

Evaluation et adaptation d'un système de purification des coquillages pour l'élimination des virus entériques.

Rapport final

Février 2003

J.C. Le Saux , M. Pommepuy, M.P. Caprais, C. Le Menec, S. Parnaudeau, F. Le Guyader, Ifremer, G. Brest, M. Monnier, Comité National de la Conchyliculture, Paris
Y. Madec, SCA des « Huîtres de Prat ar Coum », Lannilis



Convention OFIMER/CNC N°054-01C



Plan

INTRODUCTION.....	2
1. BILAN DE L'EXISTANT.....	4
1.1. <i>Les systèmes existants</i>	4
1.1.1. Les bassins et leurs équipements.....	5
1.1.2. La désinfection de l'eau de mer.....	6
1.1.3. Les règles de Bonnes Pratiques Hygiéniques pour la Purification ou HACCP.....	6
1.2. <i>Evaluation de la station de purification Prat Ar Coum</i>	8
1.2.1. Descriptif de la station de purification de Prat Ar Coum.....	9
1.2.2. Etude des performances de la station de purification.....	11
1.3. <i>Conclusions : performances et limites du système étudié</i>	18
2. ELABORATION DU PILOTE POUR LA PURIFICATION VIRALE.....	19
2.1. <i>Paramètres impliqués dans la purification</i>	19
2.2. <i>Construction du Pilote de purification virale</i>	21
2.2.1. Conception du Pilote.....	21
2.2.2. Caractéristiques techniques.....	21
2.3. <i>Validation du pilote</i>	25
2.3.1. Calibration hydraulique.....	25
2.3.2. Validation du programmeur de température.....	26
2.3.3. Efficacité du module de purification des eaux.....	26
2.4. <i>Matériel et méthodes utilisés pour les expérimentations</i>	27
2.4.1. Les coquillages.....	27
2.4.2. Les bactériophages : modèle viral.....	28
2.4.3. Les méthodes analytiques.....	28
3. RÉSULTATS DES EXPÉRIMENTATIONS SUR LE PILOTE.....	30
3.1. <i>Résultats obtenus sur le Pilote</i>	30
3.1.1. Sensibilité des bactériophages à l'eau de mer.....	30
3.1.2. Sensibilité des bactériophages et d' <i>E. coli</i> à la purification des coquillages.....	31
3.2. <i>Comparaison avec les résultats trouvés dans la littérature</i>	33
3.2.1. Sensibilité des microorganismes à l'eau de mer.....	34
3.2.2. Sensibilité des microorganismes à la purification.....	34
3.3. <i>Conclusion : notion de purification "renforcée"</i>	35
4. DÉFINITION DES CRITÈRES DE GESTION DE LA CONTAMINATION ET DES RÈGLES DE BONNE PRATIQUE DE LA PURIFICATION VIRALE DES COQUILLAGES.....	37
4.1. <i>Intérêts et limites de la purification renforcée</i>	37
4.2. <i>Points critiques de la zone d'élevage influençant la qualité du produit</i>	38
4.3. <i>Quand et comment appliquer une purification renforcée ?</i>	41
4.4. <i>Quand et comment appliquer une purification « renforcée » pour éliminer les virus ?</i>	43
5. CONCLUSIONS.....	46
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	49

Introduction

Un des objectifs de ce projet est d'assurer un développement économique durable à l'ostréiculture, basé sur des technologies propres à définir des produits adaptés à la sécurité alimentaire. La production conchylicole est importante sur le marché européen et représente plus d'un tiers du marché mondial, soit plus de 775 000 tonnes/an, dont plus de 140 000 tonnes d'huîtres produites par la France. En Europe, le marché des coquillages représente plus de 456 M d'euros/an produits par 8 500 entreprises employant environ 40 000 personnes. Les huîtres à elles seules, représentent plus de 140 M d'euros/an.

Le développement durable de cette activité passe par la maîtrise de la qualité du produit et en particulier de sa qualité sanitaire. En fait, le libre échange communautaire offre un large brassage de coquillages de diverses origines dont la qualité peut être variable. Ces dernières années, des huîtres ont été suspectées d'être à l'origine d'épidémies alimentaires en Suède, au Danemark, en Grande Bretagne, en Espagne et en France. Dans la plupart des cas, des norovirus (large famille de virus intégrant les calicivirus et les virus Norwalk-like) ont été détectés dans les selles de malades ayant consommé des coquillages. Ces coquillages répondaient aux normes actuelles de salubrité basées sur les concentrations faibles en *Escherichia coli* (< 230 UFC/100 g). Cependant, cet indicateur ne garantit pas totalement l'absence d'autres microorganismes dans la mesure où il est plus sensible au milieu marin et disparaît plus vite que les virus par exemple.

Le développement actuel des techniques de biologie moléculaire permet de détecter dans les coquillages, les virus potentiellement pathogènes pour l'homme et présentant un risque sanitaire. De ce fait, il était intéressant d'examiner, lors de la purification des coquillages les cinétiques d'élimination de ces virus et d'améliorer les systèmes existants afin de garantir la qualité sanitaire des produits.

Contexte scientifique :

Les microorganismes arrivant dans les zones côtières peuvent être accumulés dans les coquillages du fait de leur activité filtrante. Dans des conditions particulières, une huître peut filtrer à elle seule, jusqu'à 5 litres d'eau par heure et de ce fait concentre dans son appareil digestif les contaminants présents dans l'eau. Des épidémies liées à la consommation de coquillages répondant aux critères de mise en marché ont déjà été reportées (Sugieda *et al.*, 1996 ; Le Guyader *et al.*, 1996 ; Green *et al.*, 1998). Plusieurs études ont exploré la possibilité d'utiliser des bactériophages comme une alternative à la recherche directe de pathogènes, et de ce fait, à une meilleure identification du risque viral (Doré & Lees, 1995). Même si ce virus présente un intérêt comme indicateur (Armon & Kott, 1996 ; Havelaar, 1993), sa présence concomitante avec des virus réellement pathogènes est loin d'être démontrée. La recherche directe des pathogènes à l'origine des épidémies (Hépatite A, entérovirus) est actuellement possible grâce au développement de la biologie moléculaire (Pommepuy & Le Guyader, 1998) et permet, de ce fait, de déterminer directement le facteur responsable d'une épidémie.

A la suite de problèmes sanitaires, des procédés de purification de coquillages ont été introduits en Europe, aux Etats-Unis et en Australie. La purification des coquillages est basée sur un procédé contrôlé, utilisant de l'eau de mer purifiée, permettant aux filtreurs d'éliminer naturellement les agents qu'ils ont accumulés dans leur environnement (Doré & Lees, 1995 ; Burkhardt *et al.*, 1992). Si la purification essaye naturellement d'éliminer les microorganismes, son efficacité n'a été évaluée que sur le seul critère d'élimination des *E. coli*. Des études récentes ont montré que les bactériophages et les virus peuvent persister dans l'environnement plus longtemps que les bactéries. Peu d'études existent sur l'élimination des virus par des procédés industriels. En laboratoire, Doré & Lees (1995), travaillant sur des huîtres d'un estuaire contaminé par des eaux usées, ont montré que les phages s'éliminent beaucoup plus lentement qu'*E. coli*. Par ailleurs, Schwab *et al.* (1998) indiquent que seulement 7 % des virus de Norwalk sont éliminés après 48 heures de purification en bassin, alors que l'élimination des bactéries est de 95 %. Un des critères les plus importants de la purification des coquillages semble être la charge initiale en virus : des coquillages présentant des faibles contaminations en virus peuvent s'épurer en quelques jours (Metcalf *et al.*, 1979 ; Cook & Ellender, 1986 ; De Mesquita *et al.*, 1991 ; Scotti *et al.*, 1983). D'autres paramètres comme la température sont aussi très importants : Cook & Ellender ont montré que le temps minimum de re-largage des virus par le coquillage était de 14 jours à 10 °C et qu'il était accru d'un jour, chaque jour pendant lequel la température était inférieure à 10 °C. Doré *et al.* (1998) montrent que la température affecte l'activité métabolique du coquillage et de ce fait l'efficacité de la purification.

La plupart de ces études ont été réalisées en laboratoire. Elles semblent montrer, dans ces conditions, des temps d'élimination assez longs et des taux d'efficacité faibles. Ces résultats plaident pour une étude permettant d'améliorer les procédés de purification. Dans ce travail, nous avons testé en pilote les facteurs favorisant l'élimination virale et, une fois les paramètres fixés, nous avons reproduit des essais en grandeur réelle pour évaluer la faisabilité du procédé.

Enjeux techniques, économiques, réglementaires :

Les enjeux techniques sont liés à la possibilité de mettre au point un système efficace et si possible rapide pour éliminer les virus piégés dans les coquillages. Deux aspects doivent être pris en compte : d'une part l'élimination du virus par le coquillage (cet aspect est lié à son activité physiologique), d'autre part la désinfection de l'eau de mer qui circule dans le bassin et qui est contaminée par les virus excrétés par les coquillages.

L'enjeu socio-économique est lié à la possibilité d'offrir au consommateur un produit sain, même durant des périodes à risques qui peuvent être liées, par exemple en hiver, à l'arrivée d'eaux de pluies contaminées, aux dysfonctionnements de système de collecte ou de station d'épuration d'eaux usées. Pour cela, des systèmes fiables de contrôle de qualité sanitaire des produits doivent être élaborés et des mesures complémentaires d'épuration doivent pouvoir être mises en œuvre, si nécessaire. En offrant un outil efficace permettant de maintenir la

qualité du produit, le projet participe par ailleurs à la pérennisation de l'activité conchyicole sur les côtes françaises.

En ce qui concerne la réglementation, suite à des cas de gastro-entérites d'origine virale associées à la consommation de coquillages, l'Union Européenne envisage de modifier ses normes et de renforcer ses contrôles. Dans ce projet, des indicateurs potentiels du risque viral ont été testés, et des méthodes de recherche directe des virus mises en œuvre. Les résultats permettront d'obtenir des données, et ainsi de participer à l'évolution de ces réglementations.

1. Bilan de l'existant

La purification est obligatoire pour les coquillages élevés ou stockés dans les zones conchyicoles classées en B. Cette opération correspond à l'entreposage de coquillages dans des bassins insubmersibles durant un temps suffisant pour stimuler leur auto-épuration. Le bassin est alimenté en eau de mer de qualité satisfaisante, ou améliorée par un traitement bactéricide. Le principe général de la purification est présenté dans la figure 1.

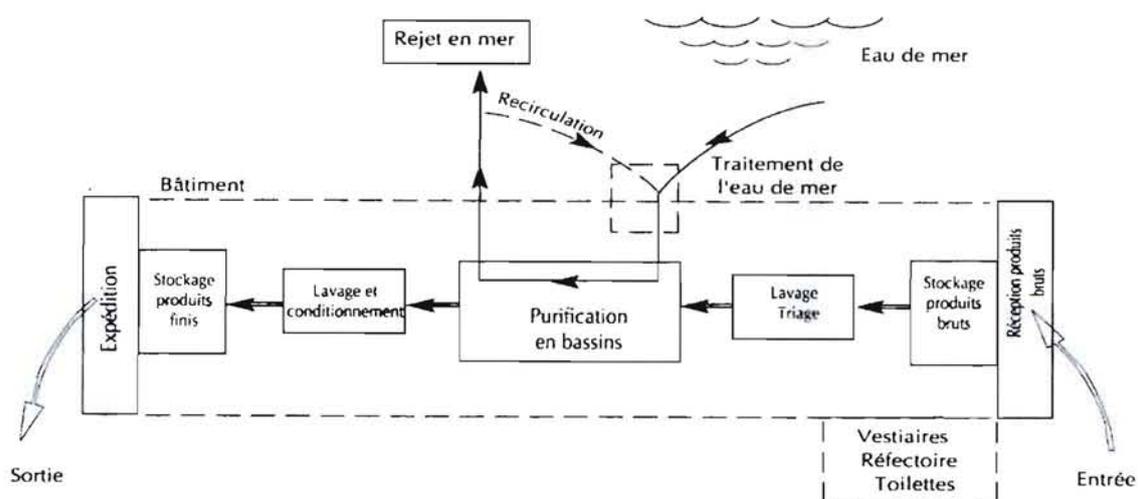


Figure 1 : Principe général de la purification (d'après Furfari S.A. 1966)

1.1. Les systèmes existants

Les bassins les plus couramment utilisés sont en béton, peu profonds (0.80 à 1 m), avec une pente pour l'évacuation totale des eaux. Ils sont alimentés en direct du milieu ou par l'intermédiaire de réserve permettant une décantation des matières en suspension. Deux systèmes sont utilisés :

- le système en circuit ouvert (alimentation permanente),
- le système en circuit fermé (re-circulation continue ou discontinue).

Des systèmes d'aération de l'eau et de re-circulation interne permettent d'adapter l'oxygénation aux espèces et aux volumes de coquillages traités.

1.1.1. Les bassins et leurs équipements

L'équipement de première génération de type proche de Reynolds N (Simplified depuration, 1955) le plus couramment utilisé par les établissements professionnels, consiste en un simple bassin insubmersible aéré (BIA). Différents systèmes d'aération sont proposés et présentés sur la figure 2.

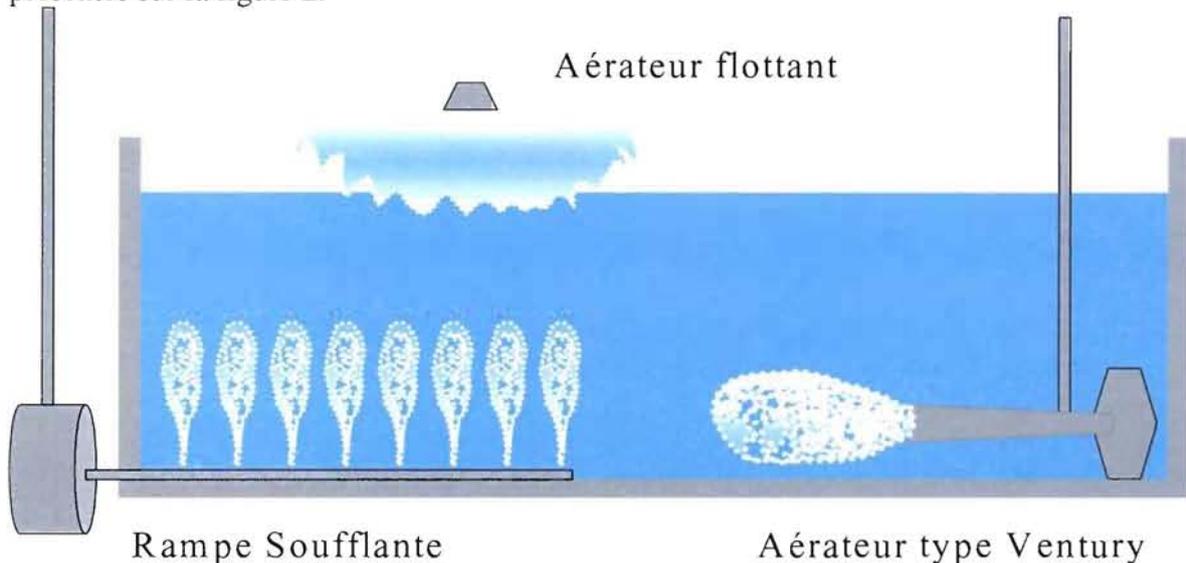


Figure 2 : Procédés d'aération les plus couramment utilisés en bassin insubmersible.

Source : Lesne.J Coquillages et santé publique Du risque à la prévention. 1992

Une stabulation d'au moins 48 heures est préconisée pour obtenir des résultats satisfaisants, en terme de décontamination, par rapport au germe indicateur de contamination fécale : *E. coli*.

Plusieurs adaptations, à partir de cette base, ont été apportées et principalement :

Une re-circulation permanente complémentaire à l'aération : un flux lamellaire traverse le bassin, permettant l'évacuation des fécès, pseudo-fécès et autres déchets libérés par les coquillages. Dans ce contexte pour éviter la remise en suspension de ces matières, un filtre à sable est indispensable.

Un système d'écumage de l'eau de mer : Ce procédé retire la matière organique et les particules fines de l'eau en les concentrant dans l'écume. L'écume obtenue est évacuée à l'extérieur du bassin de purification.

1.1.2. La désinfection de l'eau de mer

Dans le cadre d'un traitement de l'eau de mer d'approvisionnement, deux types de procédés sont utilisés :

- Les procédés chimiques de désinfection par l'ozone ou le chlore.
- Les procédés physiques de désinfection par les ultra-violets.

Pour les deux procédés chimiques, anciennement les plus utilisés, le principe de la désinfection de l'eau est basé sur l'action bactéricide du brome contenu dans l'eau de mer. Pour les ultra-violets, c'est l'utilisation du rayonnement germicide des lampes UV, basses ou hautes pressions. A ce jour, la désinfection aux ultra-violets est largement utilisée par les établissements conchylicoles. La pratique de ce procédé, particulièrement lors de l'alimentation à partir d'eaux estuariennes, nécessite un équipement annexe constitué d'un filtre à sable pour éliminer le maximum de matières en suspension et ainsi augmenter le pouvoir germicide du rayonnement.

1.1.3. Les règles de Bonnes Pratiques Hygiéniques pour la Purification ou HACCP¹

Dans le type d'installation décrit ci-dessus, lorsque les règles de fonctionnement sont respectées on peut espérer obtenir rapidement des produits répondant aux normes de mises en marché. Pour cela, rappelons que les opérations de purification exigent de l'opérateur, une parfaite connaissance des risques sanitaires, une rigueur tout au long de la procédure et un contrôle continu du bon fonctionnement des installations.

Le Comité National de la Conchyliculture, France (CNC) et la Confédération des Industries des Traitements des Produits des Pêches Maritimes (CITPPM) ont réalisé un document "*Le Guide des Bonnes Pratiques Hygiéniques pour la Purification et l'Expédition des coquillages vivants*" (février 2001). Dans ce guide très complet, on retrouve les différentes phases de préparation des coquillages pour la mise en marché (figure 3). L'élaboration du guide est basée sur les principes de l'HACCP. Il rappelle les principales exigences de la réglementation en matière d'hygiène et propose des mesures complémentaires permettant d'assurer la salubrité des coquillages au moment de leur mise sur le marché.

¹ En anglais HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point en français : Analyse des dangers potentiels, points critiques pour leur maîtrise

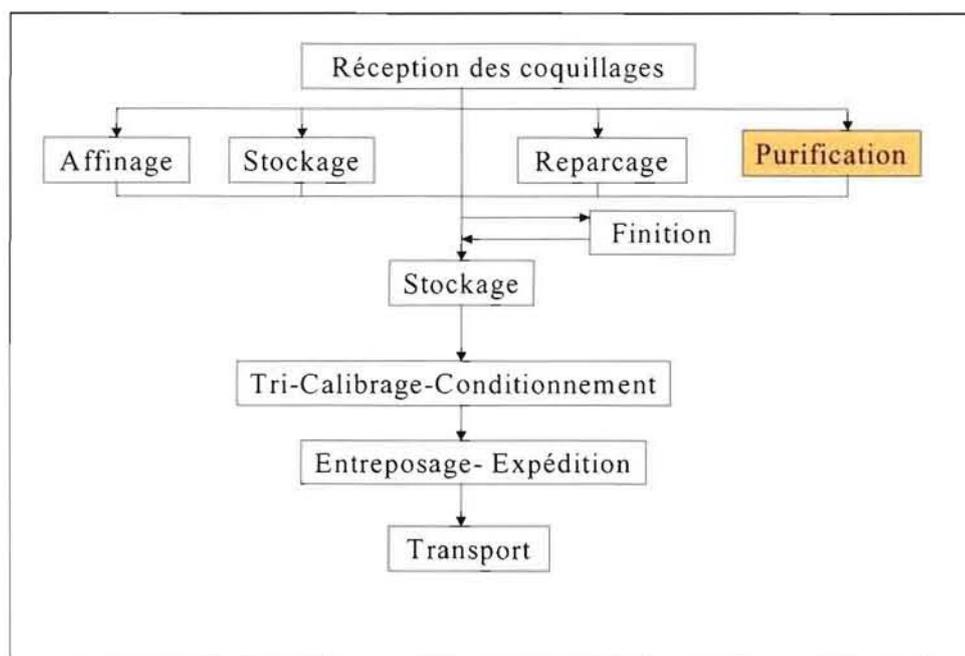


Figure 3 : Les principales étapes de mise sur le marché des coquillages vivants

Pour la maîtrise de l'opération de purification, il faut apprécier :

- **Les limites et dangers susceptibles d'interférer sur la qualité de la purification :**
 - La purification ne permet pas la décontamination des coquillages contaminés par les métaux lourds et/ou les phycotoxines, il y a donc des limites à la purification.
 - Le classement sanitaire des zones de production ne peut garantir que les produits en élevage possèdent systématiquement, 365 jours par an, le niveau correspondant à ce classement. L'importance du niveau initial de la contamination bactériologique du coquillage est donc à prendre en compte.
- **Les principaux facteurs maîtrisant l'efficacité de la purification**

Les différentes étapes de la purification (figure 4) nécessitent de maîtriser différents paramètres :

- La qualité initiale de l'eau de mer d'approvisionnement des bassins de purification est importante.
- Si celle-ci n'est pas suffisante, un traitement est requis, il existe cependant des limites aux procédés de traitement de l'eau de mer (élimination des contaminations physico-chimiques).
- Les capacités de traitement des bassins de purification doivent être en adéquation avec les tonnages commercialisés par l'établissement.

- Les équipements annexes (pompe de recyclage, systèmes d'aération) doivent être modulables en fonction des espèces et des volumes de coquillages traités.
- La durée du traitement de purification est à respecter.

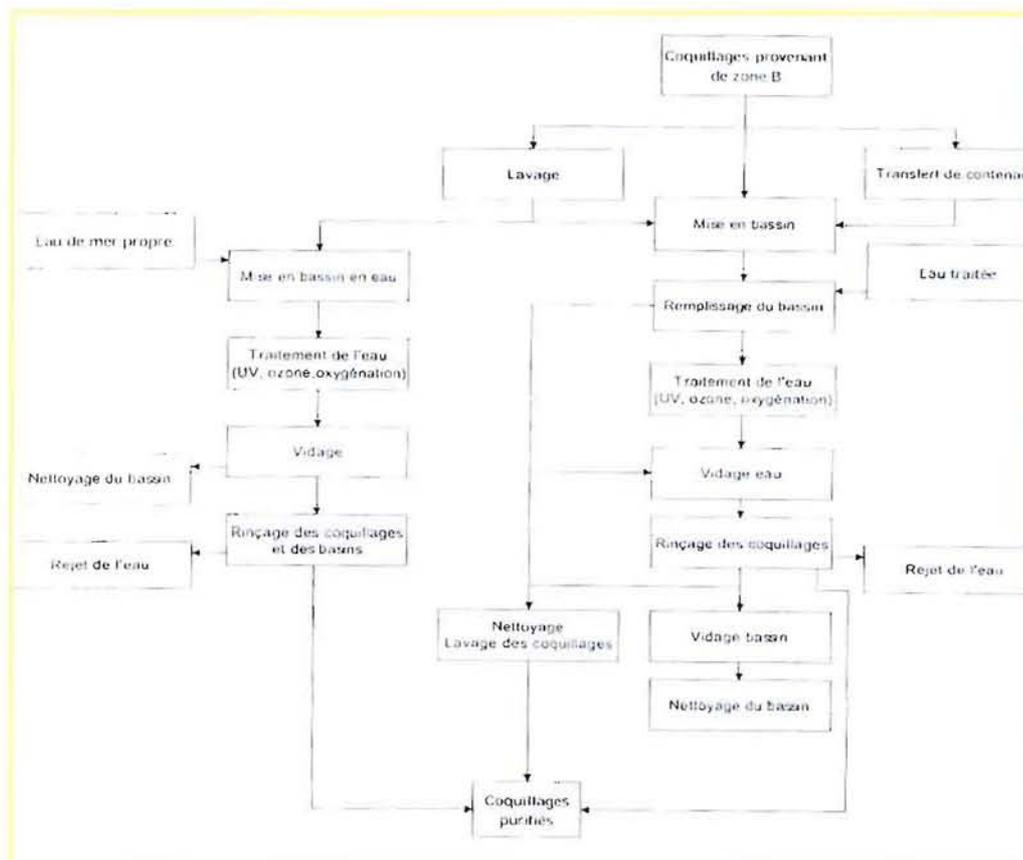


Figure 4 : Les principales étapes de la purification des coquillages

Source : Guide des bonnes pratiques hygiéniques pour la purification et l'expédition de coquillages vivants. CITPPM.CNC 10.02.2001.

La prise en compte de ces principaux points critiques est fondamentale pour une bonne purification des coquillages. Pour une parfaite maîtrise de la qualité sanitaire des produits, la démarche HACCP intervient tout au long des étapes de mise sur le marché des coquillages vivants, de la réception des produits à l'établissement jusqu'à la commercialisation pour la consommation directe.

1.2. Evaluation de la station de purification Prat Ar Coum

Dans un premier temps, notre démarche a été de vérifier l'efficacité de la purification virale d'une installation existante : celle de l'établissement conchylicole S.A Prat Ar Coum (commune de Lannilis) installé sur la rive droite de l'estuaire de l'Aber Benoît (figure 5).

L'alimentation en eau marine de l'établissement se fait par une prise d'eau, placée sur l'estran face à l'établissement à un niveau de coefficient de marée de 80, dans la zone n° 29.02.04 classée administrativement en B (Arrêté Préfectoral n° 2000-0806 du 25.05.2000). Sur cet estran sont également présents des concessions d'élevage et des bassins submersibles appartenant également à la S.A. Prat Ar Coum.

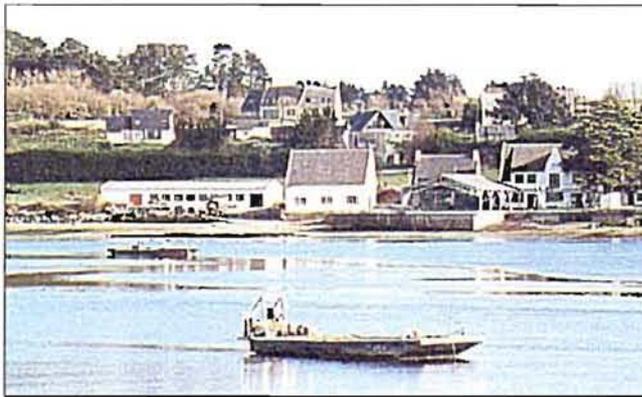


Figure 5 : Etablissement S.A Prat Ar Coum à Lannilis, vue de la rive gauche. *Photo LE SAUX J-C*

1.2.1. Descriptif de la station de purification de Prat Ar Coum

La station est équipée d'un traitement de l'eau aux Ultra-Violet (U.V) et de 2 bassins de purification de 105 m³ chacun dans lesquels transitent les coquillages à traiter (figure 6). Du pompage au recyclage de l'eau, les équipements suivants jalonnent le procédé :

- Un pompage direct dans l'Aber Benoît par une prise d'eau de 80 m³/h.
- Un filtre à sable, avec un seuil de filtration de l'ordre de 15/20 µm.
- Un stérilisateur de l'eau aux U.V équipé de 6 générateurs de 40 Watts, fournissant une dose UV-C de 25.75 mJ/cm² minimum.
- Deux bassins de purification de 105 m³ chacun (L/ 12.5m x l/ 6.5m x P/ 1.3m), non couverts, d'une capacité de traitement entre 10 et 15 tonnes de coquillages suivant l'espèce concernée et qui peuvent fonctionner en circuit fermé par recirculation de l'eau à 50 m³/h.
- Par bassin :
 - un système d'oxygénation de type ventury qui fonctionne 15 mn toutes les 45 mn, positionné entre l'arrivée et la sortie d'eau, et dont l'air propulsé est orienté vers l'arrivée.
 - une pompe de vidange de 50 m³/h, rejet direct dans l'Aber-Benoît.

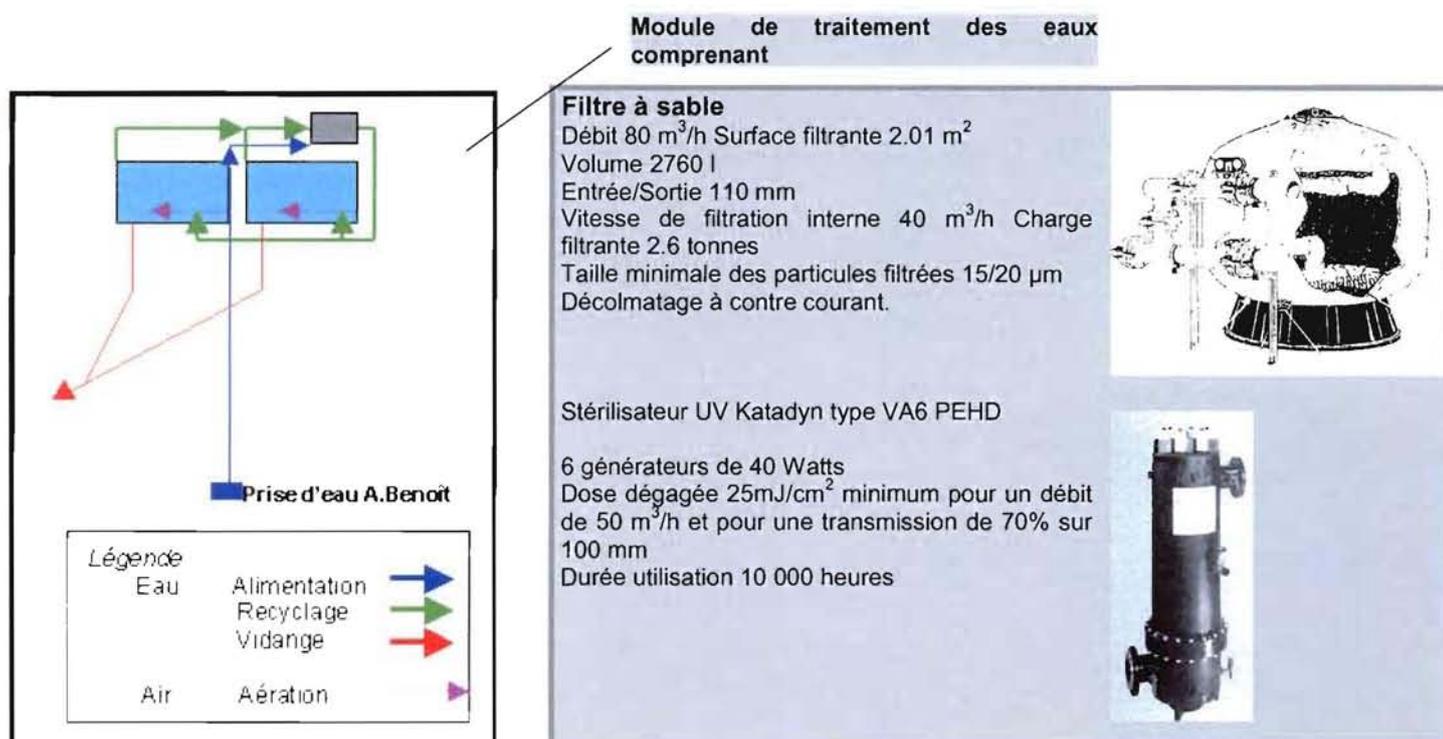


Figure 6 : Schéma de l'installation de purification Prat ar Coum

En complément de ces équipements de purification, cette installation dispose d'un portique avec palan électrique pour l'immersion et l'émersion des paniers de coquillages. Le sens de circulation de l'eau dans le bassin de purification est décrit ci-dessous (figure 7)

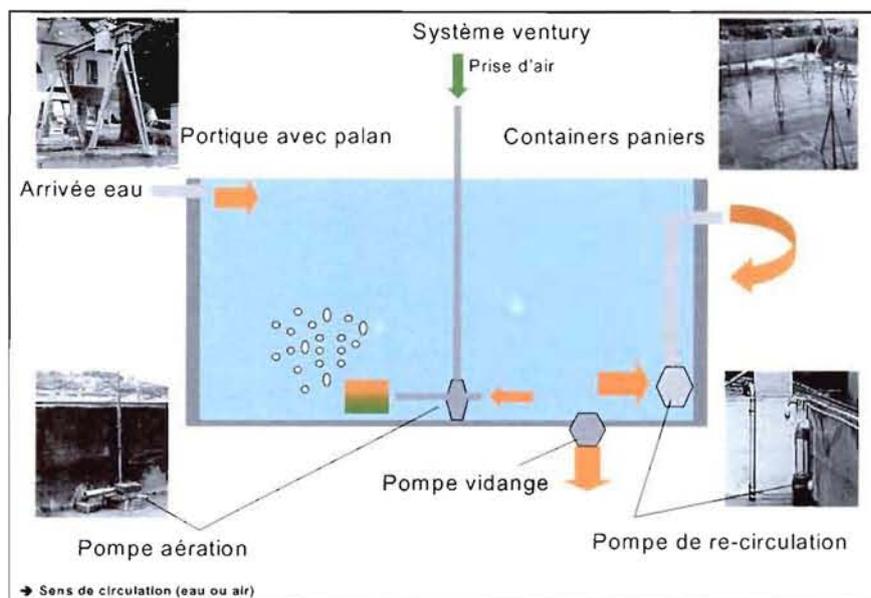


Figure 7 : Schéma type d'un bassin de purification Prat Ar Coum et sens de circulation de l'eau

1.2.2. Etude des performances de la station de purification

Hydraulique

Afin de connaître l'éventuelle influence de la charge en paniers de coquillages sur la circulation globale de l'eau, des tests à base de rhodamine, colorant fluorescent neutre ont été effectués. La tache fluorescente a été suivie visuellement, et des prélèvements ont été faits simultanément soit sur l'ensemble de la surface du bassin, soit à un point sur la verticale. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un spectrofluorimètre (Séquoia Turner, modèle 450).

Les tests se sont déroulés le 25 mai 2000, dans les conditions normales de fonctionnement du bassin :

- hauteur d'eau 1,20 m ;
- volume 97,5 m³ ;
- débit de la pompe 50 m³/h ;
- aération par système Venturi, pendant 15 minutes, toutes les 45 minutes.

L'injection de la rhodamine s'est faite dans le jet de l'arrivée d'eau de mer, 15 minutes avant la mise en route de l'aération (figure 8)

Dans le bassin vide de coquillages, 300 ml de rhodamine ont été injectés (fluorescence 50 000 unités). Après 15mn, l'ensemble de l'eau du bassin est coloré. La fluorescence observée aussi bien en surface qu'au fond est faible et relativement bien homogène (mini fluo/13 unités – maxi fluo/28 unités). Ces résultats indiquent une très forte et très rapide dilution de l'ensemble des eaux du bassin qui réagit de façon homogène



Figure 8 : Injection de rhodamine dans l'arrivée d'eau - T0 + 30 s (bassin avec coquillages)

Pour le second test, des paniers remplis de coquilles d'huîtres symbolisaient une charge moyenne du bassin. Pour 600 ml de rhodamine injectés, après 30 mn on a constaté, comme pour le test précédent, une homogénéité de l'ensemble des eaux du bassin (mini fluo/10 unités - maxi/13 unités).

En conclusion, cette expérience a montré que la circulation de l'eau ainsi que l'aération, telles qu'elles ont été conçues, permettaient une rapide homogénéisation de la masse d'eau du bassin.

Rôle du filtre à sable

Le recyclage des eaux passe par un système d'UV qui est précédé d'un filtre à sable (Cf. figure 6). Afin de vérifier l'efficacité du filtre pour retenir les phages et les virus, nous avons suivi une opération de vidange. L'expérience a eu lieu après 8-10 jours de fonctionnement 'professionnel' du filtre sans nettoyage.

En utilisation normale, le nettoyage hebdomadaire du filtre se fait par décolmatage à contre courant. C'est dans ce cadre que nous avons analysé la qualité sanitaire des eaux de lavage par tranche de 300 litres. Les teneurs en matières en suspensions et en bactériophages F+ARN spécifiques ainsi que les valeurs de pH, température et salinité, sont présentées dans le tableau 1.

Volume litres	PH	S ⁰ /00	T°C	MES mg/l	Phages UFP/100ml
300	7.49	33.4	9.7	24.66	<LD
300	7.48	33.1	9.8	9.13	<LD
300	7.45	33.1	9.8	17.96	<LD
300	7.45	33.1	9.9	103.60	1033
300	7.33	33.1	9.8	63.03	533
300	7.48	33.1	9.8	105.15	733
300	7.45	33.1	9.8	126.80	1666
300	7.45	33.1	9.8	126.85	1200
300	7.47	33.1	9.8	137.55	1530
300	7.47	33.1	9.8	174.15	1600
300	7.49	33.1	AM	124.95	1200
300	AM	33.1	AM	55.32	<LD

LD = Limite Détection AM = Absence Mesure

Tableau 1 : Paramètres physico-chimiques et résultats analytiques des eaux de lavage du filtre à sable, en situation professionnelle (4 avril 2000).

La vidange a été marquée par l'arrivée progressive d'une eau de plus en plus chargée en matières en suspension (figure 9). A mi-vidange, les teneurs étaient de plus de 100 mg/l, la plus forte valeur obtenue étant de 174 mg/l après 3000 litres. La charge en bactériophages augmente en même temps que les teneurs en matières en suspension (maximum atteint : 1 600 UFP/ 100 ml). A terme, cette opération a conduit à récupérer pour 3.6 m³ d'eau de lavage, 320.745 g de matières en suspension pour une contamination en bactériophages équivalente à 2.85 10⁷. La figure 11 présente la relation entre les concentrations en MES et en bactériophages (F+ARN spécifique) au cours de l'opération de lavage.

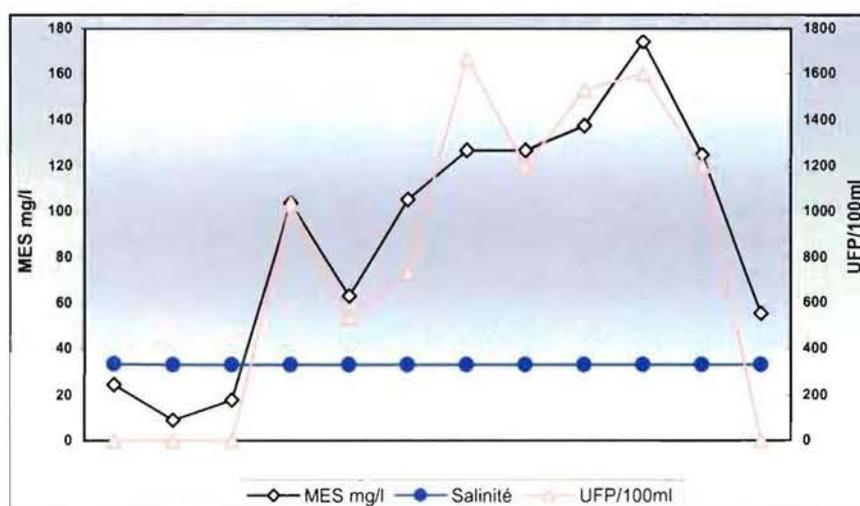


Figure 9 : Evolution des concentrations en matières en suspension (MES mg/l) et en bactériophages (UFP/100 ml) au cours de l'opération de lavage du filtre

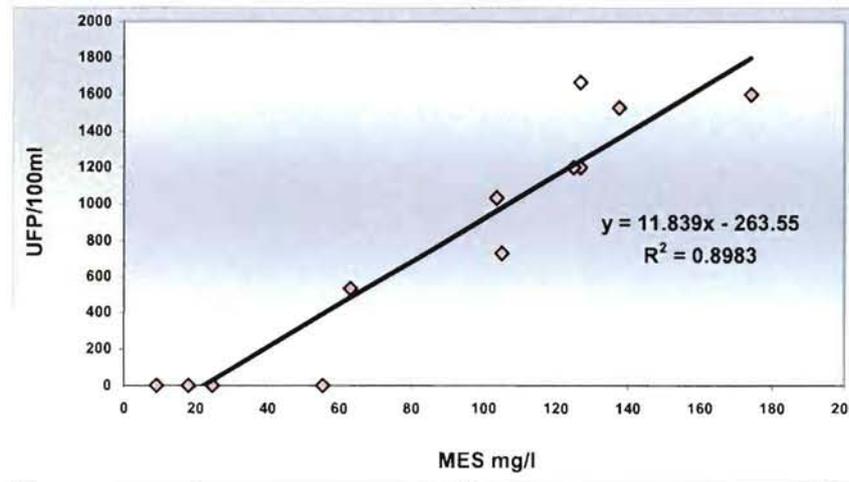


Figure 10 : Relation entre les concentrations en matières en suspension (MES mg/l) et en bactériophages (UFP/100 ml) au cours de l'opération de lavage du filtre.

Effacité du traitement U.V sur la qualité des eaux

Le système U.V utilisé est décrit sur la figure 6. Cette installation opérationnelle depuis 10 ans, a fait l'objet de tests en vue de son agrément sanitaire au début des années 1990. Les résultats obtenus dans ce cadre, avaient démontré l'efficacité des UV sur le paramètre *E. coli*. Sept tonnes d'huîtres avaient été artificiellement contaminées ($T_0 : 4.1 \cdot 10^5 E. coli/100 g^2$). L'évolution des concentrations de l'eau et des coquillages avait été suivie pendant 48 heures (Caillères, 1992). Après 36 heures de traitement de ces huîtres très contaminées (contamination équivalente à une zone d'élevage insalubre de classe C), la contamination moyenne de l'eau était de l'ordre de 14 *E. coli*/100 ml, puis de 6 *E. coli*/100 ml³ au bout de 48 heures.

Afin de vérifier l'efficacité des U.V. sur les bactériophages (et sur les virus), l'eau du bassin a été cette fois-ci artificiellement contaminée avec une souche de phage MS2 qui est utilisée comme un modèle viral. Une heure après l'injection dans le bassin d'une solution à $6 \cdot 10^{11}$ phages la concentration moyenne en bactériophages était de 2 900 UFP/ml. Ensuite le module de traitement (filtration & U.V) a été déclenché, et des prélèvements d'eau ont été réalisés au milieu et en surface du bassin. Les résultats de cette étude sont reportés sur le tableau 2 et la figure 11.

² de chair et de liquide intervalvaire

³ Limite de détection

Temps (mn)	UFP/ml (M.G milieu/surface)
0	2 900
55	2 570
115	2 350
192	1 010
235	514
295	579
348	290
1380	36,5

Tableau 2 : Evolution des concentrations en MS2 dans l'eau du bassin en fonction du temps de traitement (module Filtration & U.V).

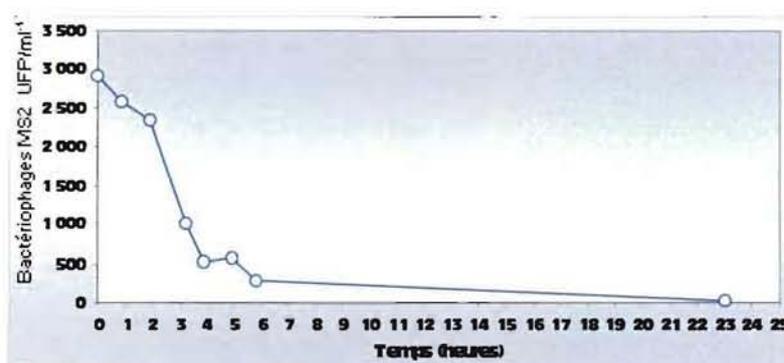


Figure 11 : Cinétique des concentrations en bactériophages MS2 dans l'eau du bassin en fonction du temps de traitement (module Filtration & U.V)

Après 6 heures de traitement, on observe une diminution d'un facteur 10 des concentrations de phages dans le bassin. Au bout de 23 heures, la concentration a diminué d'un facteur 100. Les concentrations initiales en phages dans les eaux du bassin, lors de cette expérimentation, étaient très largement supérieures à celles que l'on peut trouver dans un bassin en activité : une décroissance d'un facteur 100 devrait être suffisant lors d'un traitement dans des conditions normales d'activité.

Efficacité du traitement UV (de l'eau) sur la qualité microbiologique de coquillages artificiellement contaminés

E. coli

Sur cette installation, pour une charge en huîtres creuses de 7 tonnes, Caillères (1992) a montré qu'avec une contamination artificielle initiale de $4.15 \cdot 10^4$ *E. coli*/100 g, un temps de traitement en UV de 48 heures permettait un abattement de 2.5 log soit un niveau final de $1.36 \cdot 10^2$ *E. coli*/100 g.

Bactériophage

Un test a été fait dans cette étude sur les bactériophages MS2, utilisés comme un modèle de virus. A partir d'un millier d'huîtres artificiellement contaminées en bactériophage MS2, deux lots ont été entreposés dans le bassin : le premier en surface près de l'arrivée d'eau de mer et le second posé au fond près de la pompe de re-circulation. Au cours des 8 jours de suivi, la température de l'eau de mer a varié de 16,4 °C à 19 °C. A T0, la concentration en bactériophages dans les huîtres était en moyenne de $4.5 \cdot 10^6$ UFP/100 g. La figure 12 représente la cinétique de décontamination des huîtres.

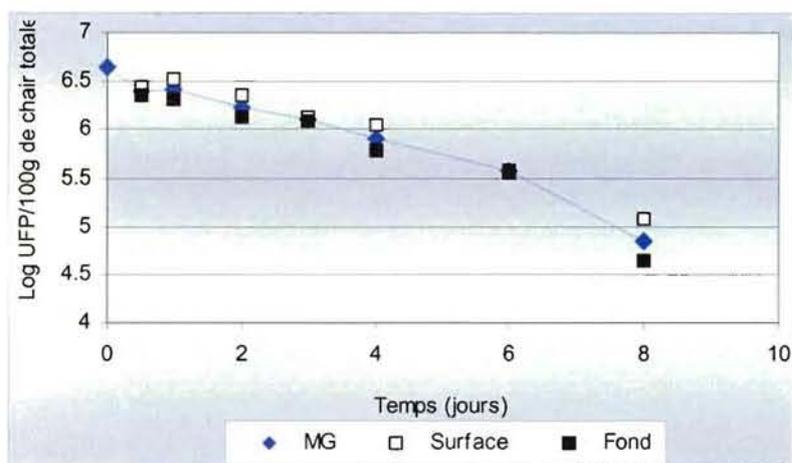


Figure 12 : Evolution de la contamination en bactériophages MS2 dans les huîtres creuses au cours du traitement de purification.

Les principaux résultats montrent l'absence d'écarts significatifs suivant l'emplacement des huîtres. La décontamination en bactériophages est très longue dans ces conditions de température soit de 2.5 log en 8 jours.

Efficacité du système sur des huîtres naturellement contaminées

Il était également intéressant de suivre la décontamination virale dans des coquillages mis dans le bassin *en condition professionnelle* (soit 48 heures). Pour cela, différents échantillons provenant de zones naturellement contaminées (niveau B) ont été placés dans le système décrit ci-dessus. Les résultats sont reportés sur le tableau 3.

Origine	Espèce	T °C eau bassin	T0			T48h		
			<i>E. coli</i>	Phage*	Virus	<i>E. coli</i>	Phage*	Virus
Aber Benoit 24.11.99	HPI	/	< 30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit 24.11.99	HCr	11,9	30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit 26.11.99	HPI	11,9	< 30	750	+	30	1 150	-
Aber Benoit 13.12.99	HPI	7,9/9,3	30	< LD	-	< 30	392	-
Jaudy 07.04.00	HCr	12,7	Nd	281	-	Nd	206	+
Jaudy 18.04.00	HCr	14,7	1400	3 430	-	6000	2 255	-
Crac'h 18.04.00	HCr	14,7	Nd	< LD	-	< LD	< LD	-
Jaudy 05.05.00	HCr	12,4/16,4	130	292	-	Nd	< LD	-
Jaudy 05.05.00	HCr	16,4	130	292	-	Nd	< LD	-
Jaudy 18.05.00	HCr	14,8/16,9	170	< LD	-	< 30	< LD	-
Jaudy 18.05.00	HCr	16,3	170	< LD	-	< 30	< LD	-

* bactériophages F+ARN spécifique & *E. coli* /100 g de chair et de liquide intervalvaire

Tableau 3 : Essais de purification virale avec l'installation existante et selon les pratiques professionnelles.

Des contrôles en *E. coli*, virus et F+ ARN spécifiques ont été réalisés avant et après traitement de purification de 48 heures. Des analyses de virus entériques (norovirus ou virus de Norwalk) ont également été réalisées.

Avant la purification (T0), les échantillons présentaient une qualité très hétérogène. La plupart répondaient à la norme microbiologique (< 230 *E. coli*) sauf quelques échantillons issus d'un lot impliqué dans une TIAC (rivière du Jaudy). Les concentrations en phages F+ARN spécifique étaient, pour de nombreux échantillons également en limite de détection (100 UFP/100 g chair) sauf là encore, les coquillages issus du Jaudy qui présentaient des valeurs assez élevées. Enfin un échantillon était positif en virus Norwalk-like.

Après 48 h, les résultats obtenus étaient très aléatoires : sur le plan *E. coli* le lot initialement très contaminé s'était assez mal épuré. En ce qui concerne les phages pour les deux lots très chargés à T0, la qualité ne s'est pas elle non plus améliorée. Les résultats sur les virus sont trop aléatoires et trop peu nombreux pour en tirer une conclusion : dans le cas des huîtres plates de l'Aber Benoit, les échantillons sont devenus négatifs pour les calicivirus, alors que les niveaux en bactériophages sont restés identiques. Dans le cas des huîtres du Jaudy (05/05/00) impliquées dans des TIACs, le virus n'a pas été détecté.

1.3. Conclusions : performances et limites du système étudié

Le type d'installation étudié sur le site de Prat ar Coum - filtration et traitement UV associé - permet d'améliorer significativement la qualité bactériologique de l'eau en *E. coli* et de répondre ainsi dans un temps relativement court (48 heures) aux exigences réglementaires pour les coquillages, sous réserve de respecter les règles HACCP.

Néanmoins la fiabilité de cette installation par rapport à une contamination virale, tel que le problème peut se poser à certaines époques de l'année, n'est pas performant pour un temps de purification identique à celui d'*E. coli*. Les expériences de décontamination sur les huîtres artificiellement contaminées le démontrent : il faut 8 jours au système pour assurer une décroissance de 2,5 log.

Le principal problème de ce type de contamination est lié au fait que les virus peuvent persister très longtemps dans l'environnement, beaucoup plus longtemps qu'*E. coli*, et particulièrement lorsque les eaux de mer sont à des températures basses (< 16 °C dans nos expériences). Ceci est conforme aux travaux déjà publiés sur le sujet et à la synthèse que nous avons réalisée précédemment⁴. Dans un rapport intermédiaire (Caprais *et al.*, 2001), nous avons conclu suite à une série d'expériences réalisées en bacs expérimentaux, à l'importance de certains facteurs permettant d'éliminer les virus. Il s'avérait, dans les conditions expérimentales, que la température était le facteur le plus déterminant vis-à-vis de l'épuration des coquillages. Lorsque ces températures augmentaient, à partir de 15 °C, la décroissance de la contamination était plus importante. L'épuration la plus efficace du coquillage avait été observée à 20 °C.

Un pilote a ainsi été construit et validé pour optimiser la purification virale et obtenir des produits présentant une meilleure qualité sanitaire avant la mise en marché.

⁴ G Brest *et al.*, 2001, Purification virale des coquillages. Contrat DGAL ; Caprais MP *et al.*, 2001, Evaluation et adaptation d'un système de purification des coquillages pour l'élimination des virus entériques, rapport intermédiaire, Ofimer.

2. Elaboration du Pilote pour la purification virale

2.1. Paramètres impliqués dans la purification

La purification des coquillages est basée sur le principe que le coquillage immergé dans une eau de bonne qualité va "dégorger" naturellement les contaminants qu'il a pu séquestrer dans ses tissus et en particulier dans son système digestif. La spécificité de la contamination est liée au fait que les coquillages peuvent concentrer, bactéries et virus présents dans l'eau environnante. Ces microorganismes s'accumulent préférentiellement dans les tissus digestifs et semblent plus facilement assimilés s'ils sont associés à des particules ou à des fécès.

Une étude bibliographique concernant la purification des coquillages a été précédemment réalisée⁵. Les principales conclusions de cette revue concernant les mécanismes de concentration et d'élimination des virus par les coquillages sont les suivantes :

L'accumulation des microorganismes dans les coquillages est très rapide (quelques heures). Les virus par leurs propriétés physico-chimiques ont tendance à s'adsorber ou s'agréger entre eux, ce qui favorise le phénomène de concentration par les coquillages. La concentration dans le coquillage est plusieurs dizaines de fois supérieure à celle du pathogène dans l'eau environnante.

La charge bactérienne et virale varie fortement d'un individu à l'autre, au sein d'un même groupe. Ainsi sur un même lot de coquillages (ou dans une même assiette), un seul peut être contaminé.

Les microorganismes pathogènes strictement humains ne pénètrent pas dans les tissus et restent essentiellement dans le tractus digestif, en particulier dans la glande digestive et le pancréas. Les résultats d'études expérimentales suggèrent que les pathogènes faiblement attachés aux tissus (contamination récente), s'éliminent plus vite lors de la purification, que ceux profondément enfouis et attachés aux parois et diverticules intestinaux (contamination ancienne).

Les principaux paramètres jouant un rôle important sur la purification sont :

- **La température** qui commande la physiologie du coquillage et de ce fait joue un rôle important dans l'efficacité de la purification du coquillage. A basse température (< 14 °C), les coquillages ont une activité physiologique très diminuée et des fonctions de relargage faibles. Par contre à des températures plus élevées, (18-22 °C) ils seraient physiologiquement plus actifs et de ce fait les microorganismes seraient plus facilement éliminés.

⁵ G. Brest *et al.*, 2001, Purification virale des coquillages, contrat DGAL/CNC, 41 pages.

- **La salinité** comme le paramètre précédent, affecte les fonctions de pompage et des changements de salinité peuvent entraîner des périodes d'acclimatation qui défavorisent la rapidité de la purification (une variation de 10 % suffit à réduire la filtration).
- **Le taux d'oxygène dissous** est d'une manière générale très important. La demande en oxygène des coquillages en bassin est très élevée, surtout si la charge est forte, d'où la nécessité des systèmes d'oxygénation (type Ventury ou autres). Il est recommandé que des valeurs supérieures à 2 mg/ml soient maintenues pendant toute la durée de la purification, cela doit limiter aussi les phénomènes de mortalité.
- **Le taux de filtration** joue un rôle extrêmement important sur la purification. Il peut varier d'une huître à l'autre, d'un coquillage à l'autre, il doit être favorisé en ajustant les paramètres précités pour que l'activité physiologique soit la plus active possible.
- **La turbidité** semble jouer un rôle modéré dans la purification : à faible taux elle pourrait être favorable (aliment pour le coquillage). Mais à forte concentration, les matières en suspension empêchent la pénétration des ultra-violetts, dans l'eau et ainsi leur action de désinfection est amoindrie.
- **L'alimentation en algues** peut avoir certains effets positifs sur la purification en accélérant le transit intestinal, mais seulement lorsque les températures ne sont pas trop basses.
- **La circulation de l'eau** est également un facteur déterminant, puisque qu'elle accroît indirectement la teneur en oxygène dissous nécessaire à un bon état physiologique de l'animal.
- **La concentration initiale en microorganismes** : les résultats montrent que plus le coquillage est contaminé, plus la purification sera longue et souvent inefficace pour certains microorganismes.
- L'efficacité et la rapidité de la purification dépendent enfin **du type de virus ou de bactéries** qui contamine le coquillage.

Pour conclure, la purification s'avère efficace sur des coquillages actifs. L'augmentation de température, l'oxygénation, la circulation des eaux, accélèrent la physiologie des coquillages qui filtrent plus et donc se purifieraient ainsi plus vite.

2.2. Construction du Pilote de purification virale

2.2.1. Conception du Pilote

Pour une parfaite maîtrise des différents lots de coquillages à purifier, il était préférable que la structure de purification s'articule autour de plusieurs modules indépendants, chaque bassin pouvant ainsi recevoir des lots de coquillages de qualité sanitaire et de provenance différenciées.

La taille du pilote a été un compromis entre les exigences expérimentales et celles d'un système professionnel : en fait il s'agit d'une réduction en taille, au dixième du système existant à Prat ar Coum.

Par rapport aux paramètres impliqués dans la purification, chaque bassin a été individuellement équipé d'un système de recirculation, d'aération, de réchauffement et de refroidissement. Les possibilités de vitesse de pompage et de recyclage d'eau sont jusqu'à 8 fois plus élevées par rapport aux installations professionnelles.

Les quatre bassins étant totalement autonomes, ils permettent de travailler simultanément avec un même stock d'huîtres placé dans des conditions expérimentales différentes.

Enfin l'intérêt de disposer d'un bassin témoin et de trois bassins de purification similaires est de mener en même temps, différents tests, sur une même période et dans des conditions identiques d'alimentation en eau et de température extérieure. Les paramètres (T °C, % O_2 , m^3/h) sont modulables dans les autres bassins, car ils ont un impact significatif sur la physiologie des coquillages et donc sur leur capacité épurative.

Des locaux de l'établissement S.A. Prat ar Coum ont été mis à disposition pour la construction du pilote purification. A partir de 2 bassins pré-existants, anciens viviers à bigorneaux, 4 bassins ont été matérialisés et séparés par des cloisons du reste du local afin d'avoir un module de purification indépendant des conditions de travail de l'atelier. Les équipements de traitement de l'eau sont installés dans un nouveau local annexe construit de façon contiguë aux bassins.

2.2.2. Caractéristiques techniques

Les bassins

Les quatre bassins sont identiques, chacun étant indépendant au niveau alimentation, recyclage et évacuation de l'eau (figure 13). Par bassin, la pompe de re-circulation peut varier de 5 à 25 m^3/h alors que la pompe d'aération débite 12 m^3/h . Le remplissage des bassins se fait directement à partir de la prise d'eau de l'Aber-Benoît, sans filtration préalable.

- Dimensions : L (4.20 m); l (1.00 m à 2.22 m) ; P (0.82 m à 1.06 m).
- Superficie totale: 8.71 m²
- Volume total : 7.26 m³
- Volume utile : 5.82 m³
- Charge moyenne potentielle : 900 kg - huîtres creuses.

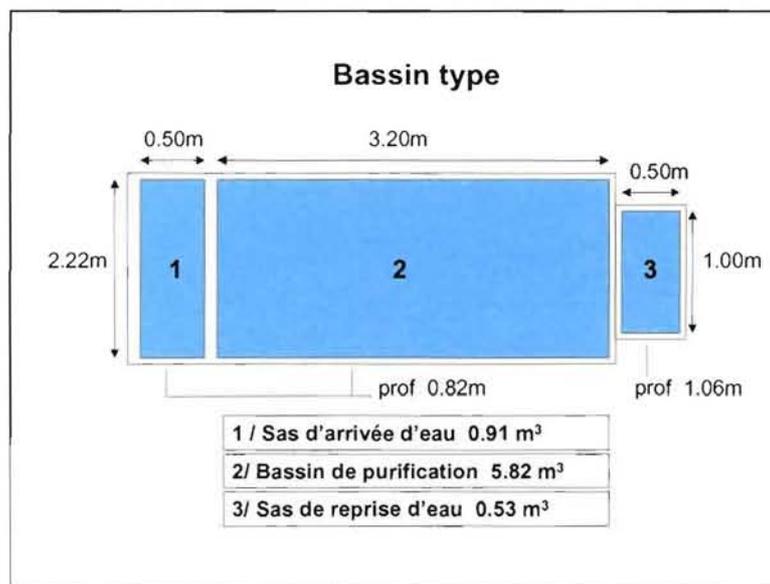


Figure 13 : Schéma type d'un bassin du pilote de purification

La circulation de l'eau dans les bassins

Pour limiter les remises en suspension tout en assurant une aération satisfaisante, la circulation de l'eau se fait du bas vers le haut, c'est-à-dire inversée par rapport à l'ancienne station de purification.

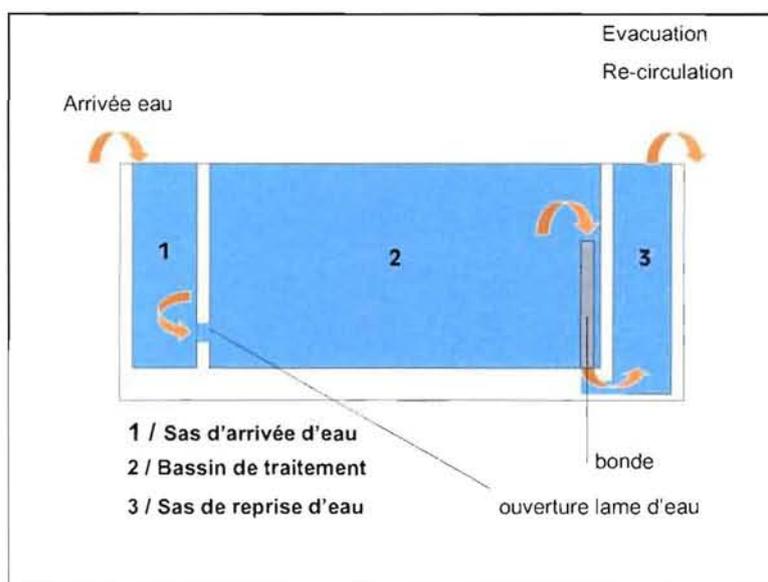


Figure 14 : Coupe d'un bassin de purification et principe de circulation de l'eau

Les équipements annexes

Le bassin A est équipé de pompe, d'un filtre à sable, d'un système U.V, d'un réchauffeur et d'un refroidisseur dont les caractéristiques sont les suivantes :

- *Pompe* : elle permet le recyclage et l'aération du bassin
 - débit 5 à 20 m³/h
- *Filtre à sable*
 - surface de filtration 0.44 m²
 - diamètre du filtre 750 mm
 - granulométrie 0.5 / 0.7
 - débit 21 m³/h
 - vitesse de filtration 50 m³/h/m²
 - pression d'essai 3.75 kg/cm²
 - pression de travail 2.50 kg/cm²
- *Système U.V*
 - débit maximum 20 m³/h
 - puissance germicide 2 x 25 watts UV-C
 - volume d'eau de la chambre 2 x 19.5 l
 - temps de contact 7.02 s
 - dose UV-C garantie 31.75 mJ/cm²

- *Réchauffeur*
 - débit de 5 à 20 m³/h
 - température de 16 à 40 °C
- *Refroidisseur*
 - débit de 5 à 20 m³/h
 - température de 8 à 40 °C

Les bassins B et C sont équipés d'un réchauffeur et d'un refroidisseur.

Le bassin témoin D est simplement muni d'une aération et d'une re-circulation de l'eau : il correspond à un bassin de type insubmersible aéré - B.I.A .

Le pilote est équipé d'un module de traitement des eaux de rejet – filtre à sable (identique à celui déjà décrit) et système UV (dose UV-C 79 mJ/cm²). L'épandage des eaux se fait sur un terrain herbu avant rejet vers Aber Benoît.

L'ensemble du dispositif est présenté sur la figure 15.

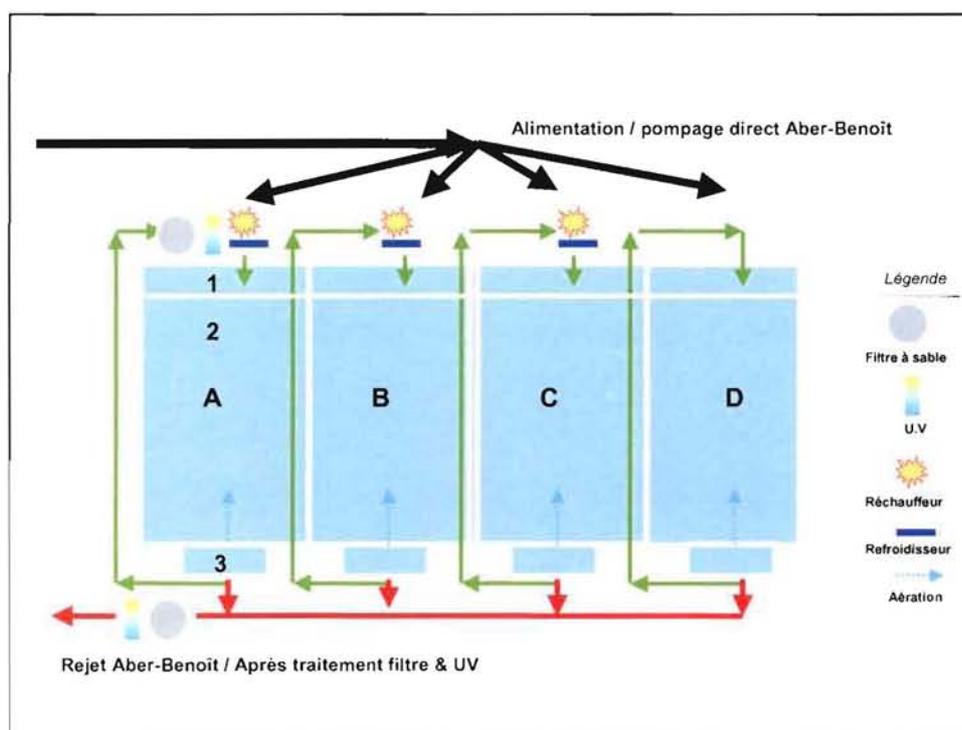


Figure 15 : Schéma du pilote de purification virale

2.3. Validation du pilote

Pour mesurer les débits, l'homogénéité de la circulation de l'eau dans les bassins, l'influence du module UV et l'efficacité du traitement, des tests de calibration ont été réalisés sur l'un des bassins, sachant que les 4 sont en tous points identiques.

2.3.1. Calibration hydraulique

Les débits

Les débits des pompes de recyclage peuvent varier de 5 m³/h à 20 m³/h. Cette vérification, à partir de données du constructeur peu nombreuses pour les débits concernés, a été réalisée à l'aide d'un manomètre placé après la pompe de recyclage et d'un débit-mètre positionné sur la plus grande longueur de tuyau afin de limiter les 'turbulences'. Pour obtenir des débits similaires entre le bassin témoin et le bassin purification, ce dernier a fait l'objet d'une modification, par suppression du ventury initial dans le sas n° 1. Ce matériel complémentaire, après un filtre à sable, un système UV, un réchauffeur et un refroidisseur, augmentait de façon considérable la pression, et de ce fait les débits souhaités ne pouvaient pas être atteints.

L'étude de calibration a également permis de constater l'influence du filtre sur les pressions/débits. Après un fonctionnement en continu, l'encrassage du filtre à sable est observé, les débits peuvent alors diminuer progressivement jusqu'à 10 % après 7 jours.

La circulation de l'eau

Comme pour le test sur le bassin professionnel existant, la calibration s'est faite avec le colorant de type rhodamine. Le protocole utilisé est similaire à la calibration précédente (§ 1.2.2). Les essais ont été conduits avec et sans coquillages. Pour une injection de 100 ml de rhodamine et pour un débit de 10 m³/h, les mesures de fluorescence étaient homogènes verticalement et horizontalement sur toute la colonne d'eau du bassin après 15 mn. Un second essai à 20 m³/h mais avec 240 kg de coquillages a donné un temps de réponse de 17 mn (figure 16).



Figure 16 : Injection de rhodamine à T₀ et T_{17min}. (bassin chargé de 240 kg d'huîtres creuses).

Ces résultats montrent une homogénéisation très rapide de l'eau, du fait de la conception du sens de circulation de l'eau, du bas vers le haut et du coefficient relatif aux débits de recirculation sur le volume du bassin > 1 (contrairement aux bassins professionnels existant qui ont un ratio ≤ 1).

2.3.2. Validation du programmeur de température

La température est programmée par l'intermédiaire d'un réchauffeur et d'un refroidisseur montés en parallèle. A titre d'exemple, dix neuf heures sont nécessaires soit, pour augmenter la température d'un bassin de 11 °C à 23.5 °C, soit, pour diminuer de 17 °C à 9 °C. La stabilité de la température peut être maintenue dans les quatre bassins à des températures différentes comprises entre 8 °C et 25 °C, sans influence des températures de l'air du local ou de l'eau des autres bassins (figure 17).

La vitesse d'augmentation ou de diminution de la température d'eau des bassins est uniquement fonction des volumes d'eau échangés soit sur le réchauffeur, soit sur le refroidisseur. A noter que le fonctionnement des lampes U.V ne modifie pas significativement la température de l'eau des bassins.

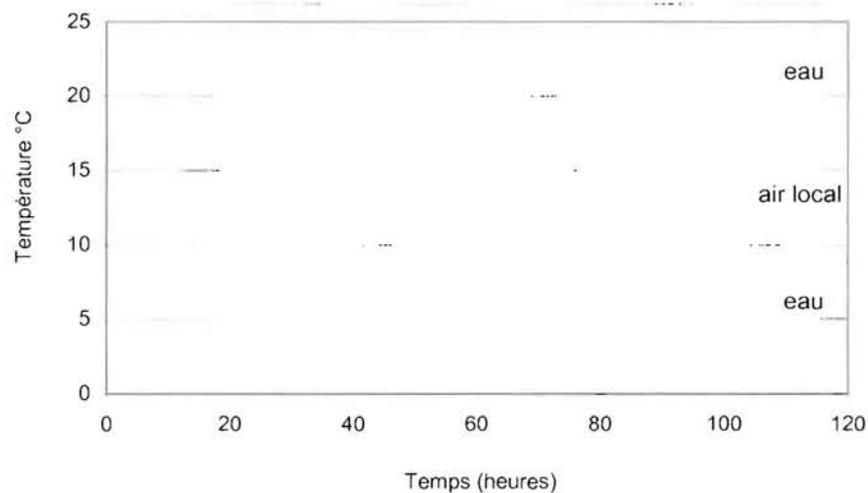


Figure 17 : Evolution des températures programmées de l'eau des bassins (23.5 - 9 °C) en fonction de la température du local.

2.3.3. Efficacité du module de purification des eaux

Deux expériences ont été réalisées pour appréhender l'efficacité du module de traitement des eaux (filtre à sable et UV), sur une eau artificiellement contaminée par des phages MS2. Dans un premier temps, l'eau du bassin pilote a été contaminée par la suspension de phages, puis la pompe de recyclage a été mise en marche. L'eau circulait en circuit fermé sans autre système

qu'une aération minimale. Dans un second temps, immédiatement après la mesure du T0, le filtre et les lampes UV ont été actionnés. Les conditions expérimentales étaient les suivantes :

- température de l'eau 10.5 °C
- débit de recyclage 20 m³/h
- puissance UV 31.75 mJ/cm²

Résultats

Les prélèvements d'eau ont été réalisés en tête de bassin n° 1 (seul bassin équipé du module de traitement des eaux).

Expérience 1

eau du bassin contaminée en phages MS2, depuis plus de 48 heures

Temps	T 0	T 1 h 00	T 2 h 00
Phages MS2 UFP/ml	5.10 10 ⁴	11	< 10

Expérience 2

eau du bassin contaminée en phages MS2, depuis 10 mn

Temps	T 0	T 1 h 30	T 2 h 30
Phages MS2 UFP/ml	4.00 10 ⁴	2.80 10 ⁴	< 10

Ces résultats montrent l'efficacité du système sur la purification virale des eaux du bassin : en 2 h 30, le module de traitement a conduit à un abattement en bactériophages de 4 log.

2.4. Matériel et méthodes utilisés pour les expérimentations

Différentes expérimentations ont été réalisées sur le pilote, les méthodes utilisées au cours de ces expérimentations sont décrites ci-dessous.

2.4.1. Les coquillages

Des huîtres creuses de l'espèce *Crassostrea gigas* ont été utilisées pour les essais. Les huîtres ont été stockées sur le site de Prat ar Coum, sur une concession située en zone découverte face à l'établissement (Classement sanitaire : zone n° 29.02.04, classement B). Elles ont été utilisées à la demande pour les expérimentations : l'homogénéité du lot a été vérifiée. Des mesures de taille, de poids et d'indice de remplissage ont été effectuées en septembre 2000 afin de s'assurer que la variation d'un individu à l'autre était très faible. En effet, l'homogénéité du lot est indispensable pour ne pas introduire de biais lors des expérimentations. Des variations entre individus peuvent être à l'origine de différences dans les taux de filtration/excrétion et donc introduire des erreurs dans l'interprétation des résultats.

Les lots d'huîtres utilisés (3 000 kg) ont été calibrés à partir d'un échantillon de 740 individus. Les tests biométriques étaient les suivants : poids, longueur, largeur, morphologie, calibre, indices de remplissage et de qualité. Ceci permet de définir le lot selon les normes inter-professionnelles 2000. Ces résultats ont été comparés à ceux du réseau Rémora.

2.4.2. Les bactériophages : modèle viral

Les virus qui sont à l'origine de gastro-entérites liées à la consommation des coquillages sont essentiellement des virus entériques comme les calicivirus, les entérovirus, les astrovirus ou les rotavirus. Leur mise en évidence est délicate et nécessite des outils de biologie moléculaire. Par ailleurs étant pathogènes pour l'homme, leur utilisation dans des expérimentations doit être conduite avec prudence et les rejets des expériences désinfectés. Ces essais ne peuvent pas être réalisés en vraie grandeur ni dans un site de production (risque de contamination des zones conchylicoles proches du site expérimental). Il était donc important de prendre un "modèle viral" plus souple, afin de réaliser les expériences de contamination/décontamination sans avoir les inconvénients majeurs des virus pathogènes.

Les bactériophages F+ARN spécifiques et plus particulièrement le phage MS2 ont été utilisés comme modèle dans cette étude. Ces phages ont des propriétés proches de celles des virus entériques : ils ont besoin d'une cellule hôte pour se multiplier, ils possèdent une structure voisine de celle des virus et résistent comme eux assez bien dans les environnements extérieurs. Par ailleurs, ils ne sont pas pathogènes pour l'homme et leur analyse sur culture bactérienne est peu coûteuse et facile à réaliser. Ces phages appartiennent à la famille des *Leviviridae* à ARN simple brin. Ils infectent des bactéries telles que *E. coli* ou *Salmonella spp.* par l'intermédiaire de pili sexuels de fertilité.

2.4.3. Les méthodes analytiques

Dès réception au laboratoire, les coquillages sont lavés, comptés et ouverts. La recherche des virus se fait sur l'estomac et le diverticulum digestif des mollusques, organes concentrateurs des virus (Schwab *et al.*, 1998). La chair totale est pesée, puis les tissus sont disséqués. Les tissus sont alors aliquotés dans des tubes d'1,5 g et congelés à - 20 °C.

La concentration des virus est obtenue selon la méthode décrite par Atmar *et al.* (1995) puis ceux-ci sont broyés à l'aide d'un potter avec 2 ml de PBS, rincés par 3 ml de PBS puis 3 ml de chloroforme-butanol, puis vortexés pendant 30 sec. Après addition de cat-floc, une centrifugation à 13 500 xg à 4 °C est réalisée. Le surnageant est ultracentrifugé pour concentrer les particules virales. Le culot est alors repris pour l'extraction des particules virales.

La détection des virus entériques s'est portée sur la recherche des norovirus : les acides nucléiques sont extraits et purifiés en utilisant le kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen). La

détection se fait par RT-PCR en utilisant différentes amorces (Le Guyader, 1996; Hafliger *et al.*, 1997).

La détection des bactériophages est basée sur la norme internationale ISO 10705-1 (1995) : après l'incubation de 18 h à 37 °C, les plages de lyse sont comptées et rapportées au poids d'échantillon analysé. Les résultats sont exprimés en Unités Formant Plage (UFP)/100 g de chair et de liquide intervalvaire ou en UFP/g de glande digestive suivant les tissus analysés. La limite de détection est de 300 UFP/100 g de chair et de 5 UFP/g de glande digestive.

3. Résultats des expérimentations sur le Pilote

3.1. Résultats obtenus sur le Pilote

3.1.1. Sensibilité des bactériophages à l'eau de mer

Dans le cadre de ce travail, différentes expérimentations ont été conduites. Le tableau 4 et la figure 18 ci-dessous résument les expériences réalisées et les résultats obtenus. On constate que la survie du bactériophage dans l'eau de mer est fonction de la température : le temps de survie, T90, temps nécessaire pour obtenir une diminution d'un facteur 10 des concentrations, varie d'une demi journée à 25 °C, à 5 jours à 13 °C.

Expérience	Contamination	Température de l'eau (°C)	Concentration ¹ en MS2 (UFP/ml)	T90 (r ²)
I	artificielle	25	9.0 10 ³	0.5 (0.97)
		20		1.5 (0.92)
		15		2.3 (0.95)
		13		5.5 (0.91)
II	artificielle	25	2.2 10 ⁴	0.5 (0.99)
		20		1.5 (0.95)
		15		2.3 (0.95)
		13		5.5 (0.84)

Tableau 4 : Résultats des expériences de survie du bactériophage F+ARN spécifique (MS2) dans les eaux du bassin de purification. 1. Concentration initiale ; T90, temps de survie dans l'eau de mer exprimé en jour (r² : coefficient de régression)

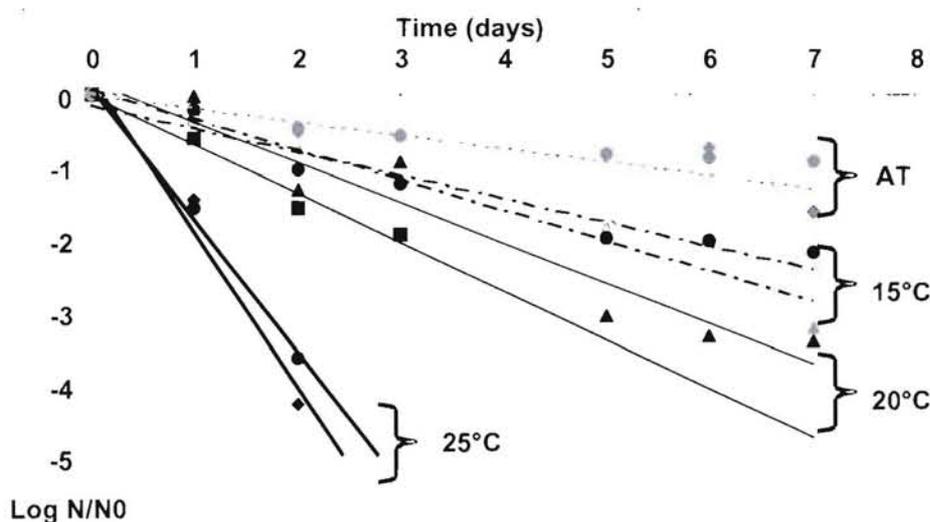


Figure 18 : Influence de la température sur la survie du phage MS2

3.1.2. Sensibilité des bactériophages et d'*E. coli* à la purification des coquillages

La survie des bactériophages a ensuite été testée dans des coquillages artificiellement ou naturellement contaminés. Les cinétiques de décontamination ont ensuite été comparées entre elles. Le tableau 5 indique les conditions expérimentales testées ainsi que les résultats obtenus.

Expérience	Contamination	Température de l'eau (°C)	Concentration MS2 ¹ (UFP/g.gd)	<i>E. coli</i> UFC/100 g	DT90 (r ²) de MS2
A	artificielle	19	3.7 10 ⁴		6.6 (0.96)
		18.2			7.2 (0.85)
B	artificielle	18.2	5.5 10 ⁴		5.6 (0.97)
C	artificielle	22	2.0 10 ⁴	5.0 10 ⁴	3.8 (0.99)
		8		4.5 10 ³	8.6 (0.89)
D	artificielle	22	4.4 10 ⁴		2.0 (0.99)
		22 + UV			2.6 (0.96)
E	artificielle	25*	2.0 10 ³		3.7 (0.98)
		25			4.2 (0.99)
		16			6.7 (0.97)
		AT ou 12			6.7 (0.83)
F	artificielle	25*	3.0 10 ³		2.8 (0.99)
		25			3.3 (0.98)
		16			10 (0.85)
		AT ou 12			10 (0.97)
G	artificielle	25	3.0 10 ³		3.1 (0.96)
		12			5.5 (0.91)
H	naturelle	20	4.1 10 ¹	< ld	6.2 (0.72)
I	naturelle	20	<ld	nd	
J	naturelle	25	4.1 10 ¹	1.8 10 ²	5.5 (0.79)
		12			20 (0.98)
K	naturelle	25	5.5 10 ¹	5.5 10 ¹	4.7 (0.85)
		12			20 (0.65)

Tableau 5 : Caractérisation et résultats des expériences de purification des coquillages sur la contamination en bactériophages F+ARN spécifique (MS2) dans le pilote.

l : concentration initiale des huîtres exprimée unité formant plaque (UFP) par gramme de glande digestive (g.gd) ; DT90: temps de purification nécessaire pour que la concentration dans l'huître diminue d'un facteur 10 ; (r² : coefficient de corrélation) ; ld : limite de détection ; nd : analyse non réalisée ; * la température a été progressivement augmentée de 12 °C à 25 °C.

Sur la figure 19 sont reportées les droites de régressions obtenues aux différentes températures : on constate très clairement que comme dans l'eau, l'effet de la purification du phage dans le coquillage est plus important à température élevée (> 20 °C) qu'à basse température. Pour des valeurs de températures 8-16 °C, le temps de purification (TD90 :

temps nécessaire pour que la concentration diminue d'un facteur 10) est d'environ 6 à 10 jours pour des huîtres artificiellement contaminées (20 jours à 12 °C pour des huîtres naturellement contaminées). Au dessus de 20 °C, il est pour des huîtres artificiellement contaminées de 3-4 jours. Pour les huîtres naturellement contaminées, il semble plus long et a été évalué à 5-6 jours.

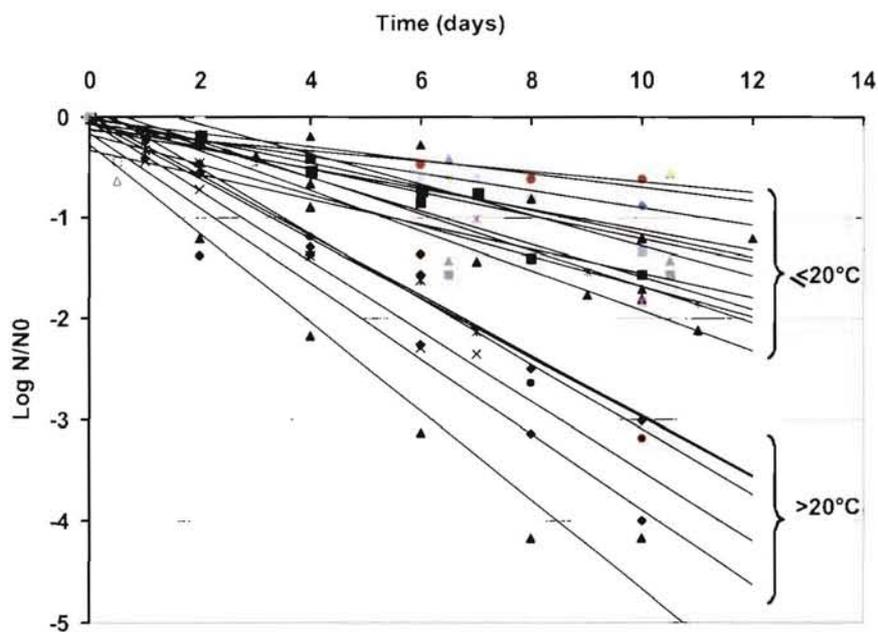


Figure 19 : Effet de la température sur les vitesses de purification du coquillage en F+ARN spécifique

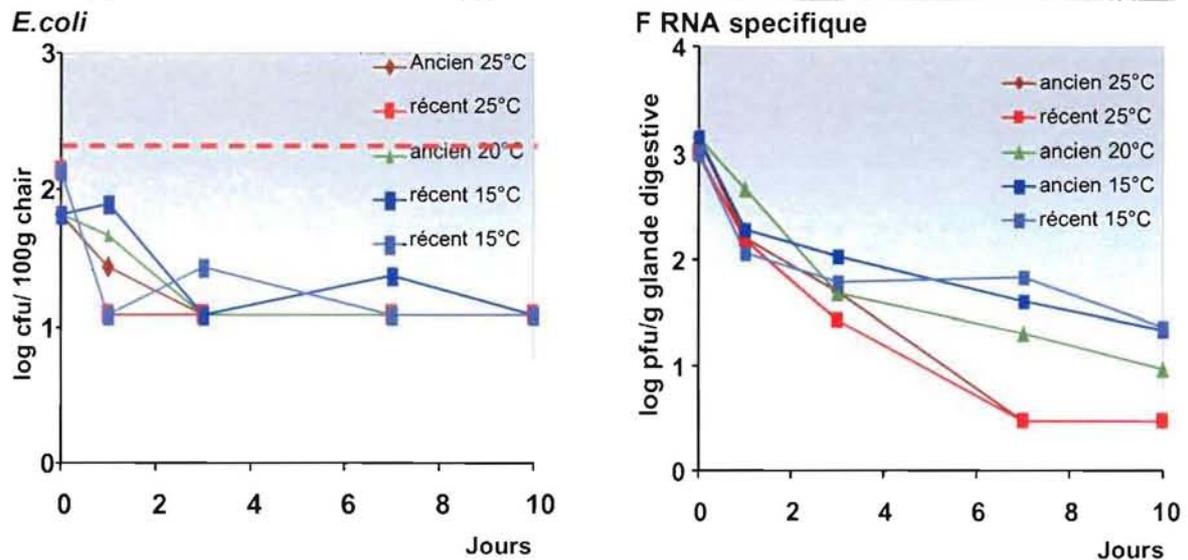


Figure 20 : Cinétique de purification des huîtres naturellement contaminées pour *E. coli* et le bactériophage F+ ARN spécifique.

La figure 20 montre la cinétique de décontamination d'huîtres naturellement contaminées : on constate qu'*E. coli* est éliminé en quelques heures, alors que le phage persiste plus longtemps surtout à basse température (ici 15 °C). Sur cette figure sont reportées des expériences réalisées avec des huîtres qui étaient restées une semaine (contamination récente) et un mois (contamination ancienne) dans un site sous influence d'un rejet urbain. On ne constate pas de différence notable entre ces deux périodes de contamination (sans doute trop peu différentes pour que la notion de contamination ancienne ou récente puisse réellement être appréhendée)..

3.2. Comparaison avec les résultats trouvés dans la littérature

Il était intéressant de comparer nos résultats avec ceux trouvés dans la littérature et en particulier avec des données sur les virus et *E. coli*. Les microorganismes n'ont pas tous la même résistance à la purification. Ceci est dû, soit à des raisons mécaniques (taille, adhésion aux parois intestinales du coquillage), soit à des raisons biologiques, certains microorganismes ayant une plus ou moins forte *sensibilité à l'eau de mer* et aux conditions hostiles du milieu. On peut les classer ainsi :

1. Sensibles : *E. coli*, (coliformes fécaux, thermotolérants), *Listeria*.
2. Assez sensibles : Salmonelle, les bactériophages.
3. Peu sensibles: les virus entériques.
4. Résistants : *Vibrio*.

3.2.1. Sensibilité des microorganismes à l'eau de mer

Le tableau ci-dessous rapporte la sensibilité des microorganismes à l'eau de mer. Elle est exprimée en T90, temps calculé en heure, nécessaire pour diminuer d'un facteur dix la concentration de la bactérie ou du virus dans l'eau. On peut constater que par rapport à d'autres pathogènes, *E. coli* est moins résistant qu'une Salmonelle, un bactériophage ou un virus. Les résultats trouvés dans notre étude se placent dans les ordres de grandeur de ceux déjà publiés (pour des conditions expérimentales identiques).

Microorganisme	Eau de mer 18 - 22 °C
<i>Listeria monocytogenes</i> ¹	22 - 39
<i>Escherichia coli</i> ^{2,3}	5 - 35
<i>Salmonella panama</i> ¹	13 - 72
Poliovirus-1 ^{4,6}	10 - 72
Phage (F+ARN) ⁴	60 - 76
Hépatite A virus ^{4,5}	72 - 300
Astrovirus ⁵	384 - 432

Montfort *et al.*, 2000 ; 2. Salomon and Pommepey, 1991 ; 3. Trousselier *et al.*, 1998 ;
4. Callahan *et al.*, 1995 ; 5. Bosch *et al.*, 1996 ; 6. Johnson *et al.*, 1996

Tableau 6 : Survie des microorganismes en mer exprimé en T90, temps - exprimé en heure - nécessaire pour que leur concentration du microorganisme diminue dans l'eau de mer d'un facteur dix (minimum - maximum).

3.2.2. Sensibilité des microorganismes à la purification

De nombreuses études ont été réalisées sur la purification des coquillages vis-à-vis de l'indicateur de contamination fécale *Escherichia coli*, ou sur l'ensemble de la famille représentative d'une contamination fécale (coliformes fécaux, coliformes thermotolérants). Moins nombreux sont les travaux concernant les autres microorganismes (Salmonelles, bactériophages et virus).

Escherichia coli

La majorité des Etats Européens considèrent 48 heures, le temps suffisant pour limiter le nombre de bactéries, le but de la purification étant d'obtenir des produits conformes à la norme (< 230 *E. coli* /100 g). La plupart des travaux réalisés sur le sujet montrent qu'en effet, si les règles HACCP sont respectées, les produits issus de ces temps passés en bassins respectent les normes de mise sur le marché.

Salmonelles

La purification, lorsqu'elle est réalisée correctement, semble s'avérer efficace vis-à-vis du risque bactérien, preuve en est la baisse de salmonelloses ou typhoïdes ces quinze dernières années en Europe. On considère d'une manière générale que 48 heures sont suffisantes pour

éliminer cette bactérie. Le risque est estival et en grande partie lié à la consommation de moules. Les conditions de stockage et de conservation avant la vente et la consommation sont importantes vis-à-vis du maintien de la qualité du produit.

Bactériophages

Utilisé comme modèle de virus, le bactériophage F+ARN spécifique a donné lieu à de récentes études tendant à valider des conditions favorables à la décontamination virale : les travaux ont été essentiellement réalisés par des équipes anglaises (Cefas) et françaises (Ifremer). Le tableau 7 montre la sensibilité d'*E. coli* et du bactériophage à la désinfection.

Température	<i>E. coli</i>	F+ARN spécifique
8-10 °C	48 heures	> 10 jours
15 °C	< 48 heures	~ 8 jours
20 °C	< 48 heures	~ 6 jours
25 °C	< 48 heures	2 - 5 jours

Tableau 7 : Effet de la température sur la persistance dans des huîtres d'*E. coli* et du bactériophage F+ARN spécifique (indicateur viral).

Virus des gastro-entérites et de l'hépatite A

Les études concernant l'efficacité de la purification sur les virus sont récentes et en nombre limité. La majorité des résultats concerne des expériences faites en laboratoire sur des coquillages artificiellement contaminés. D'une manière générale les résultats montrent que les virus sont éliminés plus lentement que les bactéries. L'élévation de la température de l'eau du bassin (20 °C) est favorable à la décontamination virale des huîtres. Cependant, même dans ces conditions, il faudrait plusieurs jours pour s'assurer de la qualité sanitaire du coquillage. Lorsque la température de l'eau de mer est très basse (< 14 °C), les virus entériques peuvent persister dans le coquillage plusieurs semaines et pour le VHA, plusieurs mois (détection par RT-PCR)⁶

3.3. Conclusion : notion de purification "renforcée"

De nombreuses expérimentations ont été effectuées pendant cette étude sur le pilote de Prat ar Coum. L'équipement mis en place nous a permis de les réaliser, dans des conditions optimales de reproductibilité : en effet les paramètres (circulation, aération, température) sont bien maîtrisés et stables. De ce fait, il a été possible de conduire simultanément, sur le même lot, des essais faisant jouer différents facteurs. Une bonne répétabilité des conditions expérimentales et des résultats a pu être ainsi obtenue. Une douzaine d'essais représentant plus d'une trentaine d'expériences a été conduite pendant cette période. Les coquillages testés étaient des huîtres plates (*Ostrea edulis*) et des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). Deux lots

⁶ RT-PCR : détection du génome du virus, ne présupant pas de son infectiosité, mais de sa présence.

de 3 tonnes d'huîtres ont été utilisés pendant ces expériences. Elles étaient stockées sur l'estran en face de l'Etablissement et cela nous a ainsi permis de suivre le même lot et de limiter ainsi - sauf variation incontournable de l'évolution physiologique des coquillages aux cours des saisons - les aléas liés à l'origine des coquillages pour les expériences de contamination artificielle. Par ailleurs, différents lots d'huîtres de différents secteurs du littoral ont été testés pour évaluer la purification de coquillages naturellement contaminés.

Le bactériophage F+ARN spécifique a été utilisé comme modèle de virus pour les expériences de contamination artificielle. Ce modèle s'est avéré facile à utiliser et fiable. De plus, il ne présente aucun danger pour l'environnement et pour l'homme.

Dans cette étude, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'effet des températures puisqu'il s'est avéré que c'était le facteur le plus significativement efficace pour accélérer la purification virale.

Des essais à 22 °C en alimentant les huîtres avec du plancton ont cependant été réalisés pour explorer le rôle du transit intestinal sur la purification. Les résultats ne montrent pas d'amélioration considérable de la performance. De plus la mise en œuvre est difficile, car il n'existe pas à l'heure actuelle de possibilité de nourrir les coquillages hors culture fraîche d'algues. Le transfert de dizaines de litres d'eaux concentrées en algues a été fait d'Argenton (Centre d'Ifremer) à Prat ar Coum. L'alimentation par goutte à goutte s'est avérée difficile à optimiser. Le coût et la faisabilité de l'alimentation en algues, par rapport à l'efficacité obtenue en purification, nous fait éliminer cette solution.

Concernant les températures, la gamme testée a varié de 8°-12 °C (température locale de l'eau de mer en hiver) à 25 °C. Des températures très élevées (25 °C), ont été testées pour accélérer le décrochage des virus. Au dessus de 22 °C, le coquillage utilise ses ressources propres – en particulier les lipides situés dans l'intestin – pour faire face aux conditions stressantes (M. Héral, communication et suggestion). En effet, les résultats à ces températures se sont avérés intéressants. Cependant, si on devait les appliquer à des fins professionnelles, des précautions devront être prises pour éviter des effets indésirables tels que l'émission de laitance. Dans les expériences sur le pilote la vitesse de circulation de l'eau et l'oxygénation très élevées ont évité cet inconvénient. Il faut cependant rappeler qu'en écloserie, le choc thermique à ces températures, est utilisé pour l'émission de gamètes et obtention de naissain.

Les résultats sur l'efficacité de la purification virale des coquillages montrent qu'une purification ainsi « renforcée », utilisant des températures de 20-22 °C, une forte oxygénation et circulation d'eau, devrait permettre en 4 ou 5 jours l'élimination de virus entériques. Encore faut-il que cette contamination ne soit pas trop élevée et qu'elle soit récente. En effet, les temps de purification de 4-5 jours permettent un abattement d'un facteur 10 à 50 au maximum. Par ailleurs la persistance de virus dans des huîtres élevées dans des eaux où la pollution est récurrente a été observée : les virus ont été retrouvés dans les coquillages après huit jours de purification renforcée.

4. Définition des critères de gestion de la contamination et des règles de bonne pratique de la purification virale des coquillages

4.1. Intérêts et limites de la purification renforcée

La mise en œuvre de mesures de « purification renforcée » telles que décrites ci-dessus, doit rester exceptionnelle. En effet si sur le plan théorique, l'augmentation de la température permet de diminuer le risque viral, il existe cependant plusieurs limites à ce type de traitement. Les données dont nous disposons concernent essentiellement les huîtres. La faisabilité a été testée sur ces coquillages uniquement, car ce sont eux qui ont été impliqués le plus souvent dans les gastro-entérites. Le risque viral lié à la consommation des huîtres est en effet important du fait que ces coquillages sont consommés crus.

L'application de ce type de purification a des limites, en particulier :

- Si la contamination virale est ancienne (> 1 mois), le système ne peut garantir l'élimination totale des virus.
- Les conditions de purification devront garantir une circulation rapide de l'eau dans le bassin et une oxygénation importante, pour éviter des phénomènes de laitance.
- Dans ces conditions d'aération et de circulation d'eau, la mortalité des huîtres reste faible (< 10 %) et identique à celle qui peut être observée dans un BIA. Cependant lors d'expériences à températures plus élevées (5 jours à 25 °C), nous avons pu observer jusqu'à 27 % de mortalité. Pendant les périodes de reproduction, ce type de résultats risque d'être observé.
- Après une purification renforcée, la tenue en bourriche pendant une semaine, ne semble pas poser de problème, néanmoins, ces résultats mériteraient d'être confirmés.

Si ce type de purification devait s'appliquer à d'autres coquillages, le résultat semble beaucoup plus aléatoire : les premiers essais sur des moules (*Mytilus edulis*) montrent que même en utilisant de fortes aération et circulation des eaux dans le bassin, une mortalité importante est observée (> 50 %).

La mise en œuvre de mesures de « purification renforcée », doit donc rester exceptionnelle et liée à la présence de virus entériques. Tout doit être mis en œuvre dans les zones côtières pour que cette situation soit limitée à des événements imprévisibles et ponctuels, tels que la rupture d'un réseau d'assainissement, des pluies diluviennes faisant déborder des structures d'assainissement pendant les périodes où les virus circulent dans la population.

L'obtention d'une bonne qualité des coquillages passe par la prise en compte de toutes les étapes de production, de l'élevage à l'expédition. Les mesures doivent tout d'abord concerner la reconquête de la qualité du milieu **en identifiant les points critiques** et en prenant les décisions nécessaires pour éviter la contamination des zones conchylicoles. Car il est illusoire de vouloir épurer des coquillages qui ont été élevés dans des zones très contaminées. Les

travaux publiés montrent que les virus sont alors plus difficilement éliminés (vraisemblablement parce qu'enfouis profondément dans les tissus intestinaux) et que d'autres types de pollution chimiques ou microbiologiques sont associés.

4.2. Points critiques de la zone d'élevage influençant la qualité du produit

La purification renforcée devra être mise en œuvre pendant **les périodes à risque de contamination virale** – épidémies dans la population – et **la mise en place de systèmes d'alerte** devra permettre, de prévenir lorsque les structures de collecte et de traitement des eaux seront déficientes. La vigilance doit alors s'accroître et des systèmes de purification renforcée mis en place pour limiter le risque sanitaire des coquillages mis en vente.

La définition des points critiques dans la zone de production doit prendre en compte d'une part les apports, d'autre part le milieu marin lui-même et les pratiques conchylicoles du secteur intéressé.

Exemple d'approche « point critique »

Paramètre	Risque potentiel	Point critique	Contrôle/Action préventive
Station d'épuration	Rejet de virus	Qualité du rejet	Surveillance/ Système d'alerte en cas de problème

Dans les tableaux suivants, sont décrits les points sur le bassin versant et la zone conchylicole pouvant être considérés comme critiques et devant faire l'objet de mise aux normes et de surveillance active. Il s'agit de listes théoriques qui devraient être complétées et validées par secteur conchylicole et permettre ainsi d'aider à la prise de décision de mesures réparatrices.

	Risque potentiel	Points critiques (potentiels)	Surveillance/ action
Etat des lieux	Population humaine (potentiel vrai)	<ul style="list-style-type: none"> • Densité • Pression de l'habitat côtier • Assainissement conforme • Evolution de la population 	Contrôle des plans d'urbanisme, raccordements, réseaux
	Population animale (suspectée)	<ul style="list-style-type: none"> • Densité • Pression zone des 500 m • Assainissement conforme • Evolution de la population • Activité d'épandage 	Contrôle des plans locaux d'urbanismes, des plans d'épandage, conformité des Etablissements classés soumis à déclaration ou autorisation
	Systèmes de surveillance existants	<ul style="list-style-type: none"> • Accès aux données 	Surveillance des tendances
Facteurs influençant la qualité du milieu	Flux rivière	<ul style="list-style-type: none"> • Bassin versant urbain/agricole 	Contrôle des plans d'urbanismes
	Station d'épuration (capacité, type de traitement)	<ul style="list-style-type: none"> • Conformité • Performance • By-pass 	Mise aux normes si nécessaire Accès aux données auto-contrôle si nécessaire
	Réseau (unitaire, séparatif)	<ul style="list-style-type: none"> • Postes de relèvements • Déversoir d'orage • Eaux parasites 	Mise aux normes
	Zones marécageuses	<ul style="list-style-type: none"> • Fossés 	Maîtrise des eaux d'écoulement des fossés
Facteurs pénalisants	Marée	<ul style="list-style-type: none"> • Amplitude 	Observation des moments critiques
	Epidémies dans la population	<ul style="list-style-type: none"> • Gastro-entérites 	Surveillance
	Météorologie (effet sur sols saturés)	<ul style="list-style-type: none"> • Durée • Amplitude 	Surveillance

Tableau 8 : Apports : Description de la zone, facteurs influençant la qualité du milieu, facteurs pénalisants

	Risque potentiel	Points critiques	Surveillance/actions
Etat des lieux	Activité	<ul style="list-style-type: none"> Type de coquillages 	Surveillance des maladies
	Mode d'élevage	<ul style="list-style-type: none"> Table Sol Filière 	Désenvasement
	Type d'élevage	<ul style="list-style-type: none"> Grossissement Stockage Dépôt Affinage 	Traçabilité
	Description du site	<ul style="list-style-type: none"> Estuaire Temps de renouvellement Amplitude marée Surfaces découvrantes Sol vaseux, sable... 	Description Observations
Facteurs influençant la qualité du milieu	Apports station d'épuration et rivière	<ul style="list-style-type: none"> Variation salinité, MES Stratification des eaux Contaminants Qualité microbiologique 	Surveillance
	Marée	<ul style="list-style-type: none"> Amplitude % temps découvrant 	Enregistrement Observation
	Pluie	<ul style="list-style-type: none"> Dessalure surface 	
Facteurs pénalisants	Apports Saison	<ul style="list-style-type: none"> Dessalure Températures basses 	Enregistrement de la salinité, température
	Apports urbains	<ul style="list-style-type: none"> Apport de virus 	Observation population

Tableau 9 : Zone d'élevage : Description de la zone, facteurs influençant la qualité du milieu, facteurs pénalisants

Cette approche doit permettre de définir les points critiques sur les secteurs conchylicoles et de guider les actions à entreprendre pour reconquérir la qualité des eaux du secteur lorsque cela est nécessaire (zone B).

Un exemple est reporté sur la figure ci-dessous :



Figure 21 : Exemple de définition de points critiques sur un secteur conchylicole

Définition des Points critiques

4.3. Quand et comment appliquer une purification renforcée ?

Le problème de la détérioration des eaux conchylicoles lorsqu'il n'est pas récurrent, est lié à des événements exceptionnels qu'il convient de prévenir. Les schémas ci-dessous présentent quelques alternatives existant sur un secteur et la réactivité que l'on peut attendre d'un système d'alerte sur une station d'épuration (STP 2).

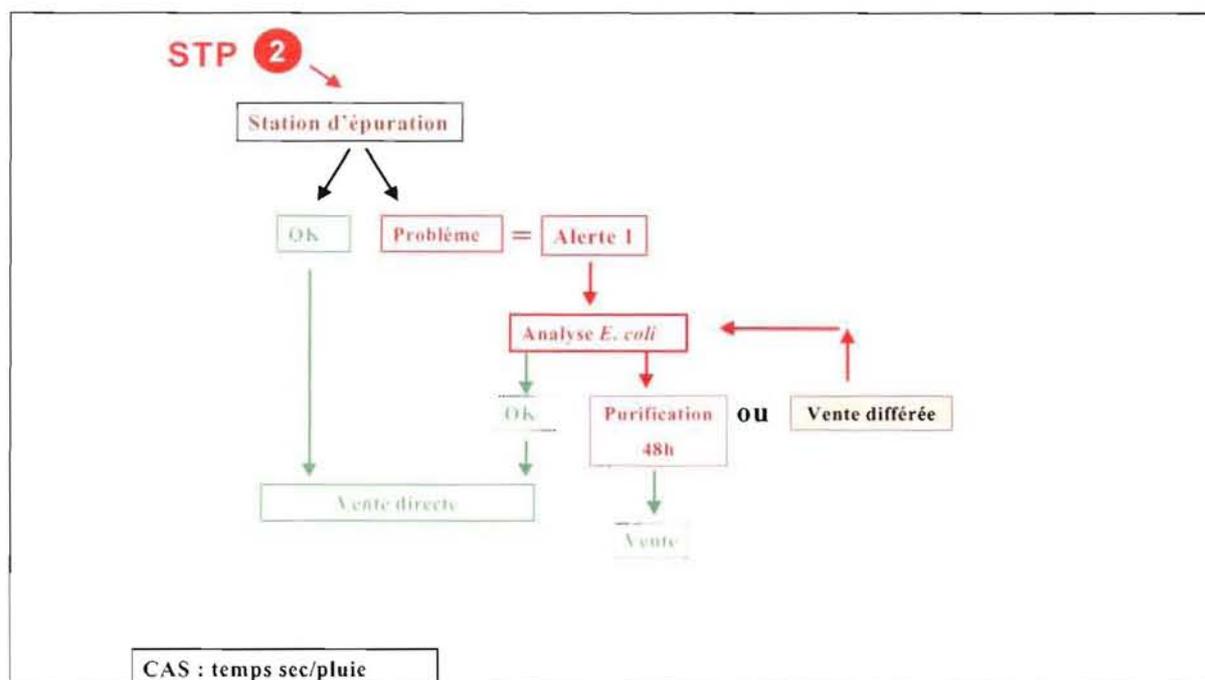


Figure 22 : Surveillance du fonctionnement de la station d'épuration (STP)

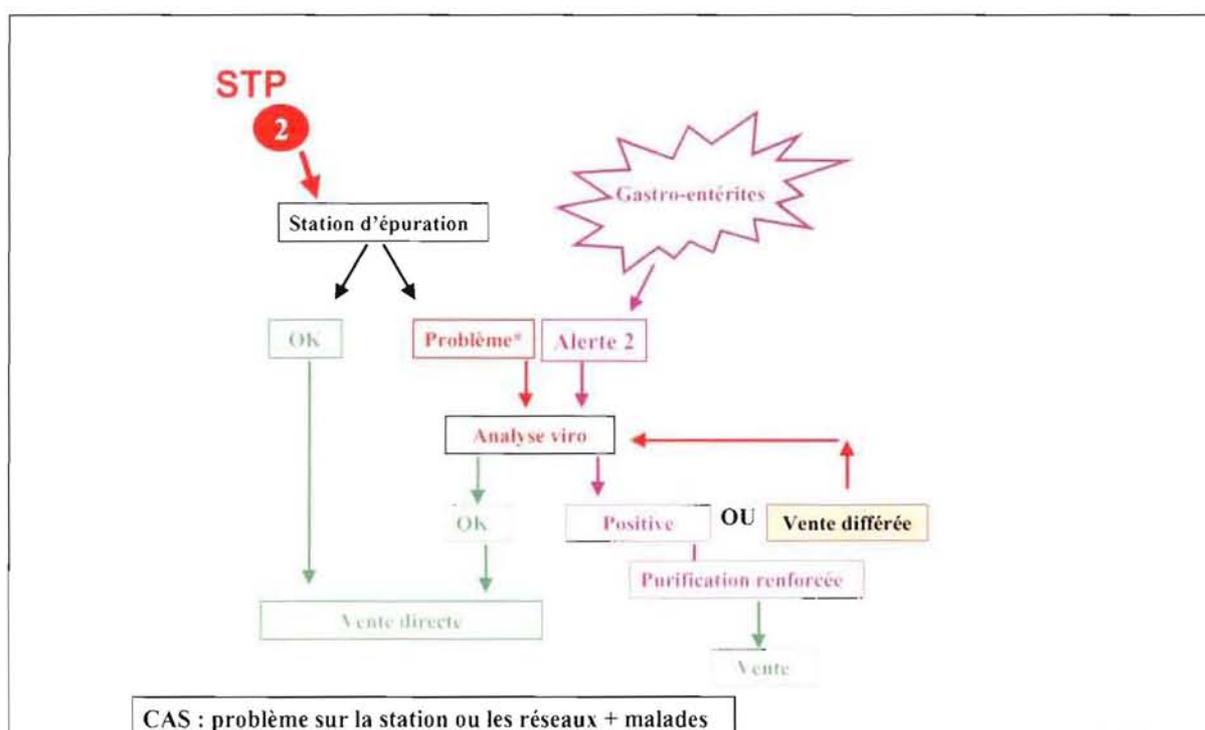


Figure 23 : Mise en place d'une alerte à la pollution virale.

L'alerte 1 consiste, lorsque la station d'épuration (STP) a un problème technique – en dehors de période de maladies dans la population- à mettre en place un système de précaution basé sur l'analyse d'*E. coli* dans les coquillages susceptibles d'avoir été touchés par cette contamination fécale et de mettre en place les mesures nécessaires (purification, repaquage ...).

L'alerte 2 intervient en période épidémique et nécessite soit de différer les ventes (repaquage longue durée), soit de passer les coquillages en « purification renforcée » pour éliminer les virus.

4.4. Quand et comment appliquer une purification « renforcée » pour éliminer les virus ?

L'advenue simultanée dans la zone côtière, d'apports de virus (périodes épidémiques) et de facteurs aggravants (pluie, rupture de structures d'épuration, débordement des rivières, apport renforcé du bassin versant...) peut entraîner des contaminations virales. Dans ce cas, **des mesures de purification renforcée** doivent être mises en place sur les coquillages issus du secteur critique de la zone de production avant commercialisation des coquillages pour protéger le consommateur et prémunir l'établissement expéditeur de désagréments tels que des alertes communautaires le désignant comme responsable de gastro-entérites chez des consommateurs.

La démarche particulière de ces mesures consistera à :

- 1. Identifier les lots qui ont été touchés par cette contamination virale**
- 2. Renforcer leur traçabilité**
- 3. Mettre en place des mesures de prévention selon la destination des lots**

Le tableau 10 propose un schéma d'actions correctives dans le cas d'une alerte virale. En fait on peut considérer que les coquillages au dessus de 18 mois devraient, dans le cas d'une alerte 2, voir leur traçabilité renforcée. Par ailleurs, la recherche de présence de virus entériques devrait être faite pour se prémunir d'éventuels problèmes sanitaires.

	Type d'élevage	Destination des lots	Actions préventives	Mesures correctives
	Naissain	Transfert	/	/
	Semi-élevage	Transfert	/	/
	18 mois	Transfert	Traçabilité	Renforcer la traçabilité
	2ans	Vente à la consommation	Analyse virologique	Purification renforcée
		Transfert	Traçabilité analyse virologique	Purification avant la vente
	> 2 ans	Vente directe à la consommation	Analyse virologique	Purification renforcée
		Transfert	Traçabilité analyse virologique	Purification renforcée avant la vente

Tableau 10 : Mesures correctives nécessaires dans le cas d'une contamination virale des coquillages.

Les mesures correctives consisteront, si le coquillage doit être soumis à la vente, à le passer en purification renforcée et à en contrôler l'absence de virus. Cette démarche HACCP comprendra différentes étapes qui donnent lieu à quelques recommandations présentées ci-dessous.

Principales recommandations pour une démarche HACCP de « purification renforcée » dans le cas de la présence de virus dans les huîtres :

1	Lavage des lots*
2	Isolement des lots par bassins
3	Purification 5 jours, température 20-22 °C dans des petits bassins aérés avec circulation accentuée ** Analyse virologique à T4, pour évaluer si possible l'efficacité du traitement
4	Lavage des lots*
5	Lavage des bassins et des paniers

* Chaque opération de lavage devra s'accompagner de traitement de désinfection des eaux de rejet (filtre à sable et UV) ; ** ratio débit /volume du bassin > 1

5. Conclusions

Le but de cette étude était de développer une technologie propre à assurer, lorsqu'une contamination virale intervient, les moyens de purifier un coquillage et d'obtenir ainsi un produit de qualité sanitaire acceptable.

Pour cela nous avons fait en premier lieu un bilan des équipements existants en France : il s'agit essentiellement de bassins insubmersibles aérés (BIA). Ces bassins sont équipés de divers systèmes d'aération et de circulation de l'eau. Ils peuvent être également équipés d'appareils divers (écumeurs, par exemple) ou de structure de désinfection des eaux (filtre à sable et U.V.).

Dans un second temps nous nous sommes attachés à évaluer l'efficacité de la purification virale dans un Etablissement agréé pour la purification : la S.A. Prat ar Coum située à Lannilis. Les performances hydrauliques ont été évaluées. L'effet de la désinfection (rôle du filtre à sable et des U.V.) sur *E. coli* et les virus a été également testé. Les résultats obtenus montrent les excellentes performances du système en place pour répondre aux critères de mise en marché des coquillages basés actuellement sur la présence d'*E. coli*. En ce qui concerne les virus, les résultats sont nettement moins performants et sont dus à la spécificité des virus entériques qui sont très résistants au milieu extérieur.

Une revue bibliographique et des premières expériences en laboratoire ont permis de définir les facteurs qui peuvent accélérer la purification de coquillages contaminés par les virus (rapport Ofimer intermédiaire). Sur ces bases, un pilote expérimental a été conçu et construit sur le site de Prat ar Coum.

Ce pilote est constitué de quatre bassins de 6 m³ indépendants et autonomes équipés pour l'un d'un système complet (réchauffeur), refroidisseur, pompe de recyclage, filtre à sable et U.V.), de deux bassins avec un équipement ne comprenant pas de filtre, ni d'U.V. et d'un dernier bassin qui fonctionne en BIA, sans système de modulation de température.

Ce pilote avait pour but de tester, dans des conditions proches de celles utilisées par les professionnels différents facteurs impliqués dans la purification virale afin d'optimiser le procédé à ce type de contamination. Le système obtenu a été validé tant sur le plan hydraulique que de paramètres physico-chimiques (stabilité des températures, aération...). Il présente actuellement toutes les conditions requises pour un fonctionnement dans des conditions stables de circulation d'eau, d'aération et de température. Son fonctionnement, moyennant un minimum de précautions est aisé. Il permet par exemple de tester, sur un même lot quatre conditions de purifications : aération, température, alimentation en algues....ou quatre lots différents dans des conditions identiques.

Le travail a ensuite consisté à étudier les différents facteurs impliqués dans la purification à partir d'huîtres artificiellement contaminées. Le modèle viral choisi a été le bactériophage MS2 appartenant à la famille des bactériophages F+ARN spécifiques, qui ont été proposés

comme indicateur viral. Ce modèle est facile à utiliser et sans danger pour l'homme ou l'environnement.

De nombreuses expérimentations ont été ensuite effectuées sur le pilote de Prat ar Coum. L'équipement mis en place nous a permis de les réaliser, dans des conditions optimales de reproductibilité des conditions expérimentales. Une douzaine d'essais représentant plus d'une trentaine d'expériences ont été conduits pendant cette période. Les coquillages testés étaient des huîtres plates (*Ostrea edulis*) et des huîtres creuses (*Crassostrea gigas*). Par ailleurs différents lots d'huîtres de différents secteurs du littoral ont été testés pour évaluer la purification de coquillages naturellement contaminés.

Dans cette étude, nous nous sommes essentiellement intéressés à l'effet des températures puisqu'il s'est avéré que c'était le facteur le plus significativement efficace pour accélérer la purification virale.

Des essais à 22 °C en alimentant les huîtres avec du plancton ont cependant été réalisés pour explorer le rôle du transit intestinal sur la purification. Les résultats ne montrent pas d'amélioration considérable de la performance. De plus la mise en œuvre s'est avérée difficile. Le coût et la faisabilité de l'alimentation en algues, par rapport à l'efficacité obtenue en purification, nous fait éliminer cette solution.

Concernant les températures, la gamme testée a varié de 8°-12 °C (température locale de l'eau de mer en hiver) à 25 °C. Des températures très élevées (25 °C), ont été testées pour accélérer le décrochage des virus. Les résultats à ces températures se sont avérés intéressants. Cependant, si on devait les appliquer à des fins professionnelles, des précautions devront être prises pour éviter des effets indésirables tels que l'émission de laitance. Dans les expériences sur le pilote, la vitesse de circulation de l'eau et l'oxygénation très élevées ont évité cet inconvénient. Il faut cependant rappeler qu'en écloserie, le choc thermique à ces températures, est utilisé pour l'émission de gamètes et obtention de naissain.

Les résultats sur l'efficacité de la purification virale des coquillages montrent qu'une **purification ainsi « renforcée »**, utilisant des températures de 20-22 °C, une forte oxygénation et circulation d'eau, devrait permettre en 4 ou 5 jours l'élimination de virus entériques. Encore faut-il que cette contamination ne soit pas trop élevée et qu'elle soit récente. En effet, les temps de purification de 4-5 jours permettent un abattement d'un facteur 10, 50 au maximum. Par ailleurs la persistance de virus dans des huîtres élevées dans des eaux où la pollution est récurrente a été observée : les virus ont été retrouvés dans les coquillages après huit jours de purification renforcée.

Cependant, la mise en œuvre de mesures de « purification renforcée » telles que décrites ci-dessus, doit rester exceptionnelle. En effet si sur le plan théorique, l'augmentation de la température permet de limiter le risque viral, il existe néanmoins plusieurs limites à ce type de traitement. Les données dont nous disposons concernent essentiellement les huîtres. La faisabilité a été testée sur ces coquillages uniquement, car ce sont eux qui ont été impliqués

dans les gastro-entérites. Le risque viral lié à la consommation des huîtres est en effet important du fait que ces coquillages sont consommés crus.

Par ailleurs, si ce type de purification devait s'appliquer à d'autres coquillages, le résultat semble beaucoup plus aléatoire : les premiers essais sur des moules (*Mytilus edulis*) montrent que même en utilisant de fortes aération et circulation des eaux dans le bassin, la mortalité est importante (> 50 %).

La mise en œuvre de mesures de « purification renforcée », doit donc rester exceptionnelle et liée à la présence de virus entériques. **Tout doit être mis en œuvre dans les zones côtières** pour que cette situation soit limitée à des événements imprévisibles et ponctuels, tels que la rupture d'un réseau d'assainissement, des pluies diluviennes faisant déborder des structures d'assainissement pendant les périodes où les virus circulent dans la population.

L'obtention d'une bonne qualité des coquillages passe par la prise en compte de toutes les étapes de production, de l'élevage à l'expédition. Les mesures doivent tout d'abord concerner la reconquête de la qualité du milieu **en identifiant les points critiques** et en prenant les décisions nécessaires pour éviter la contamination des zones conchylicoles. Car il est illusoire de vouloir épurer des coquillages qui ont été élevés dans des zones très contaminées. Les travaux publiés montrent que les virus sont alors plus difficilement éliminés (vraisemblablement parce qu'enfouis profondément dans les tissus intestinaux) et que d'autres types de pollutions chimiques ou microbiologique sont associés.

L'advenue simultanée dans la zone côtière, d'apports de virus (période épidémique) et de facteurs aggravants (pluie, rupture de structures d'épuration, débordement des rivières, apport renforcé du bassin versant...) peut entraîner des contaminations virales. Dans ce cas, **des mesures de purification renforcée** pourraient être mises en place avant commercialisation des coquillages pour protéger le consommateur et prémunir l'établissement expéditeur de désagréments tels que des alertes communautaires le désignant comme responsable de gastro-entérites chez des consommateurs.

La démarche particulière à ces mesures consistera à :

1. Identifier les lots qui ont été touchés par cette contamination virale
2. Renforcer leur traçabilité
3. Mettre en place des mesures de prévention selon la destination des lots

Les mesures correctives consisteront, si le coquillage doit être soumis à la vente, à le passer en purification renforcée et à en contrôler l'absence de ces virus. Cette démarche HACCP comprendra différentes étapes qui donnent lieu aux recommandations présentées dans ce rapport.

Annexe 1

Références bibliographiques

- Armon R. and Kott Y., 1996. Bacteriophages as indicators of pollution, *Crit. Reviews in Env. Sc. Tech.*, 26, 299-335
- Atmar, R.L. *et al.*, 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 61(8): 3014-3018.
- Bosch, A., Pinto, R.M. and Abad, F.X., 1995. Differential accumulation and depuration of human enteric viruses by mussels. *Water Science and Technology*, 31(5-6): 447-451.
- Burkhardt W., Watkins W.D., Rippey S.R., 1992. Inadequacy of bacterial indicators for assessing elimination rates of viruses from molluscan shellfish. in: "Shellfish depuration, 2d International Conference" edited by R. Poggi & J.Y. Le Gall, Ifremer, Plouzané, pp 217-226.
- Cailleres, J.P., 1992. Water treatment by ultraviolet radiation application to shellfish depuration Conf. Internationale sur la Purification des Coquillages, Rennes (France), 6-8 Apr 1992. 373-386
- Callahan, K.M., Taylor, D.J. and Sobsey, M.D., 1995. Comparative survival of hepatitis A virus, poliovirus and indicator viruses in geographically diverse seawaters. *Water Science and Technology*, 31(5-6): 189-193.
- Cook D.W., Ellender R.D., 1986. Relaying to decrease the concentration of oysters associated pathogens. *Food Protect.* 49: 196-202
- De Mesquita M.M.F., Evison L.M., West P.A., 1991. Removal of faecal indicator bacteria and bacteriophages from the common mussel (*Mytilus edulis*) under artificial depurations conditions, *J. Appl. Bac.*, 70: 495-501
- Doré W., Lees D., 1995. Behavior of *Escherichia coli* and male specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalves molluscs before and after depuration, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61: 2830-2834
- Doré W.J., Henshilwood K., Lees D.N., 1998. The development of management strategies for the control of virological quality in oysters, *Wat. Sci. Tech.*, 38: 29-35
- Green J., Henshilwood K., Gallimore C.I., Brown D.W.G., Lees D.N., 1998. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 858-863.
- Furfari S.A., Kelley-Reitz D.J., Dowgert M., 1992. Hazard analysis critical control points (HACCPs) and verification studies at shellfish depuration plants in the USA. Actes de colloques « purification des coquillages », 185-197.

- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 37(1): 27-36.
- Harvelaar A.H., 1993. Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment, *ASM News*, 59: 614-619.
- Jackson K.L., Ogburn D.M., 1996. Review of depuration and its role in shellfish quality assurance. NSW Fisheries final report series ISSN 1440-3544, 77 p.
- Metcalf T.G., Mullin B., Eckerson D., Moulton E., Larkin E.P., 1979. Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by soft-shelled clam, *Mya arenaria*. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 275-282.
- Monfort, P.;Piclet, G.;Plusquellec, A. 2000. *Listeria innocua* and *Salmonella panama* in estuarine water and seawater: A comparative study. *Water Res.*34 : 983-989.
- Salomon, J.C., Pommepuy, M., 1991. A mathematical model of dispersion/decrease of fecal bacteria in the Morlaix Estuary. *Actes de colloque international sur l'environnement des mers épicontinentales*. 63-69.
- Schwab K.J., Neill F.H., Estes M.K., Metcalf T.G., Atmar R.L., 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Protect.* 61: 1674-1680.
- Scotti P.D., Fletcher G.C., Buisson D.H., Fredricksen S., 1983. Virus depuration of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand. *New Zealand J. Science* 26: 9-1
- Sugieda M., Nakajima K., 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
- Troussellier, M. *et al.*, 1998. Responses of enteric bacteria to environmental stresses in seawater. *Oceanologica Acta*, 21(6): 965-981.

Travaux et publications des demandeurs :

- Caprais M.P., *et al.* 2001. Evaluation et adaptation d'un système de purification des coquillages pour l'élimination des virus entériques, rapport intermédiaire OFIMER.
- Brest G., *et al.* 2001. Purification virale des coquillages. Contrat DGAL
- Le Guyader F., Dubois E., Ménard D., Pommepuy M., 1994. Detection of Hepatitis A virus, Rotavirus and Enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 3665-3671.

- Le Guyader F., Neill F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T. & Atmar R.L., 1996. Detection and analysis of a Small Round-Structured virus strain in oysters implicated in an outbreak of acute gastro-enteritis. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 4268-4272.
- Le Guyader F., Miossec L., Atmar R.L., Estes M.K., Dubois E., Monroes., Ando T., Kopecka H., Pommepuy M., 1996. Observations épidémiologiques et analyse moléculaire des souches virales détectées dans 2 épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de coquillages. *Actualités en Microbiol. des Aliments, SFM*, 145-151.
- Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Dubois E., Kopecka H., Pommepuy M., 1998. Rt-pcr evaluation of viral contamination in 5 shellfish beds over a 21 month period. *Wat. Sci. Tech.*, Vol. 38, n° 12, pp. 45-50.
- Le Guyader F., Neill F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T., Atmar R.L., 1996. Detection and analysis of a SRSV strain in oysters implicated in an outbreak. *Appl. Envi. Microbiol.* 62 (11) : 4268-4272.
- Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L., Comps M.A., Pommepuy M., 1998. Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in france and viral contamination of shellfish. Second international conference on molluscan shellfish safety, Philippines, 17-21 november 1997.
- Miossec L., Le Guyader F., Pommepuy M., 1999. A first approach of the viral risk linked to shellfish, "risk assessment and management of microbial hazards associated with food and water", actes de colloques, Sheffield, 11-12 jan, 1999, GB.
- Pommepuy M., Janex M.L., Mandra V., Fiksdal L., Oberg C., Barcina I., Cormier M., Rudolph K.U., Audic J.M., 1998. Newtech : comparative evaluation of new techniques for waste water disinfection. (DGXII - Env. Programme EVS-CT94-400), Editions Ifremer, ISBN 2-905434-86-4, 24 p.
- Pommepuy M., Le Guyader F., 1998. Molecular approaches to measuring microbiol marine pollution. *Cur. Opinion biotech.*, 9 : 292-299.