in soil. Appl. Environ. Microbiol., **38**, 694-701.

Chapitre 7

Virus et Coquillages

Des isollements répétés de virus entériques à partir de fruits de mer ont apporté la preuve que des coquillages élevés en eau de mer insalubre étaient susceptibles d'être contaminés par des virus pathogènes pour l'homme.

1. Contamination des coquillages

Les virus, comme toute particule ingérable par des bivalves, sont d'abord fixés au niveau du mucus bronchial et DI GIROLAMO *et al.*, (1977) ont bien montré que les liaisons virus - mucus s'établissent très rapidement et que l'adsorption du virus est inversement proportionnelle à la salinité de l'eau.

La fixation des virus, par un coquillage physiologiquement actif, est un phénomène très rapide. Ainsi, avec une contamination de 10^3 virus par ml d'eau de mer, MITCHELL *et al.*, (1966) observent une concentration virale 27 fois plus élevée, dans les huîtres que dans l'eau après 1 heure. De même, GAILLOT *et al.*, (1988) montrent que l'adsorption des virus est maximale après 1 heure de séjour dans l'eau contaminée par du *Poliovirus* type 1 puis qu'elle décroît et se stabilise après 3 heures de séjour.

Les expériences de contamination menées sur plusieurs jours, dans une eau de mer dont la concentration en *Poliovirus* est considérée comme constante, montrent l'existence d'un cycle de bioaccumulation-relargage (GAILLOT *et al.*, 1988), conduisant à un équilibre dans la quantité de virus présente dans les coquillages (LANDRY *et al.*., 1982).

L'importance de la bioaccumulation des virus dépend, de l'intensité de l'activité de filtration du coquillage (c'est-à-dire de son état physiologique et des paramètres physico-chimiques de l'eau), mais aussi :

- du type de coquillage,
- de l'état du virus (libre ou adsorbé sur des particules),
- de la quantité de virus dans l'eau,
- de la température de l'eau.

- le type de coquillage et ses particularités anatomiques influent grandement sur la quantité de virus retenus : les coquillages dits "fouisseurs" (coques, palourdes, clams, praires) vivent dans le sable, qui est un réservoir de micro-organismes et on conçoit aisément que ceux-ci se contaminent plus facilement que les huîtres ou les moules qui sont en pleine eau. De plus, DI GIROLAMO *et al.*, (1975) a démontré qu'il existe des différences entre les espèces pour la bioaccumulation des virus : environ 86 % des *Poliovirus* ajoutés dans l'eau de mer sont concentrés en 48 heures par *Crassostrea gigas* (huître creuse) et en 12 heures seulement par *Ostrea lurida* (huître plate).

- l'état du virus joue un rôle important ; ainsi plusieurs études ont montré que les virus en suspension parmi des débris cellulaires (suspension brute) ou associés à un support particulaire étaient accumulés plus efficacement par les coquillages, que sous leur forme libre. METCALF *et al.*, (1979) ont obtenu des taux d'accumulation plus élevés lorsque le *Poliovirus* est associé à un support particulaire (fèces ou kaolinite) que lorsqu'il est libre. De même, BARON (1986) a constaté que le *Poliovirus* purifié n'était pas accumulé par les huîtres, mais qu'après fixation des virus sur un support phytoplanctonique (algues unicellulaires), l'accumulation virale se produisait à un taux élevé.

- la quantité de virus présents entre en jeu et dans tous les cas, on observe de plus forts taux d'accumulation, lorsque la quantité de virus dans l'eau de mer est élevé. Toutefois, il y a probablement une quantité limitée de sites d'adsorption pour les virus sur le mucus branchial. Cette hypothèse, émise par DI GIROLAMO *et al.* (1977) est reprise par BEDFORD *et al.* (1978) qui estiment à 4.10^{10} le nombre maximum de particules adsorbables par une huître creuse.

La plupart des études sur la bioaccumulation ont été menées avec des concentrations virales élevées de l'ordre de 10^1 à 10^4 par ml d'eau de mer, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la rétention virale par les coquillages. Cependant, METCALF *et al.*, (1979) ont

mené une étude avec des valeurs proches des conditions naturelles, c'est-à-dire avec des concentrations allant de 0,09 à 14 *Poliovirus* mL⁻¹ (libres ou associés à un support). Ils constatent que le facteur de bioaccumulation des virus dans les tissus est compris entre 19 et 34, lorsque l'eau contient 0,2 virus mL⁻¹ associés à des fèces.

LANDRY et al., (1982) ont travaillé également avec du *Poliovirus* type 1, mono-dispersé ou associé à des fèces, à des concentrations de 0,002 à 0,18 UFP mL⁻¹ et ils montrent qu'aucun virus n'est détecté si la contamination est inférieure à 0,01 UFP mL⁻¹ d'eau.

En fait la rétention virale par les fruits de mer et le facteur d'accumulation des virus varient dans de fortes proportions comme l'indiquent les résultats rapportés dans le tableau 45.

Tableau 45 - Rétention virale par les fruits de mer (d'après BOHER, 1991)

Coquillages	Nature du virus	Contamination virale de l'eau (UFP mL ⁻¹)	Durée d'exposition à la contamination (heures)	Contamination virale des tissus (UFP g ⁻¹)	Facteur d'accumulation UFP g ⁻¹ de tissu UFP mL ⁻¹ d' eau	Références
Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	<i>Poliovirus</i> type 1	10 ³	1	2,7 10 ⁴	27	MITCHELL <i>et al.</i> , (1966)
		≈ 10 ³	2	3,9 10 ⁴	39	
		≈ 2 10 ³	3	5,01 10 ⁴	25	
		≈ 1,2 10 ³	4	3,9 10 ⁴	32,5	
		≈ 1,2 10 ³	8	3,9 10 ⁴	32,5	
		≈ 1,2 10 ³	12	7 10 ⁴	58,3	
		≈ 1,2 10 ³	24	2,8 10 ⁴	23,3	
		2,5 10 ²	1	9 10 ²	3,6	
		≈ 3 10 ²	2	4 10 ³	13,3	
		≈ 3 10 ²	3	6 10 ³	20	
		≈ 2 10 ²	4	6,5 10 ³	32,5	
		≈ 10 ²	8	6,5 10 ³	65	
		≈ 2 10 ²	12	4,5 10 ³	22,5	
		≈ 2 10 ²	24	4 10 ³	22,5	
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)		≈ 3,1 10 ³	12	4,6 10 ³	1,4	DI GIROLAMO <i>et al.</i> , (1975)
		≈ 1,5 10 ³	24	≈ 3,9 10 ³	2,6	
		≈ 10 ³	48	≈ 9 10 ³	9	
Huîtres (<i>Ostrea lurida</i>)		≈ 1,5 10 ³	12	8,6 10 ³	5,7	
		≈ 3,9 10 ²	24	104	25	
		≈ 10 ³	48	104	10	
Clams (<i>Mya arenaria</i>)	<i>Poliovirus</i> type 1 naturellement associé à des fèces	0,2	6	≈ 5	25	METCALF <i>et al.</i> , (1979- 1980a)
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i> ou <i>virginica</i>)	<i>Poliovirus</i> monodispersé	10,9	48	1,67	/	LANDRY <i>et al.</i> , (1982)
		0,044	48	0,04	1	
	≈ 1,45	48	0,01	/		
	≈ 0,96	120	0,03	/		
	≈ 0,12	144	0,6 10 ⁴	/		
<i>Poliovirus</i> type 1 Naturellement associé à des fèces	< 0,1	216 et +	ND	/		

Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	<i>Poliovirus type 1</i>	390	1	64	/	GAILLOT <i>et al.</i> , (1988)
		390	2	29	/	
		64	3	14	/	
		64	4	22	/	
		71	5	26	/	
		71	6	14	/	
	638	1	628	/		
	165	1	109	/		
	52	1	5	/		
	8	1	2	/		
3	1	0,5	/			
	<i>Poliovirus type 1</i> + effluents bruts préalablement décontaminés par la chaleur	5 10 ² à 5 10 ³	24	≈ 1,2 10 ²	/	POWER et COLLINS (1989)
	<i>Rotavirus</i> Simien SA 11	≈ 3,5 10 ³	1	≈ 4,3 10 ³	1,2	BERIL and SCHWARTZBROD (1989)
Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	<i>Poliovirus type 1</i>	20	48 à 72	1,9 ± 1,3	/	BEMISS <i>et al.</i> , (1989)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)		20	48 à 72	21,5 ± 10,3	1,1	
Clams (<i>Merceneria merceneria</i>)		10	48 à 72	25,9 ± 12,3	2,5	
(<i>Mya arenaria</i>)		10 à 100	48 à 72	11,68 ± 0,34	/	

/ pas d'accumulation

En ce qui concerne la localisation des virus au niveau des coquillages il apparaît qu' après 2 à 4 heures de séjour dans l'eau contaminée, les virus se répartissent, pour la quasi-totalité dans la glande digestive (METCALF et al., 1980b). Ainsi BARON (1986) a retrouvé, après 30 minutes de contamination, plus de 99 % des *Poliovirus* absorbés dans le tube digestif de l'huître.

POWER and COLLINS (1990) ont constaté, que 89 % de la quantité totale de coliphages retenus par une moule, sont présents dans son tractus digestif après 48 heures d'exposition à la contamination. Le tube digestif est d'ailleurs le seul organe où il y a concentration de micro-organismes. Les autres parties du corps (branchies, manteau, pied...) ne reflètent qu'un taux de contamination proche de celui de l'eau environnante. D'après ces auteurs, la détection de coliphages dans l'hémolymphe de la moule, expliquerait le fait que les contaminants peuvent être répartis dans les tissus.

DI GIROLAMO et al., (1975) ont observé la distribution des *Poliovirus* dans le corps de l'huître creuse au cours du temps : après 25 heures d'exposition à la contamination, 96 % des virus sont dans le tube digestif, 2,6 % dans la partie manteau, branchies, liquide intervalvaire et 0,5 % dans le reste du corps (muscle, coeur...). Après 48 heures, 16 % des virus sont passés dans les tissus. Il pourrait donc y avoir une diffusion progressive des virus du tractus digestif vers les tissus périphériques notamment en cas de forte contamination.

L'étude de la répartition des particules virales à l'intérieur du corps du mollusque est très utile pour expliquer les temps de rétention, car les contaminants présents dans le tube digestif sont vraisemblablement plus rapidement éliminés par les fèces que ceux présents dans le reste du corps.

Par ailleurs, sur le plan technique la connaissance de cette répartition est importante. En effet, lors de l'analyse des coquillages, l'extraction des virus est réalisée classiquement à partir de la chair totale des coquillages. Cependant, compte-tenu du fait qu'il a été confirmé que la grande majorité des virus étaient concentrés dans le tube digestif (METCALF *et al.*, 1980b ; SCHWARB *et al.*, 1998), plusieurs auteurs ont proposé d'extraire les virus seulement à partir des tissus digestifs, ce qui présente l'intérêt (SUGIEDA *et al.*, 1996 ; ATMAR *et al.*, 1995) d'une part,

d'éliminer des tissus contenant souvent des quantités importantes d'inhibiteurs, d'autre part de réaliser l'analyse sur un plus grand nombre d'individus.

Des virus ont ainsi été détectés dans de nombreux coquillages prélevés dans des sites naturels (Tableau 46).

Tableau 46
Coquillages et virus entériques

Localisation	Coquillages	Virus	% d'échantillons positifs	References
Sites commerciaux	Huîtres	<i>Entérovirus</i>	25%	GOYAL <i>et al.</i> , 1979
France	Coques et moules	HAV	72%	CRANCE <i>et al.</i> , 1995
Angleterre Zones insalubres	Coquillages	NLV	21%	LEES <i>et al.</i> , 1995
Angleterre Sur les marchés	Coquillages	NLV	8%	LEES <i>et al.</i> , 1995
Sites pollués interdits pour la récolte de coquillages	Huîtres	Virus entériques infectieux	52%	CHUNG <i>et al.</i> , 1996
Caroline du Nord (USA)	Huîtres	HAV	6%	CHUNG <i>et al.</i> , 1996
Après épuration	Huîtres	SRSV	63% (hiver) 6% (été)	DORE <i>et al.</i> , 1998
Sites occasionnellement contaminés	Huîtres	HAV	0%	LE GUYADER <i>et al.</i> , 1998
		SRSV	27%	
		<i>Rotavirus</i>	33%	
		<i>Entérovirus</i>	20%	
Espagne	Coquillages	<i>Adeno</i>		PINA <i>et al.</i> , 1998
		<i>Entero</i>		
Sites fréquemment contaminés avec FC et <i>Salmonella</i>	Moules	HAV	14,6%	LE GUYADER <i>et al.</i> , 1998
		<i>Rotavirus</i>	65,8%	
		<i>Entérovirus</i>	63,4%	
		SRSV	51%	
Mer Adriatique	Moules	HAV	13%	CROCI <i>et al.</i> , 1999
Hong-Kong	Moules	HAV	12%	LEE <i>et al.</i> , 1999
France Zones insalubres	Moules	NLV	35%	LE GUYADER <i>et al.</i> , 2000
	Huîtres	NLV	23%	
France Zones insalubres	Coquillages	<i>Rotavirus</i>	Présence	LE GUYADER <i>et al.</i> , 2000
France		<i>Astrovirus</i>		

HAV : Virus de l'Hépatite A

SRSV : Small Round Structured Virus

Il a été en particulier noté que les *Calicivirus* manifestaient une prévalence saisonnière dans les huîtres (DORE *et al.*, 1998) avec 63 % d'échantillons contaminés en hiver et seulement 6 % en été. Il en est d'ailleurs de même pour les bactériophages à ARN F-spécifiques. Il a aussi été rapporté (HENSHILWOOD *et al.*, 1998) que beaucoup d'échantillons d'huîtres contenaient plus d'une souche de *Calicivirus* et que 42 % des échantillons contenaient à la fois des *Calicivirus* des génogroupes I et II.

2. Persistance des virus dans les coquillages

Lorsque des coquillages ont été contaminés par des virus entériques, ceux-ci ne peuvent en aucun cas s'y multiplier, car ils ne trouvent pas de cellules sensibles qui permettent leur multiplication. Par conséquent, la population virale initiale ne peut que se maintenir ou décroître sous l'effet de l'environnement physique ou chimique.

La persistance des virus pendant l'immersion des coquillages dépend de l'activité physiologique du coquillage et du milieu environnant, notamment du niveau de pollution virale de l'eau de mer. Cette persistance est très variable et peut être longue. Ainsi METCALF and STILES (1965) rapportent la persistance, pendant une période supérieure à 60 jours, de virus *Coxsackie* B2 dans des huîtres stockées durant les mois d'hiver et de printemps dans de l'eau d'estuaire (entre 1 et 10° C). De même, il a été constaté que le génome du virus de l'hépatite A persistait dans des moules placées en Méditerranée au moins 23 jours (SCHWARTZBROD *et al.*, 1990).

Lorsque les températures sont basses, les huîtres sont en activité ralentie et filtrent peu d'eau. Ces conditions favoriseraient donc la rétention des micro-organismes. Cela pourrait expliquer partiellement pourquoi les cas de gastro-entérites et d'hépatite A surviennent principalement en hiver et au début du printemps.

Si les virus sont susceptibles de persister longtemps pendant l'immersion des coquillages dans l'eau de mer il a été montré aussi qu'au cours du stockage soit à l'état frais, soit à l'état congelé les virus peuvent persister dans les coquillages.

TIERNEY *et al.* (1982) observent qu'il n'y a pas de réduction du titre de *Poliovirus*, à partir d'huîtres expérimentalement contaminées, après 28 jours de stockage à + 5° C (cette durée est considérée comme étant la plus longue entre la récolte et la consommation). Ceci confirme une étude précédente de METCALF and STILES (1965) qui avaient obtenu le même résultat avec du virus *Coxsackie* B2. Il en est de même après congélation puisque dans des huîtres creuses congelées

à -17,5° C, 91 % du *Poliovirus* contaminant a été trouvé encore infectieux après 2 semaines de stockage, 40 % après 6 semaines et 10 % après 12 semaines (DI GIROLAMO *et al.* - 1970).

FUGATE *et al.* (1975) ont isolé du *Poliovirus* type 1 dans des huîtres importées congelées du Japon. Par ailleurs, des coquillages qui avaient été congelés pendant 15 semaines avant la consommation ont été capables de provoquer une épidémie de gastroentérite à virus de Norwalk (LINCO and GROHMANN,1980).

3. Décontamination des coquillages

Dans de nombreux pays il a été proposé de soumettre les coquillages à des traitements de décontamination afin d'en éliminer les microorganismes. Ces systèmes sont fondés sur l'immersion dans de l'eau de mer de bonne qualité ou ayant subi des traitements de désinfection. Ceux-ci peuvent être réalisés par action des hypochlorites, du chlore, des iodophores, de l'ozone ou des rayons ultra-violets.

Si la chloration est la technique la plus ancienne, il a été constaté que le chlore, même à faible concentration (0,1 mg l⁻¹) était susceptible d'affecter les activités de filtration (GALTSOFF, 1946), c'est pourquoi, habituellement, le chlore libre est éliminé par action du thiosulfate de sodium et par passage de l'eau sur charbon actif.

L'ozonation est aussi appliquée à la désinfection de l'eau utilisée en décontamination (FAUVEL *et al.*, 1982) mais, étant donné la toxicité de l'ozone pour les coquillages, l'eau traitée doit être vigoureusement aérée avant introduction dans le circuit de dépuración.

Les rayons ultra-violetts sont aussi capables de détruire les virus dans l'eau et de ce fait sont utilisés dans les processus de décontamination (CHANG *et al.*, 1985). Cependant, ils ne sont efficaces que si l'eau présente une très faible turbidité.

Les différents systèmes utilisés pour la décontamination font appel à plusieurs procédés :

- Circulation d'eau de mer fraîche, donc renouvelée en permanence, à travers une cellule de stockage des mollusques. Dans ce cas, si l'eau de mer est de qualité microbiologique convenable, il n'est pas indispensable de procéder à une désinfection préalable de l'eau.
- Circulation d'eau de mer en circuit fermé à travers la cellule de stockage des coquillages. Il est alors impératif de procéder à une désinfection de l'eau pour éviter la recontamination des mollusques.
- Maintien des mollusques dans des bassins de grand volume d'eau de mer. Dans ces conditions, il est nécessaire de remplir les bassins avec de l'eau de mer de qualité microbiologique correcte ou avec de l'eau préalablement désinfectée et de renouveler l'eau plusieurs fois au cours de la période de décontamination.

La durée du traitement, variable selon les pays, est en général comprise entre 24 et 72 heures.

Différentes études ont été menées pour évaluer l'efficacité des techniques de dépuración quant à l'élimination des microorganismes. La majorité des expérimentations a été menée dans des bassins remplis d'eau, traitée en continu par les rayons U.V. (RICHARDS, 1988). Le tableau 47 rassemble quelques données chiffrées sur l'efficacité de ce système d'épuración.

La comparaison des travaux effectués sur l'épuration est parfois difficile, car les données varient selon l'espèce de coquillage, le mode de contamination (naturel ou artificiel), le niveau de contamination initiale, le système d'épuration utilisé (système statique ou dynamique) etc.... Il ressort toutefois de ces études quelques points essentiels :

- le relargage des micro-organismes n'est obtenu que lorsque les conditions de l'environnement garantissent un bon état physiologique des coquillages. La décontamination des bivalves n'est en effet compatible qu'avec une bonne activité de filtration. C'est pourquoi, la concentration en oxygène dissous dans l'eau des bassins d'épuration doit être supérieure à 60-70 % de la saturation (supérieure à 5 mg l⁻¹) et la température la plus proche possible de 19°C (LIU *et al.*, 1967).

- La dépuration dépend aussi considérablement de la température de l'eau de mer. Ainsi, DORE *et al.*, (1998) montrent que le niveau de contamination d'huîtres riches en virus est réduit de 98% en 7 jours à 18°C alors qu'à 9° la réduction est seulement de 60%. L'influence de la température est encore plus claire avec des huîtres plus faiblement contaminées puisque à 18°C la dépuration est de 100 % en 2 jours alors qu'à 9°C, il faut 7 jours pour obtenir un abattement de seulement 85 %.

Tableau 47
Efficacité de l'épuration des coquillages
(eau traitée par les rayons U.V.)

Coquillages	Micro-organismes	Température	Durée de l'épuration (eau traitée par U.V.)	Niveau de Contamination (g ⁻¹)		Références
				Avant	Après	
Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	<i>Poliovirus</i>	20-24° C	72 h	5.10 ³	N.D.	MITCHELL et al (1966)
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) (<i>Ostrea lurida</i>) Clams (<i>Tapes japonica</i>)	<i>Poliovirus</i> 1		96 h	10 ⁴	N.D.	HOFF and BECKER (1969)
	<i>Poliovirus</i> 1 purifié		48 h	3,9.10 ²	N.D.	
	<i>Poliovirus</i> 1		48 h	4.10 ⁴	5	
<i>Poliovirus</i> 1		96 h	5.10 ⁴	10 ²		
Clams (<i>Mercenaria Mercenaria</i>)	Coliphage	16° C 24° C	144 h	33	9	CANZONIER (1971)
			72 h	11	N.D.	
Clams (<i>Mya arenaria</i>)	<i>Poliovirus</i> 1, 2 et 3.		144 h 72 h 24 h	2,26-3,33 <0,21 0,33	<0,5 <0,03 N.D.	METCALF et al (1979-1980)
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Coliformes fécaux	21° C	24 h	8	<0,2	BUISSON et al (1981)
				50	<0,5	
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Coliphage	15° C	72 h	10 ⁵	10 ³	MESQUITA (1988)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	<i>Poliovirus</i> 1		52 h	2.10 ²	≈ 4 ¹	POWER and COLLINS (1989)
	Coliphage		52 h	5.10 ⁵	≈ 5.10 ³	
	<i>E. coli</i>	10° C	48 h	6,3.10 ⁵	≈ 10 ³	POWER and COLLINS (1990)
Coliphage		48 h	7,1.10 ²	≈ 5.10 ¹		
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Phage ARN F spécifiques	18°C	7 jours	345	6,6	DORE et al., 1998
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Phage ARN F spécifiques	9°C	7 jours	345	137	DORE et al., 1998
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Phage ARN F spécifiques	18°C	2 jours	28	< 0,3	DORE et al., 1998

N.D. : Non Détecté

En fait, HENSHILWOOD *et al.*, (1998) ont montré que l'épuration est beaucoup plus performante en été qu'en hiver.

Par ailleurs, l'épuration des coquillages est efficace essentiellement lorsque la salinité est comprise entre 23 et 30 ‰ (à 18-20° C), (LIU *et al.*, 1967).

- les cinétiques d'épuration sont variables selon les virus. Ainsi, SOBSEY *et al.* (1987) montrent qu'une durée d'épuration de 3 jours permet l'élimination de plus de 98 % du *Poliovirus* de type 1, mais qu'elle est insuffisante pour le virus de l'hépatite A, qui persiste encore à des taux équivalents à 41 % de la contamination initiale après 5 jours. De même POWER and COLLINS (1989), étudiant les cinétiques de relargage du *Poliovirus* et d'un coliphage montrent, qu'après 52 heures d'épuration dans de l'eau circulante désinfectée par les U.V., la quantité de *Poliovirus* dans les moules a baissé de 1,86 log, tandis que celle des coliphages a chuté de 2,16 log.

- le taux de décontamination décroît avec le temps. HOFF et BECKER (1969) ainsi que METCALF *et al.* (1979) ont souligné la forte décroissance du *Poliovirus* durant les 24 premières heures du processus d'épuration, puis le ralentissement de la vitesse de décontamination. Il est probable que les premiers micro-organismes éliminés sont ceux, initialement présents dans le tube digestif des mollusques et que ceux présents dans les tissus sont plus difficiles à éliminer.

- la vitesse de relargage des bactéries, et notamment celle des bactéries-tests de contamination fécale, est plus rapide que celle des virus. L'élimination des virus nécessite, le plus souvent, une stabulation des coquillages de 3 jours au minimum en bassin d'épuration, alors que l'élimination des bactéries, même présentes à des taux initiaux très élevés (10^2 à 10^3 g⁻¹) est en général complète en 24 ou 48 heures (CANZONIER, 1971 ; PERKINS *et al.*, 1980 ; MESQUITA, 1988).

Les travaux de POWER et COLLINS (1990) sur l'élimination de coliphage et d'*E.coli*, ont montré que les 2 types de micro-organismes ne sont pas éliminés à la même vitesse à partir du tractus digestif. Après 48 heures d'épuration dans de l'eau traitée aux U.V., la réduction d'*E.coli* est de 99,9 %, alors qu'elle est seulement de 90 % pour le coliphage.

Ces travaux ont d'ailleurs été confirmés par ceux de DORE *et al.*, (1998) qui ont montré que, au cours des opérations d'épuration, *E. coli* est beaucoup plus rapidement éliminé que les phages à ARN F spécifiques.

Enfin, HENSHILWOOD *et al.* (1998) montrent que l'épuration pendant 1 à 2 semaines d'huîtres contaminées permet de ramener dans 100 % des cas la densité d'*E. coli* à des niveaux inférieurs aux standards, alors que des *Calicivirus* sont encore présents dans les huîtres « épurées ». En effet, 63 % des échantillons testés sont restés « *Calicivirus* positifs » après épuration.

L'élimination des coliformes fécaux n'est donc pas la preuve d'une épuration complète. Elle ne peut être que l'indication d'une activité de filtration satisfaisante des coquillages pendant les opérations de purification.

En conclusion les coquillages élevés dans des zones maritimes polluées par des virus entériques ingèrent et concentrent ces virus non seulement dans leur tube digestif mais aussi dans leurs tissus notamment en cas de contamination massive.

La durée de persistance de ces virus dans les coquillages immergés varie en fonction de la qualité microbiologique et de la température de l'eau mais elle peut être supérieure à 60 jours. De même le stockage à l'état frais ou la congélation ne réduisent pas sensiblement la teneur en virus des coquillages contaminés.

Les techniques de décontamination fondées sur l'immersion des bivalves pendant 24 à 72 heures dans de l'eau de mer de bonne qualité ou soumise à des traitements de désinfection donnent de bons résultats sur le plan bactériologique lorsqu'elles sont correctement utilisées. Cependant, du point de vue virologique, elles ne sont pas totalement satisfaisantes car, après épuration, les coquillages contiennent encore parfois des virus plus particulièrement lorsque la densité virale dans l'eau d'élevage est importante. Il y a en réalité une disparité entre la vitesse d'élimination des bactéries et des virus par les coquillages, ce qui peut expliquer d'ailleurs la survenue de maladies virales à partir d'huîtres épurées, satisfaisants aux critères bactériens de salubrité (GROHMANN *et al.*, 1981 ; GILL *et al.*, 1983 ; RICHARDS, 1985).

Dans ces conditions il est recommandé de soumettre à la dépuración uniquement les fruits de mer présentant un faible niveau de contamination virale. La dépuración devra être réalisée par immersion en eau de bonne qualité microbiologique de préférence désinfectée en continu pendant au minimum 72 heures.

En ce qui concerne les coquillages fortement contaminés, ils devront être immergés pendant une longue période en zone maritime non polluée avant de pouvoir éventuellement être traités.

Enfin, il apparaît que seuls les fruits de mer élevés dans des zones conchylicoles exemptes de pollution microbienne ne présentent pas de risque pour le consommateur. Il est donc essentiel de protéger les zones conchylicoles en interdisant les rejets d'eaux usées non ou incorrectement traitées.

Références

ATMAR R.L., NEIL F.H., ROMALDE J.L. (1995). Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61, 3014-3018.

BARON D. (1986). Etude des problèmes méthodologiques posés par la mise en évidence d'une contamination virale des coquillages comestibles, cas de l'huître. Rap. Minist. Environnement, n° 85166, PARIS.

BEDFORD A.J., WILLIAMS G. and BELLAMY A.R. (1978). Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*. Appl. Environ. Microbiol., **35** : 1012-1018.

BEMISS J.A., LOGAN M.M., SAMPLE J.D. and RICHARDS G.P. (1989). A method for the enumeration of *Poliovirus* in selected molluscan shellfish. J. Virol. Meth., **26** : 209-218.

BERIL C. and SCHWARTZBROD L. (1989). Détection des *Rotavirus* dans les moules. Microbiol. Alim. Nut., **7** : 175-182.

BOHER S. (1991). Analyse virologique des huîtres et étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale. Thèse Université, Nancy.

BUISSON D.H., FLETCHER G.C. and BEGG C.W. (1981). Bacterial depuration of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand. N.Z.J. Sci., **24** : 253-262.

CANZONIER W.J. (1971). Accumulation and elimination of coliphage S-13 by the hard clam. Appl. Microbiol., **21** : 1024-1031.

CHANG J.C., OSSOFF S.F., LOBE D.C., DORFMAN M.H., DUMAIS C.M., QUALLS R.G. and JOHNSON J.B. (1985). U.V. inactivation of pathogenic and indicator microorganism. Appl. Environ. Microbiol., **49**, 1361-1365.

CHUNG H., JAYKUS L.A. and SOBSEY M.D. (1996). Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. Appl. Environ. Microbiol., **62** : 3772-3778.

CRANCE J.M., APAIRE-MARCHAIS V., LEVEQUE F., BERIL C., LE GUYADER F., JOUAN F., SCHWARTZBROD L. et BILLAUDEL S. (1995). Detection of hepatitis A virus in wild shellfish. Mar. Poll. Bull., **30**, 372-375.

CROCI L., DE MEDICI G., MORALE G. (1999). Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription PCR. Int. J. Food. Microbiol., **48**, 67-71.

DI GIROLAMO R., LISTON J. and MATCHES J. (1970). Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters. Appl. Microbiol., **20** : 58-63.

DI GIROLAMO R., LISTON J. and MATCHES J. (1975). Uptake and elimination of *Poliovirus* by west coast oysters. Appl. Microbiol., **29** : 260-264.

DI GIROLAMO R., LISTON J. and MATCHES J. (1977). Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus. Appl. Environ. Microbiol. **33**, 19-25.

DORE W.J., HENSHILWOOD and LEES D.N. (1998). The development of management strategies for control of virological quality in oysters. Wat. Sci. Tech., **38** : 29-35.

FAUVEL Y., PONS G. and LEGERON J.P. (1982). Ozonisation de l'eau de mer et épuration des coquillages. Sci. Pêche Nantes, **320**, 1-16.

FUGATE K.J., CLIVER D.O. and HATCH M.T. (1975). *Entéroviruses* and potential bacterial indicators in gulf coast oysters. J. Milk Food Technol., **38**, 100-104.

GAILLOT D., TERVER D., FINANCE C. and SCHWARTZBROD L. (1988). Improved method for contamination of mussels by *Poliovirus*. Int. J. Food. Microbiol., **6**, 333-339.

GALTSOFF P.S. (1946). Reaction of oysters to chlorination. U.S. Fish Wildlife Serv. Res. Rept. 11, U.S. Government Printing office, Washington, D.C.

GILL O.N., CUBITT W.D., MC SWIGGAN D.A., WATNEY B.M. and BARTLETT C.L.R. (1983). Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. Br. Med. J., **287**, 1532-1534.

GOYAL S.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1979). Human *Entéroviruses* in oysters and their overlying waters. Appl. Environ. Microbiol., **37** : 572-581.

GROHMANN G.S., MURPHY A.M., CHRISTOPHER P.J., AUTY E. and GREENBERG

H.B. (1981). Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters. Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., **59**, 219-228.

HENSHILWOOD K., GREEN J. and LEES D.N. (1998). Monitoring the marine environment for small round structured virus (SRSV) : a new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish. Wat. Sci. Tech., 38, 51-56.

HOFF J.C. and BECKER R.C. (1969). The accumulation and elimination of crude and clarified *Poliovirus* suspensions by shellfish. Am. J. Epidemiol., **90**, 53-61.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M., VICALE T.J. and MANN R. (1982). Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated *Poliovirus* in oysters. Appl. Environ. Microbiol., **44**, 1362-1369.

LE GUYADER F., ESTES M.K., KOPECKA H., LE CANN P. and POMMEPUY M. (2000). Apport de la biologie moléculaire pour détecter les virus entériques humains dans les coquillages. Virologie, 4, 241-247.

LE GUYADER F., MIOSSEC L., HAUGARREAU L., DUBOIS E., KOPECKA H. and POMMEPUY M. (1998). RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21 month period. Wat. Sci. Tech., 12 : 45-50.

LEE T., YAM W.C., TAM T.Y., HO B.S.W., NG M.H. and BROOM M.J. (1999). Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (*perna viridis*). Water Res., 33, 885-889.

LEES D.N., HENSHILWOOD K., GALLIMORE C.L. and BROWN D.W.G. (1995). Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. Appl. Environ. Microbiol., 61, 4418-4424.

LINCO S.J. and GROHMANN G.S. (1980). The Darwin outbreak of oyster associated viral gastroenteritis. Med. J. Aust., **1**, 211-213.

LIU O.C., SERAICHEKAS H.R. and MURPHY B.L. (1967). Viral depuration of the Northern quahaug. Appl. Microbiol., **15**, 307-315.

MESQUITA M.M.F. (1988). Effects of seawater contamination level and exposure period on the bacterial and viral accumulation and elimination processes by *Mytilus edulis*. Wat. Sci. Tech., **20**, 265-270.

METCALF T.G. and STILES W.C. (1965). The accumulation of enteric viruses by the oyster *Crassostrea virginica*. J. Infect. Dis., **115** : 68-76.

METCALF T.G., ECKERSON D., MOULTON E., and LARKIN E.P. (1980a). Uptake and depletion of particulate associated *Polioviruses* by the soft shell clam. J. Food Prot., **43**, 87-88.

METCALF T.G., MOULTON E. and ECKERSON D. (1980b). Improved method and test

strategy for recovery of enteric viruses from shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39, 141-152.

METCALF T.G., MULLIN B., ECKERSON D., MOULTON E. and LARKIN E.P. (1979). Bioaccumulation and depuration of *Entéroviruses* by the soft shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **38**, 275-282.

MITCHELL J.R., PRESNELL M.W., AKIN E., CUMMINS J.M. and LIU O.C. (1966). Accumulation and elimination of *Poliovirus* by the eastern oyster. *Amer. J. Epid.*, **84**, 40-50.

PERKINS F.O., HAVEN D.S., MORALES-ALAMO R. and RHODES M.W. (1980). Uptake and elimination of bacteria in shellfish. *J. Food Prot.*, **48**, 124-126.

PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J. and GIRONES R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish : human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64**, 3376-3382.

POWER U.F. and COLLINS J.K. (1989). Differential depuration of *Poliovirus*, *Escherichia coli*, and a coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 1386-1390.

POWER U.F. and COLLINS J.K. (1990). Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 803-807.

RICHARDS G.P. (1985). Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United-States : requisite for development of viral guidelines. *J. Food. Prot.*, **48**, 815-823.

RICHARDS G.P. (1988). Microbial purification of shellfish : a review of depuration and relaying. *J. Food Prot.*, **51**, 218-251.

SCHWAB K.J., NEIL F.H., ESTES M.K., METCALF T.G. and ATMAR R.L. (1998). Distribution of *Norwalk virus* within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.*, 61 : 1674-1680.

SCHWARTZBROD L., JEHL-PIETRI C., BOHER S., HUGUES B., ALBERT M. and BERIL C. (1990). Les contaminations par les virus. La mer et les rejets urbains – Bendor, 13-15 juin 1990. IFREMER, actes de colloques, 11, 101-114.

SOBSEY M.D., DAVIS A. L. and RULLMAN V.A. (1987). Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated eastern oysters. *Proc. Oceans 87, Halifax, Nova Scotia*, **5**, 1740-1745.

SUGIEDA M., NAKAJIMA K. and NAKAJIMA S. (1996). Outbreaks of *Norwalk-like virus* associated gastroenteritis traced to shellfish : coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect.*, 116 : 339-346.

TIERNEY J.T., SULLIVAN R., PEELER J.T. and LARKIN E.P. (1982). Persistence of *Polioviruses* in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature. *J. Food*

Prot., 45, 1135-1137.

Chapitre 8

EPIDEMIOLOGIE DES MALADIES VIRALES A TRANSMISSION HYDRIQUE

L'épidémiologie des maladies virales transmises par la voie hydrique doit être envisagée en prenant en compte d'une part la transmission directe par les eaux, d'autre part la transmission consécutive à l'irrigation avec des eaux usées ou à l'utilisation agricole de boues d'épuration, enfin la transmission indirecte par les coquillages (CUBITT, 1991) ou les produits végétaux.

1. Transmission par les eaux

La transmission de maladies à virus par les eaux s'effectue dans la majorité des cas soit par la consommation d'eau insuffisamment potable (CUBITT, 1991 ; LAGARDE *et al.*, 1995 ; KUKKULA *et al.*, 1997), soit au cours d'activités récréatives dans des zones contaminées (FLEISHER *et al.*, 1996).

L'eau de boisson, est malgré les traitements de potabilisation, encore une source d'infection virale pour les populations des pays industrialisés. En effet, si le risque virologique est très faible en sortie de filière de potabilisation il n'en est pas de même au niveau du robinet du consommateur. Les travaux de PAYMENT tendraient à prouver qu'une proportion importante de maladies gastro-intestinales constatées dans la population pourrait être d'origine hydrique même lorsque l'eau distribuée répond aux normes de qualité exigées (PAYMENT *et al.*, 1991a, 1991b, 1991c). Par ailleurs, dans les pays en voie de développement, les maladies transmises par l'eau provoquent plus de 10 millions de morts par an.

De nombreuses épidémies virales ont été décrites à la suite de consommation d'eau. Ainsi HEJKAL *et al.*, (1982), LIPPY and WALTRIP (1984), CLIVER (1984) font état d'épidémies dues à des *Entérovirus*, respectivement *Coxsackievirus* B1 et B2, *Poliovirus* 1, et *Echovirus* 4. Des épidémies d'hépatite A (BOSCH *et al.*, 1991 ; APAIRE-MARCHAIS *et al.*, 1995 ; LAGARDE *et al.*, 1995) et d'hépatite E (WONG *et al.*, 1980 ; KHUROO, 1980 ; RAY *et al.*,

1991) ont été rapportées. De très nombreuses épidémies de gastroentérites ont été décrites. Parmi celles-ci les infections à *Norwalk like virus* représentent vraisemblablement la plus importante cause de gastroentérites chez l'adulte. Ainsi, aux USA, 96 % des épidémies de gastroentérites non bactérienne rapportées au CDC de Janvier 1997 à Juin 1998 étaient provoquées par le NLV. Parmi les épidémies d'origine hydrique 12/15 étaient provoquées par le NLV (FANKHAUSER *et al.*, 1998).

Des épidémies ont été rapportées notamment par LAWSON *et al.*, (1991) ; HEDDERG and OSTERHOLM (1993), HUNTER (1994), PAYMENT (1996), PAYMENT and FRANCO (1994), BELLER *et al.*, (1997) ; BRUGHA *et al.* (1999) ; KUKKULA *et al.*, (1997).

Les *Rotavirus* ont été également associés à des épidémies d'origine hydrique (ANSARI *et al.*, 1991 ; GERBA *et al.*, 1985). La plus importante épidémie d'origine hydrique à *Rotavirus* décrite à ce jour a eu lieu en Chine, avec plus d'un million de personnes contaminées (enfants et adultes) (HUNG, 1988). Cette épidémie a débuté par la consommation d'eau contaminée, puis les infections se sont transmises d'individu à individu, le virus responsable de ces gastro-entérites était un *Rotavirus* du groupe B. CUBITT (1991) cite une épidémie d'origine hydrique (1750 cas) aux Etats-Unis qui a été attribuée aux *Rotavirus* du groupe A. Enfin, des épidémies dues à des *Rotavirus* du groupe C ont été rapportées au Japon (HEDBERG and OSTERHOLM, 1993).

Enfin, les *Astrovirus* ont aussi été impliqués dans la transmission par l'eau de boisson (CUBITT, 1991 ; OISHI *et al.*, 1994).

En ce qui concerne la transmission par les eaux de baignades et les eaux de loisir, les *Adénovirus* ont été clairement associés à des pharyngo-conjonctivites survenues à la suite de baignades en piscines (FOY *et al.*, 1968 ; D'ANGELO *et al.*, 1979 ; PAYNE *et al.*, 1984). Mais une relation claire entre baignades en eau de mer ou en eau douce et la survenue d'infections virales est plus rarement constatée (KOOPMAN *et al.*, 1982 ; CABELLI, 1983 ; FATTAL and SHUVAL, 1989). Cependant, GRAY *et al.*, (1997) ont rapporté la survenue de gastroentérite à *Norwalk like virus* chez des canoëistes ayant pratiqué leur sport sur une rivière contaminée.

Par ailleurs, plusieurs enquêtes épidémiologiques ont mis en évidence une incidence accrue des gastroentérites parmi les baigneurs (FERLEY *et al.*, 1989 ; BALARAJAN *et al.*,

1991 ; ALEXANDER *et al.*, 1992 ; CORBETT *et al.*, 1993 ; FLEISHER *et al.*, 1993 ; KAY *et al.*, 1994). Il a même été montré qu'un taux plus élevé d'infections respiratoires et de gastro-entérites était retrouvé chez les baigneurs ayant immergé leur tête (ALEXANDER *et al.*, 1992 ; FLEISHER *et al.*, 1996).

Cependant, le nombre de maladies virales et en particulier de gastroentérites contractées au niveau des eaux de loisirs et rapportées aux autorités sanitaires est extrêmement faible. Le risque viral lié à des activités en eaux de loisir apparaît donc très mineure.

2. Transmission consécutive à l'irrigation avec des eaux usées et à l'utilisation agricole de boues d'épuration

Au cours des opérations d'épuration des eaux usées notamment pendant la phase des boues activées, des aérosols peuvent être formés. Il en est de même au cours de l'irrigation si l'aspersion est utilisée. Le processus de formation des gouttelettes d'aérosols est tel que les particules de l'aérosol peuvent contenir des concentrations de virus 100 fois supérieures à celles que l'on trouve dans l'eau (BLANCHARD and SYZDEK, 1974). Or, au cours de l'épandage par sprinkler 0,05 à 1 % du liquide est transformé en aérosols (BOUTIN *et al.*, 1984). On admet que 30 % des particules en suspension dans l'aérosol peuvent être inhalées car elles ont des tailles comprises entre 0,2 μm et 5 μm . Il est donc possible d'envisager que, par inhalation, ces particules pénètrent dans l'appareil respiratoire et que les plus grosses (2 μm) soient évacuées par action ciliaire et passent dans l'appareil digestif. Si ces particules contiennent des virus, ceux-ci sont susceptibles de provoquer une infection. Or, des *Entérovirus* ont été retrouvés dans des aérosols prélevés au niveau de stations d'épuration à boues activées (CARDUCCI *et al.*, 2000).

Par ailleurs, une fois formés, les aérosols peuvent être transportés à distance par le vent. C'est ainsi que TELTSCH and KATZENELSON (1978) ont retrouvé des *Entérovirus* entre 40 et 100 mètres sous le vent de champs irrigués par aspersion d'eaux usées. De même, FATTAL and TELTSCH (1982) ont détectés des *Echovirus*, des *Coxsackievirus* B et du *Poliovirus* 2 à 100 mètres d'une irrigation par aspersion d'eaux usées.

De même SHUVAL *et al.*, (1989a) observent que 12,5 % des prélèvements d'air réalisés à 730 mètres sous le vent de terrains irrigués par des eaux usées contenaient des virus entériques à une concentration variant de 0,03 UFP à 1,94 UFP m³-1 d'air analysé.

En Californie, à 50 mètres sous le vent d'une aire d'aspersion d'eaux usées épurées (traitement secondaire sans désinfection) la moyenne géométrique de la concentration en *Entérovirus* des aérosols était de 0,014 UFP m³-1.

Par ailleurs compte-tenu des concentrations virales observées dans les boues d'épuration, les travailleurs utilisant ou étant en contact avec ces boues sont exposés à une éventuelle contamination par des virus entériques.

Dans ces conditions, il est nécessaire d'envisager les conséquences épidémiologiques liées à ces facteurs chez les travailleurs de station d'épuration, les fermiers réalisant l'irrigation ou l'épandage ainsi que chez les populations exposées aux aérosols. Plusieurs enquêtes épidémiologiques ont été réalisées sur ce sujet (Tableau 48).

Ainsi OTTOIENGI *et al.*, (1980) de même que HAMPARIAN *et al.*, (1982) ont déterminé et comparé la survenue d'infections virales chez des individus vivant d'une part dans des fermes utilisant l'épandage de boues, d'autre part dans des fermes ne pratiquant pas l'épandage. La surveillance a été réalisée à l'aide de tests immunologiques appliqués à la recherche des anticorps dirigés contre les *Entérovirus*. Sur une période de 3 ans, ils observent 37 augmentations significatives du taux des anticorps vis-à-vis des *Entérovirus* dans le sérum de 18 personnes. 59 % des augmentations d'anticorps étaient constatées chez des d'individus vivant dans les fermes réalisant l'épandage.

TIMOTHY (1984) a rapporté quatre cas d'hépatite A chez des travailleurs agricoles occupés à épandre des boues sur les champs. Dans ce cas, il semble que le non respect des précautions sanitaires minimales (vêtements protecteurs, lavage des mains...) soit largement responsable.

LINNEMANN *et al.*, (1984) ont étudié une population de travailleurs impliqués dans l'irrigation par aspersion d'eaux usées comparativement à une population non exposée. Des *Entérovirus* (*Poliovirus 3*, *Coxsackie B₂* et *Echo 3*) ont été isolés d'échantillons d'eaux usées mais aucun virus n'a été isolé dans les échantillons d'air prélevés pendant l'aspersion. Ils ont constaté qu'il n'y avait pas d'augmentation du taux de maladies chez les individus travaillant en irrigation et qu'il n'y avait pas augmentation du risque d'infection chez ces travailleurs.

Seuls les employés chargés de nettoyer le matériel d'aspersion présentaient une augmentation significative du taux d'anticorps anti-virus *Coxsackie B₅* mais aucune infection symptomatique avec excrétion virale dans les fèces n'a été décelée.

FATTAL *et al.*, (1987) ont par ailleurs montré, qu'en période épidémique, l'irrigation par aspersion d'eaux usées était susceptible de provoquer par l'intermédiaire d'aérosols la transmission de virus à la population en particulier dans la tranche d'âge de 0 à 5 ans.

**Tableau 48 - Enquêtes épidémiologiques concernant le risque viral lié aux eaux usées et aux boues
(d'après BLOCK, 1986)**

AUTEURS	TYPE D'ETUDES	NATURE DE L'EXPOSITION	POPULATION EXPOSEE	RISQUE IDENTIFIE	INFORMATION COLLECTEE
OTTOIENGHI <u>et al.</u> (1980)	Prospective	Boues	Ouvriers agricoles	Virus	Analyse sérologique
HAMPARIAN <u>et al.</u> (1982)	Prospective	Boues	Ouvriers agricoles	Virus	Analyse sérologique
MARGALITH <u>et al.</u> (1982)	Prospective	Eaux usées	Population de Kibbutz 802 personnes	Virus de l'hépatite A Virus Coxsackie B ₃	Taux d'anticorps
FATTAL (1983)	Prospective	Eaux usées	Population de Kibbutz 13000 personnes	Virus de l'hépatite A Virus Coxsackie	Cas cliniques d'infections à virus Coxsackie et de l'hépatite A
LINNEMAN <u>et al.</u> (1984)	Prospective	Eaux usées	Epandeurs d'eaux usées	Virus	Taux d'anticorps Troubles gastro-intestinaux
TIMOTHY (1984)	Retrospective	Boues	Epandeurs de boues	Virus de l'hépatite A	Taux d'anticorps
CLARK <u>et al.</u> (1985)	Prospective	Eaux usées	Egoutiers	Rotavirus Virus de Norwalk	Cas cliniques de diarrhées Taux d'anticorps
SHUVAL <u>et al.</u> (1989b)	Prospective	Eaux usées	Population de Kibbutz	Virus entérique	Cas cliniques

Enfin, SHUVAL *et al.*, (1989b) ont conduit une étude épidémiologique prospective concernant la transmission des maladies entériques par des aérosols provenant d'aspersion d'eaux usées. En fait, trois études successives ont été réalisées dans des Kibbutz par comparaison des épisodes de maladies entériques chez trois catégories de population exposées ou non à des aérosols d'eaux usées. La première étude fondée sur l'analyse des cas déclarés au ministère de la santé suggèrait une augmentation des maladies entériques notamment d'hépatite infectieuse dans les populations exposées. Ces conclusions n'étaient pas confirmées par les résultats de la seconde étude fondée sur l'analyse de la morbidité enregistrée dans les communautés étudiées. Néanmoins, celle-ci mettait en évidence un excès significatif de maladies entériques uniquement pendant les mois d'irrigation dans le groupe des enfants de 0 à 4 ans habitant les kibbutz exposés.

La troisième étude a porté sur 10231 personnes réparties en trois catégories selon leur niveau d'exposition (élevé, faible ou nul) aux aérosols. L'aspersion a été réalisée pendant une période allant de mai à août avec des eaux usées de qualité microbiologique médiocre (10^4 à 10^5 coliformes 100 ml^{-1}). Les résultats montrent qu'il n'y a pas plus d'épisodes entériques dans la population exposée aux aérosols d'eaux usées (11,6 pour 100 personnes et par jour) que dans la population non exposée (11,0 pour 100 personnes et par jour). De plus, il n'a pas été observé d'excès de maladie entérique ni chez les ouvriers en contact avec les eaux usées ni parmi les membres de leurs familles. En fait, aucun risque significatif pour la santé publique n'a été associé à l'exposition à des aérosols générés par l'aspersion d'eaux usées traitées à des distances variant de 300 à 600 mètres des habitations.

Ces conclusions sont en accord avec les conclusions de JAKUBOWSKI (1986) fondées sur l'analyse de 11 études épidémiologiques concernant les effets potentiels sur la santé publique du traitement et de l'épandage des eaux usées et des boues.

En fait, et dans l'état actuel des connaissances, il apparaît que l'utilisation d'eaux usées traitées mais non désinfectées pour l'irrigation par aspersion ne provoque pas de risque viral significatif pour la santé des populations situées sous le vent des zones d'aspersion.

3. Transmission par les coquillages

La consommation des coquillages est associée d'une façon très claire à la survenue soit d'épidémies, soit de cas sporadiques de gastroentérites essentiellement provoquées par des *Norwalk like virus* et d'hépatite A. Dans le tableau 49 sont rassemblés un certain nombre de ces épidémies.

Tableau 49

**Epidémies de maladies virales
liées à la consommation de coquillages**

ANNEE	COQUILLAGE	LIEU	VIRUS RESPONSABLE	REFERENCES
1978	Huîtres	Australie	Virus de NORWALK	LINCO AND GROHMANN (1980)
1980-81	Coques	Grande-Bretagne	Virus de NORWALK	O'MAHONY <i>et al.</i> , (1983)
1980	Huîtres	Floride	VHA	GUNN <i>et al.</i> , (1982)
1980	Huîtres	Philippines	VHA	OHARA <i>et al.</i> , (1983)
1982	Clam Huîtres	USA USA	VHA	MORSE <i>et al.</i> , (1986)
1983	Coques	Singapour	Virus de NORWALK	GOH <i>et al.</i> , (1984)
1983	Huîtres	Grande-Bretagne	VHA	GILL <i>et al.</i> , (1983)
1984	Coques	Malaisie	Gastro-entérites	GOH <i>et al.</i> , (1984)
1984	Moules	Yougoslavie	VHA	MARETIC <i>et al.</i> , (1986)
1985	Clam	New-York	Virus de NORWALK	VOGT AND SATKIN (1986)
1985	Huîtres	Grande-Bretagne	VHA	HELLER <i>et al.</i> , (1986)
1988	Palourdes	Shangai	VHA	HALLIDAY <i>et al.</i> , (1991)
1991	Huîtres	USA	VHA	DESENCLOS <i>et al.</i> , 1991
1992	Huîtres	France	NLV	DAURAT, 1994
1994	Palourdes	France	SRSV	CHARLET et FERCHAUD, 1994
1995	Huîtres	USA	SRSV	DOWELL <i>et al.</i> , 1995
1995	Huîtres	USA	NLV	KOHN <i>et al.</i> , 1995
1996	Huîtres	France	SRSV	LE GUYADER <i>et al.</i> , 1996
1996	Coquillages		NLV	SUGIEDA <i>et al.</i> , 1996
1997	Huîtres	France	HUCV	MIOSSEC <i>et al.</i> , 1998
1998	Huîtres	Danemark	NLV <i>Entérovirus</i>	CHRISTENSEN, 1998
1998	Clams	Italie	VHA	LEONI <i>et al.</i> , 1998

1998	Calmars	Japon	NLV	SHIBATA <i>et al.</i> , 1999
1999	Huîtres	USA	NLV <i>Entérovirus</i>	SHIEH <i>et al.</i> , 1999

VHA : Virus de l'Hépatite A

SRSV : Small Round Structured virus (# NLV)

NLV : *Norwalk like virus* HUCV : Human *Calicivirus*

Les mollusques les plus souvent en cause sont les huîtres, les clams, les moules ainsi que les palourdes. Ces dernières ont été responsables de la plus grande épidémie d'hépatite A transmis par les coquillages qui est survenue à Shangaï en 1988 et qui a touché près de 300000 personnes (HALLIDAY *et al.*, 1991).

Cette transmission de virus entériques par les mollusques est parfaitement compréhensible si l'on considère leur mode d'alimentation fondé sur la filtration d'importants volumes d'eau, pouvant aller jusqu'à 20 litres par heure, ce qui leur permet d'accumuler les microorganismes éventuellement pathogènes présents dans l'eau de mer.

Ces épidémies sont provoquées le plus souvent par la consommation de coquillages de mauvaise qualité ramassés par des pêcheurs à pied dans des zones insalubres. Cependant, il a été montré à plusieurs reprises qu'elles pouvaient survenir à la suite de l'ingestion de produits conformes aux standards bactériologiques. Ainsi, HENSHILWOOD *et al.*, (1988) montre que des huîtres contenant moins de 20 *E. coli* par 100 grammes de tissu et donc parfaitement conformes à la législation (Standart : ≤ 230 *E. coli* / 100 g) étaient contaminées par des *Norwalk-like virus*. CHALMERS and Mc MILLAN (1995) ainsi que PERRETT and KUDESIA (1995) ont aussi rapporté la survenue d'épidémies de gastroentérites virales liées à la consommation d'huîtres répondant aux critères de salubrités fixés par la législation.

D'ailleurs LE GUYADER *et al.*, (1997) ont mis en évidence que, dans des sites maritimes répondant aux standarts bactériologiques, des coquillages pouvaient présenter une contamination virale. Par exemple, des moules contenant 4 virus entériques (VHA, *Rotavirus*, SRSV et *Entérovirus*) ne renfermaient que 48 coliformes fécaux / 100 g.

Par ailleurs, il a été montré au cours de plusieurs épidémies que des virus entériques pouvaient être transmis à l'homme après consommation de coquillages ayant subi un traitement de dépuración (GILL *et al.*, 1983 ; HELLER *et al.*, 1986 ; HENSHILWOOD *et al.*, 1998).

HENSHILWOOD *et al.*, (1998) ont même montré que l'épuration permettait de ramener les densités de *E. coli* à des niveaux inférieurs aux standards bactériologiques alors que plus de 60 % des huîtres restaient contaminées avec des *Norwalk like virus* .

Enfin, il faut signaler que ces épidémies de gastroentérites présentent une très nette prédominance saisonnière car elles se situent très majoritairement pendant l'hiver.

4. Transmission par des végétaux susceptibles d'avoir été irrigués avec des eaux usées.

En ce qui concerne la transmission d'infections virales par consommation de fruits ou de produits maraîchers susceptibles d'avoir été irrigués ou contaminés par des eaux usées, des eaux polluées, ou non potables, les informations sont plus restreintes. Cependant, BAGDASSARYAN (1964) a rapporté l'isolement d'*Entérovirus* sur des légumes irrigués. HUTCHESON (1971) décrit des cas d'hépatite virale liés à la consommation de cresson contaminé par des eaux usées ayant subi un traitement primaire et ROSENBLUM *et al.*, (1990) observe une épidémie d'hépatite A en rapport avec la consommation de salades, cependant, dans ce cas, l'auteur n'a pu déterminer si les salades avaient été irriguées avec des eaux usées.

Par ailleurs, WARNER *et al.*, (1991) décrivent une épidémie de gastroentérites à *Norwalk like virus* provoquées par la consommation de céleri contaminée par de l'eau de mauvaise qualité.

Enfin, plusieurs épisodes de gastroentérites à *Norwalk like virus* provoquées par la consommation de framboises ont été rapportés à travers le monde au cours des dernières années. Ces framboises congelées avaient toutes la même origine (Bosnie) et il est vraisemblable qu'elles aient été irriguées avec des eaux usées. Des épidémies affectant plus de 300 personnes ont ainsi été rapportées au Québec (GAULIN *et al.*, 1999) et en Finlande (PONKA *et al.*, 1999).

Références

ALEXANDER L.M., HEAVEN A. and MORRIS R. (1992). Symptomatology of children in contact with seawater contaminated with sewage. J. Epidem. Com. Health, **46**, 340-344.

ANSARI S.A., SPRINGTHORPE U.S. and SATTAR S.A. (1991). Survival and vehicular spread of human *Rotaviruses* : possible relation to seasonality of outbreaks. Rev. Infect. Dis., **13**, 448-461.

APAIRE-MARCHAIS V., ROBERTSON B.H., AUBINEAU-FERRE V., LE ROUX M.G., LEVEQUE F., SCHWARTZBROD L. and BILLAUDEL S. (1995). Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3977-3980.

BAGDASSARYAN G.A. (1964). Sanitary examination of soil and vegetables from irrigation fields for the presence of viruses. Gig. Sanit., **11**, 37-39.

BALARAJAN R., RALEIGH V.S. and YUEN P. (1991). Health risks associated with bathing in sea water. Br. Med. J., **303**, 1444-1445.

BELLER M., ELLIS A., LEE S.H., DREBOT M.A., JENKERSON S.A., FUNK E., SOBSEY M.D., SIMMONS O.D., MONROE S.S., ANDO T., NOEL J., PETRIC M., MIDDAUGH J.P. and SPIKA J.S. (1997). Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. International consequences. J.A.M.A., **278**, 563-568.

BLANCHARD D.C. and SYZDEK L.D. (1974). Importance of bubble scavenging in the water to air transfer of organic material and bacteria. J. Rech. Atm., **8**, 529-540.

BLOCK J.C. (1986). Biological health risks of sludge disposal. In "Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge : Knowledge and needs". BLOCK J.C., HAVELAAR A.H. and L'HERMITE P. Elsevier Applied Science. Publ.

BOSCH A., GAJARDO P., ABAD F.X., DIEZ J.M. and JOFRE J. (1991). Concentration of hepatitis A virus in environmental samples. Wat. Sci. Tech., **24**, 229-235.

BOUTIN P., TORRE M., TOLEDE M. et MERCIER J.P. (1984). Granulométrie des aérosols émis par des dispositifs d'aspersion d'eaux résiduaires traitées. Interprétation sanitaire. Tech. Sci. Munic., **3**, 143-153.

BRUGHA R., VIPOND I.B., EVANS M.R., SANDIFER Q.D., ROBERTS R.J., SALMON R.L., CAUL E.O., and MUKERJEE A.K. (1999). A community outbreak of food-borne small-round structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. Epidemiol. Infect., **122**, 145-154.

CABELLI V. (1983). Public health and water quality significance of viral diseases transmitted by drinking water and recreational water. Wat. Sci. Tech., **15**, 1-15.

CARDUCCI A., TOZZI E., RUBULOTTA E., CASINI B., CANTIANI L., ROUINI E., MUSCILLO M. and PACINI R. (2000). Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. Wat. Res., **34**, 1173-1178.

CHALMERS J.W.T. and Mc MILLAN J.H. (1995) An outbreak of viral gastroenteritis associated with adequately prepared oysters. Epidemiol. Infect., **115**, 163-167.

CHARLET F. et FERCHAUD P. (1994). Epidémie de gastro-entérites virales liées à la consommation de palourdes en charente maritime. Bull. Epid. Hebdo., **37**, 169-170.

CHRISTENSEN B.F., LEES D., HENSHILWOOD K., BJERGSKOV T. and GREEN J. (1998). Human enteric viruses in oysters causing a large outbreak of human food borne infection in 1996/97. J. Shell Res., **17**, 1633-1635.

CLARK C.S., LINNEMANN C.C., GARTSIDE P.S., PHAIR J.P., BLACKLOW N. and ZEISS C.R. (1985). Serologic survey of rotavirus, Norwalk agent and Protheca Wickerhamii in wastewater workers. Am J. Publ. Health, **75**, 83-85.

CLIVER D.O. (1984). Significance of water and the environment in the transmission of virus disease. In "Enteric viruses in water". MELNICK J.L., Monog. Virol., **15**, 30-42.

CORBETT J.J., RUBIN G.L. and CURRY G.K. (1993). The health effects of swimming at Sydney beaches. Am. J. Public Health, **83**, 1701-1706.

CUBITT W.D. (1991). A review of the epidemiology and diagnosis of waterborne viral infections. Wat. Sci. Tech., **24**, 197-203.

D'ANGELO L.H., HIERHOLZER J.C., KEENLYSIDE R.A., ANDERSON L.J. and MORTONE W.J. (1979) Pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 4 : Report of a swimming pool related outbreak with recovery of virus from pool water. J. Infect. Dis., **140**, 42-47.

DAURAT (1994). Une épidémie de gastro-entérite aiguë à virus *Norwalk like* liée à la consommation d'huîtres dans l'Hérault, décembre 1992. Bull. Epid. Hebdo., **37**, 170-171.

DESENCLOS J.C.A., KLONTZ K.C., WILDER M.H., NAJMAN O.V., MARGLIS H.S. and GUNN R.A. (1991). A multistate outbreak of Hepatitis A caused by the consumption of raw oysters. Am. J. Publ. Health, **81**, 1268-1272.

DOWELL S.F., GRAVES C., KIRLAND K.B. *et al.*, (1995). A multistate outbreak of oyster associated gastroenteritis : implications for interstate tracing of contaminated shellfish. J. Inf. Dis., **171**, 1497-1503.

FANKHAUSER R.L., NOEL J.S., MONROE S.S., ANDO T.A. and GLASS R.I. (1998). Molecular epidemiology of small round structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the United States. J. Infect. Dis., **178**, 1571-1578.

FATTAL B. (1983). The prevalence of viral hepatitis and other enteric disease in communities utilizing wastewater in agriculture. Wat. Sci. Tech., **15**, 43-58.

FATTAL B. and SHUVAL H.I. (1989). Epidemiological research on the relationship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus induced gastroenteritis among bathers on the mediterranean israeli beaches. *Research project n° ICP-CEH-039-ISR-16(D)*. W.H.O., Athens, 1-25.

FATTAL B. and TELTSCH B. (1982). Viruses in wastewater aerosols. Environmental International, **7**, 35-38.

FATTAL B., MARGALITH M., SHUVAL H.I., WAX Y. and MORAG A. (1987). Viral antibodies in agricultural populations exposed to aerosols from wastewater irrigation during a viral disease outbreak. Am. J. Epidem., **125**, 899-906.

FERLEY J.P., ZMIROU D. and BALEUX (1989). Epidemiological significance of microbiology pollution criteria for river recreational waters. Int. J. Epidemiol., **18**, 198-205.

FLEISHER J.M., JONES F. and KAY D. (1993). Water non water related risk factors for gastroenteritis among bathers exposed to sewage contaminated marine waters. Int. J. Epidem., **22**, 698-708.

FLEISHER J.M., KAY D., WYER M. and MERRET H. (1996). The *Enterovirus* test in the assessment of recreational water associated gastroenteritis. Water Res., **30**, 2341-2346.

FOY H.M., COONEY M.K. and HALTEN J.B. (1968). Adenovirus type 3 epidemic associated with intermittent chlorination of a swimming pool. Arch. Environ. Health., **17**, 795-802.

GAULIN C.D., RAMSAY D., CARDINAL P. and D'HALEVYN M.A. (1999). Epidemic of gastroenteritis of viral origen associated with eating imported raspberries. Can. J. Publ. Helath., **90**, 37-40.

GERBA C.P., ROSE J.B. and SINGH (1985). Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. Crit. Rev. Environ. Control, **15**, 213-236.

GILL O.N., CUBITT W.D., MC SWIGGAN D.A., WATNEY B.M. and BARTLETT C.L.R. (1983). Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. Br. Med. J., **287**, 1532-1534.

GOH K.T., CHAN L., DING J.L. and OON C.J. (1984). An epidemic of cockles associated hepatitis A in Singapore. W.H.O. Bull., **62**, 893-897.

GRAY J.J., GREEN J., CUNLIFFE C., GALLIMORE C., LEE J.V., NEAL K. and BROWN D.W.G. (1997). Mixed genogroup SRSV infections among a party of canoeists exposed to contaminated recreational water. J. Med. Virol., **52**, 425-429.

GUNN R.A., JANOWSKI H.T., LIEB S., PRATHER E.C. and GREENBERG H.B.

(1982). Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. Am. J. Epidemiol., **115**, 348-351.

HALLIDAY M.L., KANG L.Y., ZHOU T.R., HU M.D., PAN Q.C., FU T.Y., HUANG Y.S., and HU S.L. (1991). An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai, China. J. Inf. Dis., **164**, 852-859.

HAMPARIAN V.V., OTTOIENGHI A.C. and HUGUES J.H. (1982). Viral infections in farmers exposed to sewage sludge. Abstracts of the annual meeting of the american society of microbiology, Atlanta.

HEDBERG C.W. and OSTERHOLM M. (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. Clin. Microbiol. Rev., **6**, 199-210.

HEJKAL T.W., KESWICK B., LA BELLE R., GERBA C.P., SANCHEZ Y., DREESMAN G., HAFKIN B. and MELNICK J.L. (1982). Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. J. Am. Water Works Assoc., **74**, 318-321.

HELLER D., GILL O.N., RAYNHAM E., KIRKLAND T., ZADICK P.M., and STANWELL SMITH R. (1986). An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters, Br. Med. J., **292**, 1726-1727.

HENSHILWOOD K., GREEN J. and LEES D.N. (1998). Monitoring the marine environment for small round structured virus (SRSV) : a new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish. Wat. Sci. Tech., **38**, 51-56.

HUNG T. (1988). *Rotavirus* and adult diarrhea. Adv. Virus Res., **35**, 193-218.

HUNTER P.R. (1994). Drinking water associated disease outbreaks. Microbiol. Europ., **2**, 8-12.

HUTCHESON R.H. (1971). Infectious hepatitis Tennessee. Morb. Mort. Weekly. Rep., **20**, 357.

JAKUBOWSKI J. (1986). U.S. EPA - Sponsored epidemiological studies of health effects associated with the treatment and disposal of wastewater and sewage sludge. In "Epidemiological studies of risks associated with the agricultural use of sewage sludge : Knowledge and needs". BLOCK J.C., HAVELAAR A.H. and L'HERMITTE P. Elsevier applied Science Pub.

KAY D., FLEISHER J.M. and SALMON R.L. (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing : Result from randomized exposure. Lancet, **344**, 905-909.

KHUROO M.S. (1980). Study of an epidemic of non A, non B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from posttransfusion non A, non B type. Am. J. Med., **68**, 818-824.

KOHN M.A., FARLEY T.A., ANDO T., CURTIS M., WILSON S.A., JIN Q., MONROE S.S., BARON R.C., Mc FARLAND L.M. and GLASS R.I. (1995). An outbreak of *Norwalk like virus* gastroenteritis associated with eating raw oysters : implications for maintaining safe oyster beds. J. Am. Med. Ass., **273**, 466-471.

KOOPMAN J.S., ECKERT E.A., GREENBERG H.B., STROHM B.C., ISAACSON R.E. and MONTO A.S. (1982). Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. Am. J. Epidemiol., **115**, 173-177.

KUKKULA M., ARSTILA P., KLOSSNER M.L., MAUNULA L., BONSDORFF C.H., and JAATINEN P. (1997). Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. Scand. J. Infect. Dis., **29**, 415-418.

LAGARDE E., JOUSSEMET M., LATAILLADE J.J. and FABRE G. (1995). Risks factors for hepatitis A infection in France : drinking tap water may be of importance. Eur. J. Epidemiol., **11**, 145-148.

LAWSON H.W., BRAUN M.M., GLASS R.I., STINE S.E., MONROE S.S., ATRASH H.K., LEE L.E. and ENGLENDER S.T. (1991). Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort : role of geological formations in contamination of well water. Lancet, **337**, 1200-1204.

LE GUYADER F., MENARD D., DUBOIS E., HAUGARREAU E., KOPECKA H. and POMMEPUY M. (1997). Use of an internal control to evaluate viral deuration by RT-PCR. Wat. Sci. Tech., **35**, 461-465.

LE GUYADER F., NEILL F.H., ESTES M.K., MONROE S.S., ANDO T. and ATMAR R.L. (1996). Detection and analysis of a small-round structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. Appl. Environ. Microbiol., **62**, 4268-4272.

LEONI E., BEVINI C., DEGLI ESPOSTI S. and GRAZIANO A. (1998). An outbreak of intrafamiliar hepatitis A associated with clam consumption : epidemic transmission to a school community. Eur. J. Epidemiol., **14**, 187-192.

LINCO S.J. and GROHMANN G.S. (1980). The Darwin outbreak of oyster associated viral gastroenteritis. Med. J. Aust., **1**, 211-213.

LINNEMANN C.S., JAFFA R., GARTSIDE P.S., SCARPINO P.V. and CLARK C.S. (1984). Risks of infection associated with a wastewater spray irrigation system used for farming. J. Occup. Med., **26**, 41-44.

LIPPY E.C., and WALTRIP S.C. (1984). Waterborne disease outbreaks - 1946-1980 : a thirty-five-year perspective. J. Am. Water Works Assoc., 60-67.

MARETIC Z., BUREK V., ALAMBASIC K. and COLOBIC V. (1986). An epidemic of hepatitis A in Pula in 1984 due to the eating of mussels. Lijec Viesn., **108**, 305-307.

MARGALITH M., FATTAL B., MORAG A., BEN MOYAL Z. and SHUVAL H.I. (1982).

Antibodies to hepatitis A virus and Coxsackie B₃ virus in agricultural communities exposed to wastewater utilization. In "Viruses and disinfection of water and wastewater". BUTLER M., DEDLON A.R. and MORRIS R. University of Surrey.

MIOSSEC L., LE GUYADER F., HAEGHEBAERT S., GASNIER P.H., BELLIER J.Y., VAILLANT V., CAMUS P., POMMEPUY M., ABOU-SALEH M.J., CLAVELIN P.H., BOBO J.P., MASSON D. et DESENCLOS J.C. (1998). Contamination virale de coquillages responsables d'une épidémie de gastroentérites à Poitiers, Mars 1997, Bull. Epid. Hebdo., **30**, 129-130.

MORSE D.L., GUZEWICH J.J., HANRAHAN J.P., STRICOF R., SHAYEGANI M., DEIBEL R., GRABAU J.C., NOWAK N.A., HERRMAN J.E., CUKOR G. and BLACKLOW N.R. (1986). Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis - Role of Norwalk virus. N. Engl. J. Med., **314**, 678-681.

OHARA H., NARUTO H., WATANABE N. and EBISAWA I. (1983). An outbreak of hepatitis A caused by consumption of raw oysters. J. Hyg., **91**, 163-165.

OISHI I., YAMAZAKI K., KIMOTO T., MINEKAWA Y., UTAGAWA E., YAMAZAKI J., INOUE S., GROHMANN G.S., MONROE S.S., STINE S.E., CARCAMO C., ANDO T. and GLASS R.I. (1994). A large outbreak of acute gastroenteritis associated with Astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. J. Inf. Dis., **170**, 439-443.

O'MAHONY M., GOOCH C.D., SMYTH D.A., THRUSSELL A.J., BARTLETT C.L.R. and NOAH N.D. (1983). Epidemic hepatitis A from cockles. Lancet, **i**, 518-520.

OTTOIENGI A.C., HAMPARIAN V.V., POLLACK J.D. and BOWMAN B.V. (1980). Sewage sludge application to farmland : Human health surveillance studies. Abstracts of the annual meeting of the American Society of Microbiology, Atlanta.

PAYMENT P. (1996). Epidemiology of endemic gastrointestinal and respiratory diseases : Incidence fraction attributable to tap water and cost to society. IAWQ. Health-related water microbiology. Mallorca 1996.

PAYMENT P. and FRANCO E. (1994). Incidence of Norwalk virus infectious during a prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illness. Can. J. Microbiol., **40**, 805-809.

PAYMENT P., FRANCO E., RICHARDSON L. and SIEMIATYCKI J. (1991c). Gastrointestinal health effects associated with the consumption of drinking water produced by point of use domestic reverse osmosis filtration units. Appl. Environ. Microbiol., **57**, 945-948.

PAYMENT P., RICHARDSON L., EDWARDES M., FRANCO E. and SIEMIATYCKI J. (1991b). A prospective epidemiological study of drinking water related gastrointestinal illnesses. Wat. Sci. Tech., **24**, 27-28.

PAYMENT P., RICHARDSON L., SIEMIATYCKI J., DEWAR R., EDWARDES M. and

- FRANCO E. (1991a). Randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. Amer. J. Pub. Health, **81**, 703-708.
- PAYNE S.B., GRILLI E.A. and SMITH A.J. (1984). Investigation of an outbreak of adenovirus type 3 infection in a boy's boarding school. J. Hyg., **93**, 277-283.
- PERRETT K. and KUDESIA G. (1995). Gastroenteritis associated with oysters. Com. Disease Rep., **5**, 153-153.
- PÖNKA A., MAUNULA L., VON BONSDORFF C.H. and LYYTIKÄINEN (1999). Outbreak of *Calicivirus* gastroenteritis associated with eating frozen raspberries. Eurosurveillance, **4**, 66-69.
- RAY R., AGARWAL R., SALUNKE P.N., MEHROTA N.N., TALWAR G.P. and NAIK S.R. (1991). Hepatitis E virus genome in stools of hepatitis patients during large epidemic in North India. Lancet, 438-442.
- ROSENBLUM L.S., MIRKIN I.R., ALLEN D.T., SAFFORD S. and HADLER S.C. (1990). A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. Am. J. Publ. Health, **80**, 1075-1080.
- SHIBATA S.I., KAWAHARA M., FUTONASHI M., KAWAMOTO H. and HIROYOSHI (1999). Case study of food poisoning : detection of human *Calicivirus* genes from feces of patients and cook and food. International Workshop on Human *Caliciviruses*, CDC Atlanta, Mars 1999.
- SHIEH Y.S.C., CALCI K.R. and BARIC R.S. (1999). A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. Appl. Environ. Microbiol., **65**, 4709-4714.
- SHUVAL H.I., GUTTMAN-BASS N., APPLEBAUM J. and FATTAL B. (1989). Aerosolized enteric bacteria and viruses generated by spray irrigation of wastewater. Wat. Sci. Tech., **21**, 131-135.
- SHUVAL H.I., WAX Y., YEKUTIEL P. and FATTAL B. (1989b). Transmission of enteric disease associated with wastewater irrigation : A prospective epidemiological study. Am. J. Publ. Health, **79**, 850-852.
- SUGIEDA M., NAKAJIMA K. and NAKAJIMA S. (1996). Outbreaks of *Norwalk like virus* associated gastroenteritis traced to shellfish : coexistence of two genotypes in one specimen. Epidemiol. Infect., **116**, 339-346.
- TELTSH B. and KATZENELSON E. (1978). Airborne enteric bacteria and viruses from spray irrigation with wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **35**, 290-299.
- TIMOTHY E.M. (1984). Outbreak of infective hepatitis amongst sewage sludge spreaders. CDR 20th January 3.

VOGT R.L. and SATKIN F. (1986). Clam associated gastroenteritis. N. Engl. J. Med., **315**, 582-583.

WARNER R.D., CARR R.W., Mc CLESKEY F.K., JOHNSON P.C., GOLDY ELMER L.M. and DAVISON V.E. (1991). A large nontypical outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with exposing celery to non potable water and with *Citrobacter freundii*. Arch. Intern. Med., **151**, 2419-2424.

WONG D.C., PURCELL R.H., SREENIVASAN M.A., PRASAD S.R. and PAVRI K.M. (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India : Evidence for a non A, non B hepatitis virus aetiology. Lancet, **82**, 876-879.

Chapitre 9

EVALUATION DU RISQUE VIRAL D'ORIGINE HYDRIQUE POUR LA SANTÉ HUMAINE

La connaissance d'un certain nombre de critères est essentielle pour pouvoir réaliser une estimation du risque viral lié à l'utilisation d'eaux usées ou de boues d'épuration en agriculture.

D'abord, ce sont des critères épidémiologiques qui permettent de déterminer s'il y a une relation de cause à effet entre la réutilisation d'eaux usées et de boues contaminées par des virus et la survenue d'épidémies ou de cas isolés de maladies à virus dans la population.

Ensuite, ce sont des critères ayant trait à la qualité sanitaire du milieu hydrique. Il s'agit là de résultats analytiques qui permettent de déterminer le niveau de contamination virale des eaux, des boues, des coquillages, des produits maraîchers... Ce niveau de contamination peut être déterminé, soit directement par mise en évidence des virus pathogènes pour l'homme, soit indirectement par la recherche d'indicateurs de contamination virale. Actuellement la détermination de la qualité sanitaire du milieu hydrique est essentiellement réalisée par la mise en évidence et la quantification d'indicateurs bactériens de contamination fécale.

Enfin, ce sont des critères d'infectiologie prenant en compte les notions fondamentales de dose minimale infectieuse, d'infection et de maladie.

Compte tenu de toutes ces données, des réglementations ont été promulguées de façon à contrôler la qualité sanitaire des eaux usées, des boues et des coquillages.

1. Contrôle virologique des eaux usées, des boues et des coquillages

En ce qui concerne les eaux usées, le contrôle et la surveillance virologique reposent essentiellement sur des données bactériologiques et/ou parasitologiques qui découlent des recommandations O.M.S. (1989) (Tableau 50).

Le critère virologique n'y est pas envisagé et, à travers le monde, la seule législation qui prenne en compte ce critère est celle de l'état d'Arizona (U.S.A.) qui, en 1984, a édicté les normes suivantes :

- 1) Standards pour les zones où l'irrigation est soumise à des conditions restrictives :

125 virus entériques 40 L⁻¹

- 2) Standards pour les zones où l'irrigation n'est pas soumise à des conditions restrictives :

1 virus entériques 40 L⁻¹.

En ce qui concerne les boues issues de station d'épuration d'eaux usées et destinées à être valorisées, la réglementation est variable selon les pays. Certains d'entre eux imposent de faibles contraintes concernant le traitement des boues et ne définissent pas de normes sanitaires en terme de concentration en germes pathogènes. D'autres laissent libre choix du mode de traitement d'hygiénisation des boues mais exigent soit une surveillance de la qualité microbiologique des boues, soit une validation initiale du process puis une surveillance régulière de la qualité des boues.

Ces différentes réglementations sont rassemblées dans le tableau 51. Il apparaît que parmi ces législations, deux au moins prennent en compte le paramètre "virologie".

La législation américaine est la plus complète puisqu'elle préconise des traitements permettant d'atteindre une bonne qualité sanitaire et qu'elle indique des valeurs limites en terme de concentration en microorganismes. Ainsi les boues de classe A doivent présenter une concentration en virus entériques inférieure à 1 UFP pour 4 grammes de matières sèches (MS).

En France la législation (arrêté du 8 janvier 1998) exige que les process d'hygiénisation des boues permettent d'obtenir des boues contenant moins de 3 NPPUC d'*Entérovirus* par 10 g de MS (validation du process). Au cours du fonctionnement de ces process la qualité des boues est seulement vérifiée par la teneur en coliformes thermotolérants dont la concentration est comparée à celle obtenue lors de la validation.

Tableau 50 - Directives concernant la qualité microbiologique des eaux usées dans l'agriculture
(d'après WHO, 1989)

CONDITIONS D'UTILISATION	GROUPE EXPOSÉ	NEMATODES INTESTINAUX* (moyenne arithmétique du nombre d'oeufs par litre)	COLIFORMES FECAUX (moyenne géométrique du nombre par 100 mL)	TYPE DE TRAITEMENT SUSCEPTIBLE DE REALISER LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE
a) Irrigation de produits susceptibles d'être consommés crus, des terrains de sport et des parcs publics**	Travailleurs Consommateurs Public	≤ 1	≤ 1000	Lagunage en série étudié pour réaliser l'épuration biologique requise, ou autre traitement équivalent.
b) Irrigation de céréales, cultures industrielles, arbres fruitiers***, fourrages, pâtures, reboisements.	Travailleurs	≤ 1	Pas de norme	Durée de rétention minimale 8-10 j dans un système de lagunage ou autre traitement équivalent au point de vue efficacité microbiologique.
c) Irrigation par systèmes n'entraînant pas d'exposition des travailleurs ni du public (ex : goutte à goutte souterrain, etc.)	Aucun	Pas de norme	Pas de norme	Pré-traitement exigé par la technique d'irrigation et au moins sédimentation primaire.

* *Ascaris*, Trichocéphales, Ankylostomes.

** Une norme plus stricte (<200 coliformes fécaux par 100 mL) sera appliquée à l'irrigation des gazons, comme ceux des hôtels, avec lesquels le public peut être directement en contact.

*** L'irrigation devra cesser deux semaines avant la cueillette des fruits et les fruits tombés au sol ne seront pas ramassés. L'aspersion ne sera pas autorisée.

Tableau 51 Réglementations de la valorisation agricole des boues résiduaires urbaines dans différents pays (d'après Gaspard, 1995)

PAYS	TRAITEMENTS PRECONISES (par les textes réglementaires nationaux)	NORMES (volet microbiologique)
Union Européenne (1986)	• Traitement des boues par voie biologique, chimique, thermique, stockage ou autres procédés particuliers	---
FRANCE (1998)	• Boues hygiénisées - Validation du process - Contrôle de la qualité	Salmonelles < 8 NPP 10 MS ⁻¹ <i>Entérovirus</i> < 3 NPPUC 10 g MS ⁻¹ Œufs d'helminthes pathogènes viables < 3 10 g MS ⁻¹ Quantification des coliformes thermotolérants Tous les 15 jours quantification des coliformes thermotolérants et comparaison avec la valeur obtenue lors de la validation du process
ALLEMAGNE (1992)	• Boues stabilisées	---
DANEMARK (1989)	• Traitement thermique (70°C pendant 1h) ou traitement similaire • Compostage : T° de 55°C pendant au moins 15 j. • Chaulage / digestion aérobie et anaérobie / compostage	---
SUISSE (1992)	---	- < 100 Entérobactéries / g - aucun œuf d'Helminthe susceptibles d'être infectieux
USA (1992)	BOUES DE CLASSE A • Traitement visant à réduire l'attraction de vecteurs • Traitement visant à contrôler le redéveloppement des microorganismes • Traitement visant à atteindre les objectifs sanitaire de classe A - Traitement thermique - Traitement thermique à pH élevé - Traitement utilisant les PFRP* ou traitement équivalent - Traitement par un procédé différent ou inconnu (analyses portant sur les germes témoins obligatoires).	- <i>Salmonella sp</i> : < 3 NPP / 4 g de MS - Virus entériques : < 1 PFU / 4 g de MS - Oeufs d'helminthe viables : < 1 / 4 g de MS
	BOUES DE CLASSE B • Traitement visant à réduire l'attraction des vecteurs • Traitement visant à atteindre les objectifs sanitaires de classe B - Traitement utilisant les PSRP** ou un traitement équivalent	Coliformes fécaux : < 2.10 ⁶ / g de MS

* Process to further reduce pathogen

** Process to significantly reduce pathogen

En ce qui concerne la surveillance des coquillages et des eaux conchylicoles, elle est uniquement fondée sur des analyses bactériologiques, le paramètre virologique n'est jamais pris en compte. Le contrôle microbiologique est fondé sur la recherche de coliformes fécaux (C.F.) ou d'*E. coli*. Ainsi la directive européenne (Directive 91/492 et 91/493) précise que les coquillages vivants destinés à la consommation humaine immédiate doivent contenir moins de 300 coliformes fécaux ou moins de 230 *E. coli* pour 100 grammes de chair et de liquide intervalvaire sur la base d'un test NPP. De plus, ils doivent être exempts de salmonelles dans 25 grammes de chair.

Il en est de même pour le classement des zones conchylicoles. le littoral conchylicole est divisé en zones sur la base des quantités de coliformes fécaux isolés des coquillages issus de ces zones. Il s'agit :

- des zones de statuts sanitaire "a" (les coquillages contiennent moins de 300 CF par 100 g) au niveau desquelles les récoltes sont licites et consommables directement.
- des zones de statut sanitaire "b" (les coquillages contiennent moins de 6000 CF par 100 g) au niveau desquelles les récoltes sont licites mais consommables seulement après dépuración.
- des zones de statut sanitaire "c" (les coquillages contiennent moins de 60 000 CF par 100 g) au niveau desquelles les récoltes sont licites mais ne sont consommables qu'après une purification naturelle par reparcage d'au moins 2 mois.

Cette absence relative de contrôle virologique est due au fait que l'isolement et la quantification en routine de virus entériques humains dans les eaux, les boues et les coquillages présentent de nombreuses difficultés et limites.

La recherche des virus infectieux dans le cadre d'un contrôle sanitaire de routine pose de gros problèmes.

La seule méthode permettant de détecter des virus entériques infectieux est fondée sur l'isolement sur cultures cellulaires *in vitro*. Or, c'est une technique lourde, longue et coûteuse. De plus elle ne permet pas de détecter tous les virus du milieu hydrique. En effet, certains virus ne se multiplient pas sur systèmes cellulaires (Norwalk-like virus, Sapporo-like virus) ou se multiplient mal ou très lentement (HAV, *Rotavirus*). Certes il est possible de mettre en évidence l'acide nucléique viral par RT-PCR qui est une technique rapide, très sensible et relativement peu coûteuse. Cependant, la présence de génome dans un milieu hydrique ne peut pas, dans l'état actuel des connaissances, être considérée comme témoin de la présence d'un virus infectieux. Elle peut simplement signifier que l'eau, la boue ou les coquillages analysés sont ou ont été soumis à une contamination virale.

Par ailleurs, compte-tenu de la densité virale et de l'état très souvent adsorbé des virus dans le milieu hydrique, il est nécessaire, avant de procéder à l'isolement, de concentrer les virus à partir d'importants volumes d'eaux ou de les extraire à partir de boues ou de tissus de coquillages, ce qui ajoute à la complexité de l'analyse.

Compte-tenu de la difficulté sinon de l'impossibilité de détecter en routine les virus entériques infectieux, la surveillance virologique des milieux hydriques pourrait être fondée sur la détection d'organismes indicateurs de la présence de virus entériques humains.

2. Indicateurs de contamination virale

Ces organismes devraient d'une part être les témoins de la présence de virus entériques humains, d'autre part constituer des indicateurs du fonctionnement ou de l'efficacité d'un traitement d'épuration ou de désinfection.

L'indicateur idéal de contamination virale devrait satisfaire aux conditions suivantes :

- l'indicateur doit toujours être présent quand les virus entériques sont présents,
- l'apparition et la persistance de l'indicateur et des virus entériques doivent être similaires,

- l'indicateur et les virus entériques doivent se trouver dans un rapport constant et le dénombrement de l'indicateur doit donner une bonne estimation du nombre de virus pathogènes présents,
- l'indicateur doit être présent à des taux supérieurs à ceux des virus entériques,
- l'indicateur doit être résistant aux stress de l'environnement et aux désinfectants dans les mêmes proportions que les virus entériques,
- l'indicateur doit être non pathogène et facilement quantifiable,
- l'indicateur doit être facilement détectable et à faible coût dans tous les types d'échantillons.

2.1. Indicateurs bactériens

Au titre d'indicateur de contamination fécale différentes bactéries peuvent être envisagées.

Les coliformes totaux sont encore utilisés comme indicateurs de la qualité de l'eau mais en fait ce sont de piètres témoins de contamination fécale.

Les coliformes thermotolérants ou fécaux qui sont capables de fermenter le lactose à 44°C sont de meilleurs témoins de contamination mais le terme « fécal » n'est pas toujours approprié. Ainsi, HAVELAAR (1993) montre qu'en Finlande la majorité des coliformes thermotolérants détectés dans une eau provenait d'eaux usées d'industries de bois et de papier. De plus, leur durée de survie est très inférieure à celle des virus.

Escherichia coli (*E. coli*) est recommandé par l'OMS comme indicateur de contamination fécale dans le cadre de la vérification de la qualité du traitement de l'eau. Cette bactérie ne se

multiplierait pas dans l'environnement mais uniquement dans le tractus digestif de l'homme et des animaux à sang chaud. De ce fait, il y aurait une bonne corrélation entre la concentration en *E. coli* et la pollution fécale (BORREGO *et al.*, 1987) Cependant la durée de survie de ce microorganisme dans les eaux superficielles est plus faible que celle des *Entérovirus* (NASSER *et al.*, 1993).

En fait l'utilisation des coliformes et d'*E. coli* comme indicateur de la qualité virologique d'une eau est très largement critiquée et plusieurs études ont montré qu'il n'y avait pas de relation quantitative entre leur concentration et celle en *Entérovirus* (WHEELER, 1990).

Les Streptocoques fécaux et en particulier les espèces appartenant au genre *Enterococcus* sont considérés comme des indicateurs spécifiques de contamination fécale. En effet, ils se multiplient rarement dans l'environnement, ils résistent mieux aux conditions défavorables que les coliformes notamment en eau de mer (GRABOW and CAUBROUGH, 1986 ; CORNAX *et al.*, 1991) et, sur le plan épidémiologique, certains travaux (CABELLI *et al.*, 1983 ; MERRETT-JONES *et al.*, 1991 ; KAY *et al.*, 1994) tendraient à montrer qu'ils sont corrélés aux gastroentérites liées aux baignades. Dans les sédiments et, en cas de pollution récente, BOSCH *et al.*, (1988) ont noté une corrélation entre les taux de streptocoques fécaux et d'*Entérovirus*.

En fait, les entérocoques sont parfaitement adaptés à l'évaluation de la qualité bactériologique d'une eau mais ils sont peu adaptés en ce qui concerne la qualité virologique du milieu hydrique.

La situation est identique en ce qui concerne les coquillages. Il existe en effet beaucoup de données analytiques (GOYAL *et al.*, 1978 ; BERG and METCALF, 1978 ; GERBA *et al.*, 1979 ; MARZOUK *et al.*, 1980 ; VAUGHN *et al.*, 1980 ; SCHWARTZBROD *et al.*, 1985) et épidémiologiques (PORTNOY *et al.*, 1975 ; CRAUN, 1978 ; STETLER *et al.*, 1992) qui montrent que des eaux et des fruits de mer considérés comme conformes aux normes bactériologiques contenaient des virus entériques humains.

Clostridium perfringens a aussi été proposé. Cette bactérie anaérobie stricte ne se multiplie que dans le tractus intestinal d'animaux à sang chaud et ses spores résistent remarquablement aux conditions défavorables, beaucoup mieux que les virus entériques. Cependant, du fait de cette très forte résistance, *Clostridium* s'avère être un indicateur trop conservatif et se révèle non corrélé avec les virus entériques.

Au titre d'indicateur d'efficacité de traitement, il apparaît que les coliformes thermotolérants et *E. coli* sont plus sensibles à l'action des désinfectants que les virus entériques (HAVELAAR and HOGEBOM, 1984 ; BOSCH *et al.*, 1989). De même les streptocoques fécaux sont plus sensibles au chlore que les *Entérovirus* (HAVELAAR and HOGEBOM, 1987).

En règle générale, les indicateurs bactériens sont plus sensibles aux agents désinfectants que les virus entériques (SOBSEY, 1989 et chapitre 4).

Compte-tenu de ces divers éléments il est clair que le risque viral n'est pas spécifiquement pris en compte par les indicateurs bactériens et qu'il est hautement souhaitable d'utiliser un indicateur plus représentatif de la contamination virale.

2.2. Indicateurs viraux

Trois possibilités peuvent être envisagées à ce niveau et sont fondées sur la détection soit des *Entérovirus*, soit du génome des virus entériques, soit de bactériophages.

2.2.1. Les Entérovirus

Partant du principe que le meilleur indicateur de la présence de virus entériques était un virus entérique, il a été proposé d'utiliser les *Entérovirus* comme indicateur. Ceci a été adopté par la Communauté Européenne qui, en ce qui concerne le contrôle de qualité des eaux récréationnelles, a inclus les *Entérovirus* parmi les microorganismes indicateurs en précisant qu'il devait y avoir absence d'*Entérovirus* dans 10 litres d'eau dans 95 % des échantillons. (Directive 76/160/EEC). Cependant un certain nombre d'études montre qu'il n'y a pas de relations entre la présence d'*Entérovirus* et celle de virus de gastroentérites, notamment dans les eaux récréationnelles (FLEISHER *et al.*, 1996).

De plus, il a été montré que, dans le milieu hydrique, il y avait des différences sensibles de comportement entre les *Entérovirus* et les autres virus entériques notamment les virus des gastroentérites. Ainsi, les *Rotavirus* survivent plus longtemps dans l'eau que les *Poliovirus* (PANCORBO *et al.*, 1987 ; RAPHAEL *et al.*, 1985) ils présentent une résistance plus grande aux

ultraviolets et à l'ozone que les *Poliovirus* mais à l'inverse sont plus sensibles à l'inactivation par le chlore et le dioxyde de chlore.

Enfin, la mise en évidence d'*Entérovirus* infectieux nécessite l'isolement sur des cultures cellulaires, opération longue, coûteuse et difficile à réaliser en routine.

Dans ces conditions il apparaît que les *Entérovirus* infectieux ne peuvent être préconisés comme indicateur usuel de contamination du milieu par les virus entériques.

2.2.2. Le génome des virus entériques

D'autres auteurs (GANTZER, 1996) ont émis l'hypothèse que la détection de génome viral pourrait être considérée comme un témoignage de contamination virale. Il est vrai que cette mise en évidence d'acide nucléique viral par Polymerase Chain Reaction, précédée d'une retro-transcription pour les génomes à ARN, (RT-PCR) est rapide, relativement peu coûteuse, très sensible et réalisable en routine. Il semble cependant que la présence de génome puisse être détectée dans l'eau pendant une durée 2 fois plus longue que le virus infectieux notamment en présence de matières en suspension telles que l'argile (GANTZER, 1996). Or, la durée de persistance d'un ARN dans une eau naturelle étant au maximum de 2 jours (TSAI *et al.*, 1995) il est plus que vraisemblable que l'ARN viral retrouvé est encapsidé mais que ces capsides ne sont plus capables de provoquer une infection cellulaire.

Il apparaît donc que la présence de génome dans le milieu hydrique ne peut être considérée comme le témoin de la présence de virus infectieux. Par contre elle peut parfaitement indiquer que l'eau, la boue ou les coquillages analysés sont ou ont été soumis à une contamination virale.

Encore faudrait-il dans ce cas rechercher non pas le génome d'un seul genre viral mais le génome de l'ensemble des virus pathogènes susceptibles d'être présents dans le milieu hydrique ou des plus importants d'entre eux sur le plan clinique. Dans l'état actuel des choses la présence de génome viral pourrait être considérée comme un témoin de contamination virale mais pas comme un témoin de présence de virus infectieux.

2.2.3. Les bactériophages

Certains bactériophages constituent des candidats sérieux au titre d'indicateurs de contamination virale. Il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages à ARN F-spécifiques et des bactériophages de *Bacteroides fragilis* (GERBA, 1987 ; JOFRE, 1991...).

2.2.3.1 Coliphages somatiques

Les coliphages somatiques constituent un ensemble très hétérogène, ils infectent certaines souches d'*E. coli* par adsorption sur des récepteurs présents au niveau des parois cellulaires. Depuis les travaux de KOTT (1966) qui démontrent que les coliphages sont plus résistants que les coliformes dans l'environnement, ce groupe de phages est étudié en vue de son utilisation en tant qu'indicateur de contamination virale. Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 52.

Tableau 52 Fréquence de détection et moyenne des concentrations des coliphages somatiques dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes (d'après HAVELAAR, 1993)

Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations
Fèces humaines	20 - 90 %	$10^4 - 10^6$ UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	75 - 100 %	10^4 UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	30 - 100 %	$10^1 - 10^7$ UFP.g ⁻¹ .
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	60 - 90 %	10^6 UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux sauvages (Lièvres, oiseaux)	0 - 40 %	-
Eaux usées brutes domestiques	-	$10^2 - 10^5$ UFP.mL ⁻¹
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	$10^2 - 10^5$ UFP.mL ⁻¹

Ils ont l'avantage d'être abondants dans les selles humaines, en moyenne 10^4 UFP g^{-1} à 10^6 UFP g^{-1} , (HAVELAAR *et al.*, 1986) et dans les eaux usées, en moyenne de 10^3 à 10^4 UFP mL^{-1} (FUNDERBURG and SORBA, 1985). La fréquence de leur présence dans les selles est variable selon les pays, ceci pouvant être dû à une bactérie hôte moins sensible.

Ils présentent l'inconvénient de ne pas être spécifiques des selles humaines. Ils ont pu être détectés dans les selles d'animaux de ferme à des fréquences variant de 30 à 100 % selon l'espèce (HAVELAAR *et al.*, 1990) dans les selles d'animaux de zoo à des fréquences variant de 60 à 90 % (OSAWA *et al.*, 1981) et dans les selles d'animaux sauvages tel que le lièvre et les oiseaux à des fréquences de 0 à 40 %.

De plus, plusieurs auteurs ont démontré la possibilité pour ces coliphages de se multiplier en présence de leur bactérie hôte dans des eaux de mer (BORREGO *et al.*, 1990) ou des eaux de rivière (PARRY *et al.*, 1981).

Par ailleurs, les coliphages somatiques sont moins résistants que les virus entériques vis à vis du chlore (HAVELAAR *et al.*, 1987) et des UV (NIEUWSTAD *et al.*, 1991).

La faible spécificité humaine, leur multiplication possible dans l'environnement constituent des inconvénients pour l'utilisation de ce type de phages comme indicateur de contamination virale mais ils ont l'avantage d'être abondants dans les selles et pourraient être utilisés en tant qu'indicateurs de contamination fécale.

2.2.3.2. Bactériophages à ARN F-spécifiques

Les bactériophages à ARN F-spécifiques qui appartiennent à la famille des *Leviviridae* infectent certaines souches de bactéries au niveau des pili sexuels. Les pili sexuels ne se forment pas à des températures inférieures à $30^{\circ}C$, ces phages ont de faibles chances de se multiplier dans l'environnement (HAVELAAR and HOGEBOM, 1984 ; IAWPRC, 1991).

Ce groupe de phages ne se multiplierait donc que dans le tractus intestinal de l'homme et d'animaux à sang chaud (HAVELAAR *et al.*, 1990). Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 53.

Tableau 53

Fréquence de détection et moyenne des concentrations de phages à ARN F-spécifiques dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes (d'après HAVELAAR, 1993).

Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations
Fèces humaines	0 - 57 %	$10 - 10^3$ UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	11 - 75 %	30 UFP.g ⁻¹ .
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	0 - 100 %	$10 - 10^6$ UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	0 - 65 %	-
Fèces d'animaux sauvages (Lièvres, oiseaux)	0 - 73 %	$0 - 10^3$ UFP.g ⁻¹
Eaux usées brutes domestiques	-	$10^2 - 10^4$ UFP.mL ⁻¹
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	$10^2 - 10^4$ UFP.mL ⁻¹

Ils sont détectés dans les selles humaines en relativement faible concentration de 10 à 10^3 UFP g⁻¹ (HAVELAAR,1993) et à des fréquences très variables (de 0 à 57%). Dans les eaux usées, ils sont retrouvés à des concentrations variant de 10^2 à 10^4 UFP mL⁻¹ (HAVELAAR *et al.*, 1986 ; KFIR *et al.*, 1991).

Les bactériophages à ARN F-spécifiques pourraient constituer de bons indicateurs de contamination fécale animale et humaine. Cependant les résultats concernant la corrélation entre ces phages et les *Entérovirus* dans l'environnement sont contradictoires. Ainsi HAVELAAR *et al.* (1993) soulignent l'existence d'une corrélation significative entre ces deux paramètres dans différents types d'eau douce, alors que VILAGINES *et al.* (1997) observent l'inverse dans des eaux de fleuve et au cours d'un traitement d'eaux usées. En effet, ces auteurs, analysant des eaux usées avant et après traitement dans une station d'épuration et recherchant les *Entérovirus*, les bactériophages à ARN F-spécifiques, les coliformes et streptocoques fécaux, montrent que les

virus entériques détectables en cultures cellulaires franchissent plus aisément les barrières de traitement de la station d'épuration que les bactériophages à ARN F-spécifiques, les coliformes et les streptocoques fécaux. De ce fait ils estiment qu'il n'existe aucune corrélation significative entre les différents microorganismes étudiés et que les bactériophages à ARN F-spécifiques ne peuvent prétendre jouer le rôle d'indicateur de la présence de virus entériques.

Cependant d'après CHUNG *et al.*, (1998) les coliphages F+ peuvent être considérés comme des indicateurs valables de la présence de virus entériques dans les coquillages et d'une contamination fécale des eaux marines conchylicoles.

2.2.3.3. Phages de *Bacteroides fragilis*

L'utilisation des phages de *Bacteroides fragilis* (famille des *Siphoviridae*) en tant qu'indicateur de contamination virale a été initialement proposée par JOFRE *et al.*, (1986). *Bacteroides fragilis* est un hôte normal du tractus intestinal de l'homme et des animaux à sang chaud et les bactériophages correspondant sont eux aussi présents dans les selles.

Plus particulièrement il est apparu que les phages de la souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 étaient très spécifiques des fèces de l'homme (JOFRE *et al.*, 1986 ; TARTERA *et al.*, 1989). De nombreuses études ont montré que ce phage n'était pas retrouvé dans les selles d'animaux (TARTERA and JOFRE, 1987). Enfin, ces phages n'ont pas été isolés dans les eaux usées d'abattoir. Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 54. Ces phages sont présents dans les selles humaines à des concentrations très variables de 10^2 à 10^8 UFP g^{-1} et à des fréquences variant de 0 à 15% (JOFRE, 1991 ; GANTZER *et al.*, 1998). Dans les eaux usées, leur concentration est de l'ordre de 10 à 10^4 UFP mL^{-1} (TARTERA *et al.*, 1988 ; CORNAX *et al.*, 1991).

De par la faible résistance de la bactérie hôte (*Bacteroides fragilis*), dans l'environnement, ce type de phage ne peut pas se multiplier dans l'environnement (JOFRE *et al.*, 1986) et en fait, les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 n'ont pu être détectés que dans des eaux polluées par des selles humaines. Il faut cependant préciser qu'il semble exister une variation des types de bactériophages de *Bacteroides fragilis* retrouvés dans l'eau en fonction de

la localisation géographique. De ce fait, il paraît vraisemblable que la souche bactérienne utilisée pour leur mise en évidence puisse être différente d'un pays ou d'un continent à un autre.

D'ailleurs une nouvelle souche réceptrice décrite par PUIG (1998) la souche RYC 2006, permet de mettre en évidence de 4 à 65 fois plus de bactériophages que la souche HSP 40 (MUSSEAU *et al.*, 1999) selon les milieux analysés mais les phages ainsi isolés ne sont pas spécifiques de l'espèce humaine comme le sont les phages isolés sur la souche HSP 40.

Dans les eaux (eaux usées, eaux de surface, eau d'alimentation), l'inactivation naturelle de ces bactériophages est plus lente que celle des coliphages et des bactéries indicatrices de contamination fécale (LUCENA *et al.*, 1996 ; SUN *et al.*, 1997). Enfin, dans les sédiments marins, LUCENA *et al.*, 1996 ont montré, qu'il existait une corrélation significative entre bactériophages de *Bacteroides fragilis* et *Entérovirus*.

Les bactériophages de *Bacteroides fragilis* pourraient être considérés comme de bons indicateurs mais ils présentent l'inconvénient majeur d'être présent en très faible quantité (CHUNG *et al.*, 1998). De plus, leur mise en évidence est moins simple que celle des autres bactériophages.

Tableau 54
Fréquence de détection et moyenne des concentrations des phages de *Bacteroides fragilis*
dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes
(d'après HAVELAAR, 1993)

Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations
Fèces humaines	0 - 15 %	$10^2 - 10^8$ UFP.g ⁻¹
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	0 %	-
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	0 - 5 %	-
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	0 - 7 %	-
Eaux usées brutes domestiques	-	$10 - 10^4$ UFP.mL ⁻¹
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	non détecté

3. Indicateur d'efficacité de traitement sur le plan virologique

Compte-tenu de la grande sensibilité des indicateurs bactériens aux traitements de désinfection, seules trois entités virales peuvent être prises en compte en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement sur le plan virologique. Il s'agit des *Enterovirus*, du génome viral et des bactériophages.

3.1. Entérovirus

Les *Entérovirus* ont été proposés et utilisés comme indicateur d'efficacité de traitement essentiellement parce qu'ils sont relativement faciles à cultiver sur cultures cellulaires et que de nombreux travaux les prennent comme référence.

Cependant, il a été montré que, dans le milieu hydrique, il y avait des différences sensibles de comportement entre les *Entérovirus* et les autres virus entériques notamment les virus des gastro-entérites. Ainsi, si les *Rotavirus* survivent plus longtemps dans l'eau que les *Poliovirus* (PANCORBO *et al.*, 1987 ; RAPHAEL *et al.*, 1985), ils présentent une résistance plus grande aux ultraviolets et à l'ozone que les *Poliovirus* mais à l'inverse sont plus sensibles à l'inactivation par le chlore et le dioxyde de chlore.

Les *Enterovirus* ne sont donc pas représentatifs de l'ensemble des virus entériques.

3.2. Génome viral

Il peut être envisagé de déterminer l'efficacité d'un traitement en recherchant la présence ou l'absence de génome viral en particulier pour les virus non ou difficilement cultivables (*Norwalk-like virus*, *Sapporo-like virus*, *Rotavirus* humains).

Cependant, la réponse obtenue est du type "tout ou rien". En effet, l'absence de génome viral (en admettant une efficacité à 100 % de la PCR et une absence d'inhibiteurs de la réaction enzymatique dans le milieu analysé) témoignent à coup sûr de l'absence de virus infectieux. Par contre la présence de génome viral après traitement ne signe pas obligatoirement l'inefficacité du traitement. Il est en effet possible d'observer la présence de génome viral en l'absence de toute particule virale infectieuse (GANTZER *et al.*, 1998 et chapitre 3).

L'interprétation des résultats fondés sur le critère génome viral pour déterminer l'efficacité d'un traitement vis à vis de virus entériques non cultivables, doit donc être faite avec beaucoup de précautions.

3.4. Bactériophages

Les 3 types de bactériophages candidats au titre d'indicateur de contamination virale le sont aussi au titre d'indicateur d'efficacité de traitement.

Au cours des traitements d'épuration des eaux usées, la proportion de phages éliminés varie selon la nature du traitement.

Ainsi, ce pourcentage varie de 0 % à 83 % pour la sédimentation primaire (SHERMAN *et al.*, 1975 ; IGNAZZITO *et al.*, 1980), de 11 % à 98 % pour les boues activées (NAPARSTED *et al.*, 1976 ; BITTON *et al.*, 1983), de 20 % à 90 % pour les lits bactériens (SHERMAN *et al.*, 1975 ; KOTT *et al.*, 1978) et de 0 % à 94 % au cours du lagunage (BELL, 1976 ; BAYLET *et al.*, 1980). En fait, d'après AYRES (1977) et NIEUWSTAD *et al.*, (1988) le pourcentage d'élimination des phages est plus faible que celui des bactéries indicatrices et très proche de celui des virus animaux.

Cependant, la proportion de phages éliminés varie aussi considérablement en fonction du type de phage envisagé. Ainsi GANTZER *et al.*, (1998) ont montré par exemple que, plus le niveau de traitement des eaux usées augmente, plus la concentration en coliphages diminue mais cette densité demeure non négligeable ($1,4.10^3$ UFP L⁻¹) même dans des eaux traitées de qualité satisfaisant les normes européennes alors que les phages de *Bacteroides fragilis* sont indétectables dans ce même type d'eaux.

Pour ces mêmes auteurs, les coliphages somatiques ne constituent pas de bons indicateurs d'efficacité de traitement alors que les phages de *Bacteroides fragilis* pourraient constituer de bons témoins, leur comportement étant proche de celui des *Entérovirus* au cours des traitements. Ceci est confirmé par d'autres travaux, ainsi, dans les eaux usées (LUCENA *et al.*, 1996) après traitement tertiaire incluant une chloration, la survie des bactériophages de *Bacteroides fragilis* s'est révélée plus importante que celle des *Entérovirus*. De même des études effectuées par JOFRE *et al.*, (1995) sur des filières de potabilisation d'eau ont montré que les *Entérovirus* sont plus efficacement éliminés que ces bactériophages.

En fait, d'après JOFRE *et al.*, (1989) les phages de *Bacteroides fragilis* ont un comportement vis à vis des traitements d'épuration proche de celui des virus entériques.

Les bactériophages ARN F spécifiques seraient de bons indicateurs de l'efficacité des traitements d'épuration des virus entériques dans les eaux résiduaires (HAVELAAR, 1987). Mais VILAGINES *et al.*, (1997) considèrent que les virus entériques détectables en cultures cellulaires franchissent plus aisément les barrières de traitement de la station d'épuration que les bactériophages à ARN F-spécifiques, les coliformes et les streptocoques fécaux.

L'emploi des bactériophages comme indicateur de la désinfection des eaux usées a été aussi envisagé. Il est d'ores et déjà admis que la résistance des phages aux procédés classiques de désinfection (chlore, ozone, rayons ultra-violet) est plus grande que celle des bactéries indicatrices (PETRASEK *et al.*, 1980 ; SNEAD *et al.*, 1980 ; TAYLOR, 1982 ; HAVELAAR *et al.*, 1987 ; HAVELAAR, 1987 ; TARTERA *et al.*, 1988). Ainsi, pour un traitement avec 3 à 5 mg de chlore par litre d'eaux usées épurées, l'abattement est de 0,05 à 0,5 log pour les bactériophages ARN F spécifiques, de 0,4 à 1,3 log pour les coliphages somatiques et de 2 à 4 log pour *E. coli* (HAVELAAR, 1987).

En ce qui concerne la comparaison du degré de résistance aux désinfectants des phages d'une part et des virus entériques pathogènes d'autre part, un certain nombre de travaux a été effectué. Ainsi, HALL and SOBSEY (1993), travaillant en tampon phosphate sans demande d'oxydant et à 5° C, montrent que, avec 2 mg L⁻¹ d'ozone, l'inactivation du virus de l'hépatite A et du coliphage F spécifique MS2 était respectivement supérieure à 4 log et à 3,8 log après 5-10 secondes.

KESWICK *et al.*, (1985) constatent que, à des doses de 3,75 ou 6,25 mg L⁻¹ de chlore libre pendant 30 minutes, le virus de Norwalk et le bactériophage f2 ne sont pas complètement inactivés, contrairement au *Poliovirus* et au *Rotavirus* Wa. Le bactériophage f2 présenterait donc une sensibilité comparable à celle du virus de Norwalk.

Il a été montré par TARTERA *et al.*, (1988) que, après traitement d'une eau de robinet avec 2,3 mg de chlore par litre pendant 10 minutes, on réduit de 90 % les phages de *Bactéroides fragilis*, de 99 % les *Poliovirus* et de 99,9 % les coliphages f2.

En ce qui concerne l'irradiation par les rayons ultra-violet, le coliphage f2 (bactériophage ARN F spécifique) a une résistance plus importante que les *Poliovirus* (1,7 à 3,5 fois) (HAVELAAR *et al.*, 1987). De même BOSCH *et al.*, (1989) constatent que le phage f2 est plus résistant aux UV que le *Poliovirus* 1, le *Rotavirus* SA 11 et le phage de *Bactéroides fragilis*.

En résumé, il est possible d'indiquer que :

- les coliphages somatiques sont moins résistants que les virus entériques vis à vis du chlore (HAVELAAR *et al.*, 1987) et des UV (NIEUWSTAD *et al.*, 1991).

- les bactériophages à ARN F spécifiques offrent une résistance variée vis à vis des désinfectants. Le phage f2 est plus sensible au chlore libre que certains virus tels que le *Poliovirus* 1 et le *Rotavirus* (BOSCH *et al.*, 1989) par contre sa sensibilité aux chloramines est identique à celle des *Entérovirus* (HAVELAAR *et al.*, 1987). Ces phages sont par contre très résistants au traitement par les UV (WIEDENMANN *et al.*, 1993 ; BATTIGELLI *et al.*, 1993).

- les phages des *Bacteroides fragilis* ont une résistance au chlore supérieure à celle des *Poliovirus* , *Rotavirus* et virus de l'hépatite A (BOSCH *et al.*, 1989 ; ABAD *et al.*, 1994) Par contre ils semblent plus sensibles au traitement par les UV (BOSCH *et al.*, 1989).

Sur un plan global et en ce qui concerne l'utilisation éventuelle des bactériophages comme indicateur il apparaît (GRABOW *et al.*, 1998) que :

- Les bactériophages, la plupart du temps, surestiment les virus humains infectieux détectés par cultures cellulaires.
- Les bactériophages survivent dans l'ensemble au moins aussi longtemps que les virus humains dans les milieux hydriques et dans les conditions environnementales habituelles.
- Les bactériophages sont au moins aussi résistants aux traitements d'épuration et de désinfection que les virus humains.
- La détection et la quantification des bactériophages est facile, très rapide (résultats en moins de 24 heures) et peu coûteuse. Elle ne nécessite ni équipement sophistiqué, ni compétences particulières en virologie.
- Les bactériophages ne sont pas pathogènes et ne constituent par voie de conséquence aucun risque pour le personnel des laboratoires.

- Les techniques de mise en évidence des phages sont standardisées (normes ISO) mais il est clair que chacun des phages étudiés ne représente pas l'indicateur parfait sur le plan virologique et dans certains cas des virus entériques humains ont été mis en évidence dans des échantillons dans lesquels des phages n'ont pas été détectés.

4. Dose minimale infectieuse, infection et maladie

Lorsqu'un individu est infecté par un virus entérique, celui-ci se multiplie dans l'organisme essentiellement au niveau de l'intestin et des quantités importantes de particules virales sont rejetées dans les selles. Cette présence de virus dans les selles signe l'infection.

Cette infection peut, sur le plan clinique, soit rester totalement inapparente et ne provoquer aucune manifestation pathologique, soit se traduire par une maladie, caractérisée par la survenue de symptômes cliniques.

L'apparition de manifestations cliniques dépend de nombreux facteurs, tels que l'état immunitaire de l'individu, son âge, son état de santé, le type et la virulence du virus. Que l'infection se traduise ou non par l'apparition de manifestations cliniques, l'individu infecté excrète dans ses selles des quantités importantes de virus et se comporte donc comme un contaminateur.

Par ailleurs, il faut insister sur le fait qu'une infection virale transmise à des individus par la voie hydrique peut ensuite parfaitement se transmettre, soit par contact interhumain, soit par contamination de produits divers à partir desquels des individus peuvent s'infecter. Ceci a été bien montré au cours d'une épidémie d'origine hydrique à virus de Norwalk, au cours de laquelle le taux d'attaque secondaire a pu être chiffré à 30 % (GERBA *et al.*, 1985).

Parmi les virus entériques, nombreux sont ceux qui provoquent des infections inapparentes. Ainsi, lors des infections par les *Entérovirus*, la survenue de manifestations cliniques constitue l'exception. La fréquence des infections symptomatiques est très inférieure à 10 % pour les *Poliovirus* par exemple. Pour ce qui est des infections provoquées par le virus de l'hépatite A, l'âge de l'individu infecté constitue le facteur prédominant. Ainsi, si l'infection se

produit pendant l'enfance le pourcentage d'individus présentant des symptômes cliniques est inférieur à 10 % alors qu'il est de 75 % si la primo infection survient chez l'adulte. A l'inverse pour les *Rotavirus* des manifestations cliniques sont beaucoup plus fréquentes dans l'enfance que chez les adultes.

Mais, pour que puisse se réaliser une infection chez un individu, il est nécessaire que celui-ci ingère une quantité suffisante de particules virales. Il s'agit de la dose minimale infectante (DMI).

Cette dose minimale infectante (DMI) est fonction de très nombreux paramètres tels que le type de virus, l'état de la dispersion de la suspension virale, la nature et le pH de l'aliment ingéré....

Cependant à l'heure actuelle un consensus semble s'être établi pour estimer que la DMI pour les virus entériques est faible et toujours inférieure à 50 particules infectieuses (GERBA and HAAS, 1988). Pour les *Entérovirus* elle serait inférieure à 20 particules infectieuses (SCHIFF *et al.*, 1984) et pour les *Rotavirus* une seule particule infectieuse en cultures cellulaires serait suffisante pour déclencher une multiplication virale *in vivo* et/ou une séroconversion (WARD *et al.*, 1986 ; GRAHAM *et al.*, 1987, DUBOIS, 1995).

Le risque de mortalité à la suite d'une infection par des virus entériques est aussi un facteur qui doit entrer en jeu. Le taux de mortalité pour le virus de l'hépatite A a ainsi été estimé à 0,6 % par le Center for Disease Control (1985). Des taux de mortalité pour divers *Entérovirus* sont rassemblés dans le tableau 55.

Tableau 55
Taux de mortalité provoqués par des *Entérovirus*
(D'après Assaad and Borecka, 1985)

VIRUS	TAUX DE MORTALITE %
<i>Poliovirus 1</i>	0,9
<i>Coxsackievirus A2</i>	0,5
<i>Coxsackievirus A9</i>	0,26
<i>Coxsackievirus B</i>	0,59 à 0,94
Echovirus 6	0,29

5. Evaluation du risque

L'évaluation du risque associé à la présence de virus dans le milieu hydrique apparaît comme un élément fondamental pour pouvoir, d'une part édicter des normes, d'autre part déterminer les traitements adéquats permettant de respecter ces normes.

☞ Depuis 1988 plusieurs travaux ont été réalisés concernant l'évaluation du risque viral lié à la consommation d'eau de boisson. Ainsi, GERBA and HAAS (1988) ont déterminé le risque d'infection, de maladie et de mort pour des individus consommant de l'eau contenant de faibles concentrations de *Poliovirus 1* et de virus de l'hépatite A (HAV). Ils ont ainsi pu estimer que, pour une consommation de 2 litres par jour d'une eau contenant 1 virus dans 1000 litres d'eau, le risque annuel d'infection était de 10^{-2} pour le *Poliovirus 1* et HAV, le risque de maladie était de $1,1 \cdot 10^{-4}$ pour HAV et $7,8 \cdot 10^{-3}$ pour *Poliovirus* et que le risque de mortalité s'élevait à $9,5 \cdot 10^{-7}$ pour *Poliovirus* et $4,3 \cdot 10^{-5}$ pour HAV. Ils constatent ainsi une différence très nette de risque selon le type de virus entérique envisagé.

De même ROSE and GERBA (1991b), partant du fait que l'Environmental Protection Agency (EPA) considérait comme acceptable le risque d'une infection pour 10 000 par an pour des agents infectieux transmis par l'eau potable, ont calculé que le nombre de *Poliovirus* et de *Rotavirus* ne devait pas être supérieur à respectivement 0,1 et 0,3 UFP 100 L⁻¹ d'eau de boisson.

Enfin, sur un autre plan, PAYMENT *et al.*, (1991) ont mesuré l'incidence annuelle des gastroentérites en relation avec la consommation d'eau du robinet obtenue à partir d'eau de surface et répondant aux normes de potabilité. Ils rapportent que l'incidence est de 0,76 chez les buveurs d'eau du robinet, comparée à 0,50 chez les buveurs d'eau filtrée.

☞ En ce qui concerne l'évaluation du risque viral lié à la réutilisation des eaux usées, ROSE and GERBA (1991a) étudiant la contamination virale des eaux traitées pour la réutilisation en Arizona et en Floride observent des concentrations virales moyennes après traitement secondaire (traitement par boues activées et désinfection) de respectivement 13 et 130 UFP 100 L⁻¹. Ils constatent aussi que, s'ils ajoutent une filtration avant la désinfection, l'abattement viral est augmenté et permet d'obtenir des eaux contenant en moyenne 1 UFP 100 L⁻¹. Le risque d'infection à la suite de l'ingestion accidentelle de 100 mL d'eau se situe alors entre $2 \cdot 10^{-3}$ et $2 \cdot 10^{-4}$ s'il s'agit d'effluent secondaire chloré et est abaissé entre $2 \cdot 10^{-4}$ et $2 \cdot 10^{-5}$ s'il s'agit d'effluent secondaire, filtré et désinfecté.

Par ailleurs, ASANO and SAKAJI (1990) analysant le risque pour la santé en utilisant la méthodologie décrite par HAAS (1983) rapportent que, pour une eau contenant 1 virus entérique dans 40 litres (standards de l'Arizona), la probabilité d'infection se situe entre 10^{-3} et 10^{-7} lorsque 100 mL d'eau sont consommés. Si la même eau est utilisée pour l'irrigation de cultures maraîchères le risque d'infection se situe entre 10^{-4} et 10^{-8} .

Il faut d'ailleurs préciser à ce sujet que le risque d'infection par les produits maraîchers peut être très nettement diminué si l'on prend en considération l'inactivation naturelle des virus entériques dans l'environnement (abattement de 1 log en 4 jours). Cette observation constitue d'ailleurs un argument très important en faveur de l'instauration, d'une période de latence entre l'irrigation et la récolte des légumes.

Enfin, ASANO *et al.*, (1992), évaluant les normes concernant la réutilisation des eaux usées en Californie, étudient quatre scénarios d'exposition aux eaux usées et déterminent le risque d'infection. Les scénarios sont : l'irrigation de cultures maraîchères, l'irrigation de parcours de golf, l'utilisation à des fins récréatives et la réalimentation de nappes profondes. Le risque est déterminé pour 3 virus entériques (*Poliovirus 1 et 3*, *Echovirus 12*) et pour des eaux ayant subi divers traitements et par voie de conséquence renfermant des quantités variables de virus (Tableau 56).

Tableau 56
Risque de contracter une infection à la suite de l'exposition à une eau
contenant une unité virale infectieuse dans 100 litres
(d'après ASANO *et al.*, 1992)

	Irrigation de parcours de golf	Irrigation de cultures maraîchères par aspersion	Eaux récréatives à utilisation non restreinte	Réalimentation de nappes
Risque au cours de la vie				
<i>Echovirus 12</i>	2,71 10 ⁻⁴	2,82 10 ⁻⁶	2,74 10 ⁻²	3,72 10 ⁻⁸
<i>Poliovirus 1</i>	9,31 10 ⁻⁶	9,70 10 ⁻⁸	9,52 10 ⁻⁴	3,40 10 ⁻⁹
<i>Poliovirus 3</i>	6,84 10 ⁻³	7,15 10 ⁻⁵	5,04 10 ⁻¹	1,43 10 ⁻⁸
Risque annuel				
<i>Echovirus 12</i>	9,04 10 ⁻⁶	4,04 10 ⁻⁸	6,93 10 ⁻⁴	5,31 10 ⁻¹⁰
<i>Poliovirus 1</i>	3,10 10 ⁻⁷	1,39 10 ⁻⁹	2,38 10 ⁻⁵	4,86 10 ⁻¹¹
<i>Poliovirus 3</i>	2,29 10 ⁻⁴	1,02 10 ⁻⁶	1,74 10 ⁻²	2,04 10 ⁻¹⁰
Risque journalier				
<i>Echovirus 12</i>	8,69 10 ⁻⁸	1,11 10 ⁻¹⁰	1,73 10 ⁻⁵	1,46 10 ⁻¹²
<i>Poliovirus 1</i>	2,98 10 ⁻⁹	3,80 10 ⁻¹²	5,95 10 ⁻⁷	1,33 10 ⁻¹³
<i>Poliovirus 3</i>	2,20 10 ⁻⁶	2,80 10 ⁻⁹	4,38 10 ⁻⁴	5,60 10 ⁻¹³

On constate que le risque annuel d'infection, après exposition à un effluent contenant une unité virale dans 100 litres, lors d'activités de loisir telles que la natation ou le golf se situe entre 10⁻² et 10⁻⁷ (en fonction du type de virus) alors que le risque se situe entre 10⁻⁶ et 10⁻¹² pour

l'irrigation de cultures maraîchères. Il est évident que les risques d'infections sont d'autant plus importants que la concentration virale dans l'eau est plus élevée.

Références

ABAD F.X., PINTO R.M., DIEZ J.M. and BOSCH A. (1994). Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. Appl. Environ. Microbiol., **60**, 2377-2383.

ANONYME

Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n°97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal Officiel de la République Française., 31 janvier 1998.

ASANO T. and SAKAJI R.H. (1990). Virus risk analysis in wastewater reclamation and reuse. In "Chemical water and wastewater treatment", HAHN H.H. and KLUTE R. ed. Springer-Verlag-Berlin.

ASANO T., LEONG L.Y., RIGBY M.G. and SAKAJI R.H. (1992). Evaluation of the California wastewater reclamation criteria using enteric virus monitoring data. Wat. Sci. Tech., **26**, 1513-1524.

ASSAAD F. and BORECKA I. (1985). Nine year study of WHO virus reports on fatal virus infections. Bull. W.H.O., **55**, 445-453.

AYRES P.A. (1977). Coliphages in sewage and the marine environment. In "SKINNER F.A. and SHEWAN J.M." eds. Aquatic Microbiology. Academic Press, New York. 275-298.

BATTIGELLI D.A., SOBSEY M.D. and LOBE D.C. (1993). The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. Wat. Sci. Tech., **27**, 339-342.

BAYLET R., SINEGRE F., SAUZE F. and GERVAIS M. (1980). Lagunage et virologie des eaux usées : Evolution de la charge en coliphages. Tech. Eau Assainissement, **378**, 37-41.

BELL R.G. (1976). The limitation of the ratio of fecal coliforms to total coliphages as a water pollution index. Wat. Res., **10**, 745-748.

BERG G. and METCALF C. (1978). Indicators of viruses in waters. In "Indicators of viruses in water and food". BERG G. ed. Ann Arbor Sciences Publ.

BITTON G., FARRAH S.R., RUSKIN R.H., BUTNER J. and CHON Y.J. (1983). Survival of pathogenic and indicator organisms in ground water. Wat. Res., **21**, 405-410.

BORREGO J.J., CORNAX R., MORINIGO M.A., MARTINEZ-MANZANORES C. and ROMERO P. (1990). Coliphage as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. Wat. Res., **24**, 111-116.

BORREGO J.J., MORINIGO M.A., DE VONCENTE A., CORNAX R. and ROMERO P. (1987). Coliphage as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and

pathogenic microorganism. Wat. Res., **21**, 1475-1480.

BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and JOFRE J. (1988). Occurrence of *Entéroviruses* in marine sediment along the coast of Barcelona, Spain. Can. J. Microbiol., **34**, 921-924.

BOSCH A., TARTERA C., GAJARDO R., DIEZ J.M. and JOFRE J. (1989). Comparative resistance of bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* to inactivation by chlorination or ultra-violet radiation. Wat. Sci. Tech., **21**, 221-226.

CABELLI V.J., DUFOUR A.P., Mc CABE L.J. and LEVIN M.A. (1983). A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. J. Wat. Pollut. Control. Fed. **55**, 1306-1314.

CENTER FOR DISEASE CONTROL (1985). Hepatitis surveillance. Report 49, CDC, Atlanta, USA.

CHUNG H., JAYKUS L.A., LOVELACE G. and SOBSEY M.D. (1998). Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters. Wat. Sci. Tech., **38**, 37-44.

CORNAX R., MORINIZO M.A., BALEBONA M.C., CASTRO D. and BORREGO J.J. (1991). Significance of several bacteriophage groups as indicator of sewage pollution in marine waters. Wat. Res., **25**, 673-678.

CRAUN G.F. (1978). Impact of the coliform standard on the transmission of disease. In "Evaluation of the microbiology standards for drinking water". HENDRICKS C.W. ed., USEPA-570/9-78-00C. Washington D.C.

Directive 76/160/CEE du 8 décembre 1975 concernant la qualité des eaux de baignade J.O.C.E. du 5 février 1976.

Directive 91/492/CEE du 15 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants. J.O.C.E. 24 septembre 1991.

Directive 91/493/CEE du 22 juillet 1991 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché des produits de la pêche. J.O.C.E. 24 septembre 1991.

DUBOIS E. (1995). Contamination de l'environnement littoral par les *Rotavirus* du groupe A. Thèse université de Rennes, 154 p.

FLEISHER J.M., KAY D., WYER M. and MERRETT H. (1996) The *Entérovirus* test in the assessment of recreational water-associated gastroenteritis. Wat. Res., **30**, 2341-2346.

FUNDERBURG S.W. and SORBA C.A. (1985). Coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge. Wat. Res., **19**, 547-555.

GANTZER C. (1996). Persistance du génome d'*Entérovirus* et des bactériophages de *Bacteroides fragilis* dans les eaux. Intérêt de ces marqueurs en tant qu'indicateur de contamination virale.

Thèse d'université, Nancy, 224 p.

GANTZER C., MAUL A., AUDIC J.M. and SCHWARTZBROD L. (1998). Detection of infectious *Entéroviruses*, *Entérovirus* genomes, somatic coliphages and *Bacteroides fragilis* phages in treated wastewater. Appl. Environ. Microbiol., **64**, 4307-4312.

GASPARD P. (1995). Contamination parasitaire dans l'environnement : prospective pour une gestion des risques sanitaires. Thèse d'Université, Nancy, 227 p.

GERBA C.P. (1987). Phage as indicators of faecal pollution. In Goyal SM Gerba C.P., Bitton G. (ed) New-York : John Wiley and Sons 1987.

GERBA C.P. and HAAS C.N. (1988). Assessment of risks associated with enteric viruses in contaminated drinking water. American Society for testing and materials, Technical publication 976, Philadelphia - USA.

GERBA C.P., GOYAL S.M., LA BELLE R.L., CECH I. and BODGAN G.F. (1979). Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of *Entéroviruses* in marine waters. Am. J. publ. Health., **69**, 1116-1119.

GERBA C.P., ROSE J.B. and SINGH S.N. (1985). Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. Crit. Rev. Environ. Control. **15**, 213-236.

GOYAL S.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1978). Prevalence of human enteric viruses in coastal canal communities. J. Wat. Poll. Control. Fed., **50**, 2247-2256.

GRABOW W.O.K. and COUBROUGH P.A. (1986). Practical direct plaque assay for coliphage in 100 mL sample of drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **52**, 430-433.

GRABOW W.O.K., UREY A., UYS M. DE VILLIERC J.C. (1998). Evaluation of the application of bacteriophages as indicators of water quality. WRC Report N° 540/1/98.

GRAHAM D.Y., DUFOUR G.R. and ESTES M.K. (1987). Minimal infective dose of *Rotavirus*. Arch. Virol., **92**, 261-271.

HAAS C.N. (1983). Estimation of risk due to low doses of microorganisms. A comparison of alternative methodologies. Am. J. Epidem., **118**, 573-582.

HALL R.M. and SOBSEY M.D. (1993). Inactivation of hepatitis A virus (HAV) and MS2 by ozone and ozone hydrogen peroxyde in buffered water. Wat. Sci. Tech., 1, 27, 371-378.

HAVELAAR A.A. and HOGEBROOM W.M. (1984). A method for the enumeration of male specific bacteriophage in sewage. J. Appl. Bacteriol., **56**, 439-447.

HAVELAAR A.A., FURUSE K. and HOGEBROOM W.M. (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. J. Appl. Bacteriol., **60**, 255-262.

HAVELAAR A.H. (1987). Bacteriophages as model organisms in water treatment. Microbiol. Sci.,

4, 362-364.

HAVELAAR A.H. (1993). A bacteriophage standard for bathing waters. Final report, commission of the European Communities. B4, 3040/92/012609.

HAVELAAR A.H., MEULEMANS C.C.E., POT-HOGEBOOM W.M. and KOSTER J. (1990). Inactivation of bacteriophage MS2 in wastewater effluent with monochromatic and polychromatic ultraviolet light. Wat. Res., **24**, 1387-1393.

HAVELAAR A.H., POT-HOGEBOOM W.M. KOOT W. and POT R. (1987). Specific bacteriophages as indicators of the disinfection efficiency of secondary effluent with ultraviolet irradiation. Ozone Sci. Eng., **9**, 353-368.

HAVELAAR A.H., POT-HOGEBOOM W.M., FURUSE K., POT R. and HORMANN M.P. (1990). F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. J. Appl. Bacteriol., **69**, 30-37.

IAWPRC (1991). Study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. Wat. Res., **25**, 529-545.

IGNAZZITO G., VOLTERRA J., AULICISMO F.A. and D'ANGELO A.M. (1980). Coliphages as indicators in treatment plants. Water. Air Soil Poll., **13**, 391-398.

JOFRE J. (1991). Les bactériophages dans les milieux hydriques in "Virologie des milieux hydriques". SCHWARTZBROD L. ed. Tec. et Doc. Lavoisier, Paris.

JOFRE J., BLASI M., BOSCH A. and LUCENA F. (1989). Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses on pollutes marine sediments. Wat. Sci. Tech., **21**, 15-19.

JOFRE J., BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and TARTERA C. (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. Wat. Sci. Tech., **18**, 167-173.

JOFRE J., OLLE E., RIBAS F., VIDAL A. and LUCENA F. (1995). Potential usefulness of bacteriophages that infect *Bacteroides fragilis* as model organisms for monitoring virus removal in drinking water treatment plants. Appl. Environ. Microbiol., **61**, 3227-3231.

KAY D., FLEISHER J.M., SALMON R., L. (1994). Predicting likelihood of gastroenteritis from sea bathing : results from randomized exposure. Lancet, **344**, 905-909.

KESWICK B.H., SATTERWHITE T.K., JOHNSON P.C., DU-PONT H.L., SECOR S.L., BITSURA J.A., GARY W. and HOFF J.C. (1985). Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. Appl. Environ. Microbiol., **50**, 261-264.

KOTT Y., BEN-ARI H. and VINOKUR L. (1978). Coliphage survival as viral indicator in various wastewater effluents. Prog. Water Technol., **10**, 337-346.

KFIR R., COUBROUGH P. and GRABOW WOK (1991). The occurrence of male specific and

somatic bacteriophages in polluted South African. Wat. Sci. Tech., **24**, 251-254.

KOTT Y. (1966). Estimation of low number of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the most probable number method. Appl. Microbiol., **14**, 141-144.

LUCENA F., ARAUJO R. and JOFRE J. (1996). Usefulness of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* as index microorganisms of remote faecal pollution. Wat. Res., **30**, 2812-2816.

MARZOUK Y., GOYAL S.M. and GERBA C.P. (1980). Relationship of viruses and indicator bacteria in water and wastewater of Israel. Wat. Res., **14**, 1585-1590.

MERRETT-JONES M., MORRIS R., COOPE R. and WHEELER D. (1991). The relationship between enteric viruses and indicators of sewage pollution in UK seawaters. In Proceedings of the U.K. Symposium on Health-related Water Microbiology (Edited by Morris R., Alexander L.M., Wyn-Jones P. and Sellwood J.), 158-164. IAWPRC, London.

MUSSEAU S., SCHWARTZBROD L. and GANTZER C. (1999). Détermination du niveau de contamination bactériophagique du milieu hydrique en Lorraine (à paraître).

NAPARSTED J., KAWATA K., OLIVIERI V.P. and SHERMAN V.R. (1976). Virus removal in an activated sludge plant. Water Sewage Works, **123**, 16-20.

NASSER A.M., TCHORCH Y. and FATTAL B. (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and *Poliovirus* 1 in wastewater and groundwater. Wat. Sci. Tech., **27**, 401-4407.

NIEUWSTAD T.J., MULDER E.P., HAVELAAR A.H. and VAN OLPHEN M. (1988). Elimination of microorganisms for wastewater by tertiary precipitation followed by filtration. Wat. Res., **22**, 1389-1397.

NIEUWSTAD T. J., HAVELAAR A.H. and Van OLPHEN M. (1991). Hydraulic and microbiological characterization of reactors for ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluent. Wat. Res., **25**, 775-783.

OSAWA S. ;, FURUSE K., WATANABE I. (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. Appl. Environ. Microbiol., **41**, 164-168.

PANCORBO O.C., EVANSHEN B.G., CAMPBELL W.F., LAMBERT S., CURTIS S.K. and WOOLLEY T.W. (1987). Infectivity and antigenicity reduction rates of human *Rotavirus* strain Wa in Fresh waters. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1803-1811.

PARRY O.T., WHITEHEAD J.A. and DOWLING L.T. (1981). Temperature sensitive coliphage in the environment. In Gooddard M., Butler M. (editors) viruses and wastewater treatment. Pergamon Press. Oxford

PAYMENT P., RICHARDSON L., SIEMIATYCKI J., DEWAR R., EDWARDES M. and FRANCO E. (1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. Am. J. Publ. Health, **81**,

703-708.

PETRASEK A.C., WOLF H.W., ESMOND S.E. and ANDREWS D.C. (1980). Ultraviolet disinfection of municipal wastewater effluents. EPA 600/2-80-102, US. Environmental Protection Agency, Cincinnati, OH, USA.

PORTNOY B.L., MACKOWIAK P.A., CARAWAY C.T., WALKER J.A., Mc KINLEY T.W. and KLEIN C.A. (1975). Oyster-associated hepatitis. Failure of shellfish certification programs to prevent outbreaks. J. Am. Med. Ass., **233**, 1065-1068.

PUIG A. (1998). Influencia de l'hoste en la recuperacio de bacteriofags de *Bacteroides fragilis* en el mediambient. Ph. D. thesis, University of Barcelona, Barcelona Spain.

RAPHAEL R.A., SATTAR S.A. and SPRINGTHORPE V.S. (1985). Long-term survival of human *Rotavirus* in raw and treated river water. Can. J. Microbiol., **31**, 124-128.

ROSE J.B. and GERBA C.P. (1991a). Assessing potential health risks from viruses and parasites in reclaimed water in Arizona and Florida (USA). Wat. Sci. Tech., **23**, 2091-2098.

ROSE J.B. and GERBA C.P. (1991b). Use of risk assessment for development of microbial standards. Wat. Sci. Tech., **24**, 29-34.

SCHIFF G.M., STEFANOVIC G., YOUNG B. and PENNEKAMPS J.K. (1984). Minimum human infective dose of enteric virus (Echovirus 12) in drinking water. In Enteric virus in water. Monogr. Virol., **15**, 222-228.

SCHWARTZBROD L., FINANCE C., AYMARD M., BRIGAUD M. and LUCENA F. (1985). Recovery of reovirus from tapwater. Zbl. Bakt. Hyg. I. abt. Orig. B., **181**, 383-389.

SHERMAN V.R., KAWATA K., OLIVIERI V.P. and NAPASTED J.D. (1975). Virus removal in trickling filter plants. Water Sewage Works, **122**, 36-44.

SNEAD M.C., OLIVIERI V.P., KAWATA K. and KRUSE C.W. (1980). The effectiveness of chlorine residuals in inactivation of bacteria and viruses introduced by post-treatment contamination. Wat. Res., **14**, 403-408.

SOBSEY M. (1989). Inactivation of health related microorganisms in water by disinfection processes. Wat. Sci. Tech., **21**, 179-195.

STETLER R.E., WALTRIP S.C. and HURST C.J. (1992). Virus removal and recovery in the drinking water treatment strain. Wat. Res., **26**, 727-731.

SUN Z.P., LEVI Y., KIENE L., DUMOUTIER N. and LUCENA F. (1997). Quantification of bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in environmental water samples of Seine river. Water, Air and Soil Pollution **96**, 175-183.

TARTERA C. and JOFRE J. (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage polluted waters. Appl. Environ. Microbiol., **53**, 1632-1637.

TARTERA C., BOSCH A. and JOFRE J. (1988). The inactivation of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* by chlorine treatment and U.V. irradiation. F.E.M.S. Microbiology Letters, **56**, 315-316.

TARTERA C., JOFRE J. and LUCENA F. (1988). Relationship between numbers of *Entéroviruses* and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environment sample. Environ. Tech. Lett., **9**, 407-410.

TARTERA C., LUCENA F. and JOFRE J. (1989). Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. Appl. Environ. Microbiol., **55**, 2696-2701.

TAYLOR G.R. (1982). The effect of disinfectants on picornavirus structure and infectivity. In "Viruses and disinfection of water and wastewater", ed. BUTLER M. MEDLEN A.R. and MORRIS R., 289-297. Guilford University of Surrey.

TSAI Y.L., TRAN B. and PALMER C.J. (1995). Analysis of viral RNA persistence in sea water by reverse-transcriptase Polymerase Chain Reaction. Appl. Environ Microbiol., **61**, 363-366.

VAUGHN J.M., LANDRY E.F., VICALE T.J. and DAHL M.C. (1980). Isolation of naturally occurring *Entéroviruses* from a variety of shellfish species residing in long Island and New Jersey marine embayments. J. Food. Prot., **43**, 95-98.

VILAGINES P., SARRETTE B., LE GUYADER M., CUN C. and VILAGINES R. (1997). Etude des relations existant entre les virus détectables en culture cellulaire, les bactériophages ARN F-spécifiques et les principaux indicateurs bactériens de contamination fécale présents dans des eaux usées brutes, épurées et dans des eaux de surface. J. Europ. Hydrol., **28**, 201-220.

W.H.O. (1989). Health guidelines for the use of waste water in agriculture and aquaculture. Technical report series. N : 778.

WARD R.L., BERNSTEIN D.I., YOUNG E.C., SHERWOOD J.R., KNOWLTON D.R. and SCHIFF G.M. (1986). Human *Rotavirus* studies in volunteers : determination of infectious dose and serological response to infection. J. Infect. Dis., **154**, 871-880.

WHEELER D. (1990). The pollution of beaches by viruses. In « house of commons environment committee inquiry into the pollution of beaches ». Appendices to the minutes of evidence, **11**, 24-39. HMSO, London.

WIEDENMANN A., FISCHER B., STRAUB U., WANG C., FLEHMIG B. and SCHOENEN D. (1993). Disinfection of hepatitis A virus and MS2 coliphage in water by ultraviolet irradiation : comparison of UV susceptibility. Wat. Sci. Tech., **27**, 335-338.

RECOMMANDATIONS ET RECHERCHES PRECONISEES

☞ **Sur un plan général,**

il est impératif de promouvoir des études pour déterminer d'une façon claire et indiscutable la signification tant sur le plan virologique que sur le plan sanitaire de la présence de génome viral dans les milieux hydriques.

En effet, dans l'état actuel des choses la présence de génome viral dans une eau ou un coquillage :

- ne peut pas témoigner de la présence de virus infectieux car ce génome peut provenir de virus inactivés (signification sur le plan de la santé publique ?),
- peut être considérée comme le témoin d'une contamination virale dont il est impossible de déterminer si elle est récente ou plus ou moins ancienne.

☞ **Sur le plan du contrôle,**

Il est indispensable de prendre en compte le paramètre virologique pour le contrôle sanitaire des coquillages. Le paramètre bactériologique actuellement utilisé (≤ 230 *E. coli*/100 g) est reconnu comme inadéquat. Des virus entériques ont été retrouvés dans des coquillages répondant parfaitement à cette norme.

Il est hautement souhaitable de poursuivre et d'améliorer le contrôle des boues utilisées en agriculture. Dans ce cas, il pourrait être suggéré de :

- valider les filières de traitement (chaulage, compostage, stockage...) par la mise en évidence de l'absence de virus entériques cultivables infectieux (culture cellulaire –

PCR).

- Contrôler systématiquement les lots de produits mis sur le marché par une recherche de bactériophages.

Il est urgent d'évaluer l'utilisation comme indicateur viral, non pas d'un bactériophage mais d'un pool de bactériophages, ceci pourrait être réalisé en particulier pour déterminer l'efficacité de traitement sur le plan virologique :

- des traitements primaire, secondaire et tertiaire des eaux usées,
- de la dépuración des coquillages.

☛ **Sur le plan de l'épidémiologie,**

Il est hautement souhaitable de :

- Prendre en compte les possibilités de la biologie moléculaire de façon à développer considérablement l'épidémiologie moléculaire,
- Evaluer d'une manière claire les conséquences éventuelles de l'utilisation de boues d'épuration et d'eaux usées en agriculture,
- Promouvoir des enquêtes épidémiologiques pour déterminer si la détection de plus en plus fréquente dans le milieu hydrique de génome de *Caliciviridae* (*Norwalk like virus*) se traduit par une augmentation réelle du taux de gastroentérite.
- Evaluer le degré de contamination des eaux souterraines à la suite d'irrigation par des eaux usées (ou de surface polluées) et/ou d'utilisation de boues en amendement agricole.

☞ **Sur le plan technique,**

Il est fondamental de ne plus se limiter pour la détection des virus entériques cultivables, à l'inoculation sur cultures cellulaires et à l'observation d'un effet cytopathogène (ECP). Il est absolument nécessaire de coupler la culture cellulaire avec une RT-PCR. Cette méthode qui consiste à réaliser au moins deux passages sur cultures cellulaires suivie d'une recherche de génome viral par RT-PCR permet de révéler la présence de virus ne provoquant pas d'ECP. Enfin, elle apporte la preuve de la présence de virus infectieux dans l'échantillon.

Il serait du plus grand intérêt de promouvoir des études de PCR quantitative de façon à pouvoir déterminer la charge virale des échantillons.

Il est nécessaire de développer des recherches pour mettre au point une technique simple, rapide et efficace de concentration des bactériophages de *Bacteroides fragilis*. Une concentration préalable de ces phages à partir des échantillons à analyser permettrait de compenser leur faible densité dans les milieux naturels.

Il est important de poursuivre les recherches pour éliminer les inhibiteurs de PCR en particulier dans des échantillons de boues, de composts, de coquillages ou d'eaux usées brutes.

Il est important de tenter de standardiser les techniques de PCR utilisées en milieu hydrique et de développer des techniques de référence normalisées.

Il est hautement souhaitable que soit mis en place un contrôle de qualité au niveau des laboratoires de virologie du milieu hydrique. Ce contrôle est rendu de plus en plus nécessaire en particulier du fait du très rapide développement des techniques de biologie moléculaire (RT-PCR).