

Direction de l'environnement et de l'aménagement littoral
Département phycotoxines et microbiologie
Laboratoire de microbiologie

Pommepuy Monique (coordinateur) et collaborateurs

Octobre 2002

ifremer

Contamination virale et indicateurs du risque

Rapport final

Contrat n° LT98036



Contamination virale et indicateurs du risque

Rapport final

Contrat n° LT 98036

Octobre 2002

Programme Liteau 1 : Contrat n° LT 98 036

Sommaire

1	MATÉRIELS ET MÉTHODES	6
1.1	ECHANTILLONNAGE	6
1.1.1	<i>Echantillons dans l'environnement</i>	6
1.1.2	<i>Echantillons dans la population</i>	7
1.2	MICROORGANISMES ÉTUDIÉS	8
1.2.1	<i>Environnement littoral</i>	8
1.2.2	<i>Population</i>	8
1.3	ANALYSES DES VIRUS DANS LES ÉCHANTILLONS	8
1.3.1	<i>Protocole de préparation des échantillons</i>	8
1.3.2	<i>Extraction et concentration des virus</i>	9
1.3.3	<i>Extraction des acides nucléiques (AN)</i>	10
1.3.4	<i>Détection par RT-PCR</i>	10
1.3.4.1	<i>Amorces et sondes</i>	10
1.3.4.2	<i>RT-PCR</i>	13
1.3.5	<i>Confirmation</i>	13
1.3.6	<i>Détection des inhibiteurs dans les coquillages</i>	14
1.4	ANALYSES D'E. COLI ET DE BACTÉRIOPHAGES	14
1.4.1	<i>Préparation des échantillons</i>	14
1.4.2	<i>Méthodes analytiques</i>	16
1.4.2.1	<i>Indicateur de contamination fécale : Escherichia coli</i>	16
1.4.2.2	<i>Recherche des bactériophages</i>	16
2	OPTIMISATION DES MÉTHODES POUR LA RECHERCHE DES VIRUS ENTÉRIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT	18
2.1	Eaux résiduaires, modification de la méthodologie	18
2.1.1	<i>Comparaison de deux techniques d'extraction</i>	18
2.1.2	<i>Amélioration de la détection par ajout d'une étape d'amplification (semi-nested) (Tableau II)</i>	18
2.1.3	<i>Discussion</i>	18
2.2	COQUILLAGES, AMÉLIORATION DE LA MÉTHODE DE DÉTECTION DES VIRUS	19
2.2.1	<i>Analyse bibliographique et comparaison de méthodes.</i>	19
2.2.2	<i>Matériel et méthode</i>	22
2.2.3	<i>Résultats</i>	25
2.2.4	<i>Discussion</i>	26
3	EPIDÉMIOLOGIE DES GASTRO-ENTÉRITES VIRALES DANS LE SECTEUR DE L'ÉTUDE	28
3.1	RECRUTEMENT DES MÉDECINS	28
3.2	DESCRIPTION GÉNÉRALE DES SUJETS AYANT CONSULTÉ AU 1 ^{ER} SEPTEMBRE 2001	29
3.2.1	<i>Éléments cliniques</i>	30
3.2.2	<i>Facteurs de risques</i>	31
3.2.3	<i>Prise en charge de la diarrhée aiguë</i>	31
3.3	EPIDÉMIOLOGIE	31
3.3.1	<i>Description des signes cliniques selon le statut infectieux des cas</i>	31
3.3.2	<i>Facteurs de risques associés au statut infectieux</i>	32
3.4	DISCUSSION	33

3.5	ETUDE DE LA CONTAMINATION DES SELLES	34
3.5.1	<i>Etude cas - témoins (population consultant un médecin généraliste)</i>	34
3.5.2	<i>Prélèvements collectés par les laboratoires</i>	35
3.5.3	<i>Age des patients</i>	36
3.5.4	<i>Répartition des prélèvements durant l'étude</i>	37
3.6	ANALYSE VIROLOGIQUE DES SELLES	38
3.6.1	<i>Prévalence des différents virus dans les selles</i>	38
3.6.1.1	Résultats pour l'ensemble de l'étude	38
3.6.1.2	Etude cas – témoins	39
3.6.1.3	Prélèvements inclus par le laboratoire du centre hospitalier de Vannes	40
3.6.1.4	Prélèvements inclus par les laboratoires d'analyses médicales	41
3.6.1.5	Prélèvements d'origine inconnue	41
3.6.2	<i>Répartition des différents virus selon l'âge des patients</i>	41
3.6.3	<i>Infection virale et aspect des selles</i>	42
3.7	CARACTÉRISATION DES SOUCHES D'ASTROVIRUS, ROTAVIRUS, CALICIVIRUS ET ENTÉROVIRUS	43
3.7.1	<i>Typage des souches d'astrovirus</i>	43
3.7.2	<i>Typage moléculaire des souches de rotavirus</i>	43
3.7.3	<i>Caractérisation moléculaire des souches de calicivirus</i>	44
3.7.3.1	Répartition des 51 souches détectées durant l'étude.	44
3.7.3.2	Caractérisation de souches particulières (figures 3.19, 3.21, 3.22 et 3.23)	46
3.7.4	<i>Typage moléculaire des souches d'entérovirus</i>	49
3.8	DISCUSSION - CONCLUSION	49
4	CONTAMINATION DES APPORTS ET DES COQUILLAGES	54
4.1	CONDITIONS MÉTÉOROLOGIQUES OBSERVÉES PENDANT LA PÉRIODE D'ÉTUDE	54
4.2	OBSERVATION DES DÉBITS JOURNALIERS DES STATIONS D'ÉPURATION PENDANT LA PÉRIODE D'ÉTUDE	56
4.3	RENDEMENT ÉPURATOIRE DES STATIONS	58
4.4	LES FLUX D'E. COLI EN SORTIE DES STATIONS D'ÉPURATION	59
4.5	RÉSULTATS MICROBIOLOGIQUES DANS LES EAUX USÉES	62
4.6	TRAITEMENT STATISTIQUE SUR LES RELATIONS ENTRE INDICATEURS ET LA PRÉSENCE DE VIRUS	66
4.6.1	<i>Relation entre les virus entériques</i>	66
4.6.2	<i>Relation entre les résultats analytiques sur les bactériophages.</i>	67
4.7	CONCLUSION	68
4.8	RÉSULTATS DANS LES COQUILLAGES	70
4.9	DISCUSSION – CONCLUSION	75
5	OUTILS D'AIDE À LA DÉCISION ET CONCLUSION	76
5.1	UTILISATION D'UN MODÈLE DE DISPERSION POUR SIMULER L'IMPACT DES REJETS	77
5.1.1	<i>Présentation du modèle</i>	77
5.1.2	<i>Rappel des valeurs mesurées dans les eaux et les coquillages</i>	78
5.1.3	<i>Valeurs simulées dans les rejets</i>	79
5.1.4	<i>Résultats</i>	80
5.1.5	<i>Discussion des résultats</i>	85
5.2	CONCLUSIONS	87
6	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
7	LISTE DES ABRÉVIATIONS	97

Auteurs

- **Pommepuy M.**, Coordinateur, *IFREMER, Laboratoire Microbiologie, Brest.*
- **Caprais M.P., C. Le Mennec, S. Parnaudeau et F. Le Guyader**, *IFREMER, Laboratoire Microbiologie, DEL, Brest-Nantes.*
- **Bon F., P. Pothier et E. Kohli**, *CHU, Laboratoire de Virologie de Dijon.*
- **Brachet R., A. Flahault**, *Laboratoire INSERM, Unité 444, Paris.*
- **Sarrette B. et P. Vilaginès**, *Centre de Recherche et de Contrôle des Eaux, Laboratoire de la Ville de Paris.*
- **Camus P., J. Dimeet, C. Treguier**, *IFREMER Laboratoire Côtier, La Trinité-sur-Mer.*

Modélisation : F. Dumas, (IFREMER/AO)

Photo de couverture J.L. Guillemot (www.golfedumorbihan.com)

Ce travail a été financé par le programme Liteau 1 : contrat n° LT98036

Rappel du projet de recherche

Le but de ce projet était d'étudier les apports de **microorganismes** par les **stations d'épuration** et les conséquences sur les niveaux de contamination des **coquillages** élevés dans les zones littorales. Ces résultats ont été associés à une approche épidémiologique basée sur des données d'incidence de différentes **souches virales** circulant dans la population et dans l'environnement (entérovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus humains, virus de l'hépatite A). Par ailleurs, ces résultats ont été évalués au travers d'informations complémentaires telles que la concentration en **indicateurs** de contamination fécale (*Escherichia coli* et bactériophages).

Le site d'étude était situé dans le Golfe du Morbihan. La circulation des souches virales dans la population a été étudiée tout au long de l'année en mettant l'accent sur la période épidémique hivernale. Des analyses microbiologiques ont été réalisées sur des échantillons de selles. Une surveillance mensuelle a été mise en place dans les eaux usées et les coquillages, sur 20 mois, afin d'évaluer la dispersion et la persistance des souches de pathogènes dans l'**environnement**. Les mêmes microorganismes que ceux analysés dans les selles ont été recherchés dans ces échantillons. L'objectif appliqué de ce projet a été d'identifier des **outils d'aide à la décision** pour prévenir le risque microbiologique lié à la consommation des coquillages.

Introduction

Le développement des activités humaines dans les régions littorales entraîne le rejet de germes pathogènes d'origine fécale dans l'environnement estuarien et marin. L'amélioration des traitements d'épuration, mais aussi la mise en place de normes bactériologiques pour surveiller les zones de production conchylicole, ont entraîné une diminution des épidémies bactériennes liées à la consommation de coquillages. Ainsi, à l'heure actuelle, même si l'origine de ces gastro-entérites n'est pas élucidée dans sa globalité (rôle probable des vibrios ou d'autres bactéries), les virus semblent jouer un rôle important et leur implication a été clairement établie dans des phénomènes épidémiques (Miossec et Vaillant, 2001).

Les principaux virus humains susceptibles d'être détectés dans l'environnement sont les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Parmi les nombreux types (au moins 120 types différents) de virus excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs sains, on trouve les entérovirus, hépatovirus, rotavirus, calicivirus (virus Norwalk-like¹ et Sapporo-like), astrovirus, adénovirus, coronavirus, parvovirus... Ces virus sont excrétés dans les selles pendant une durée variant de quelques jours à plusieurs semaines (Kholi *et al*, 2001). Les propriétés fondamentales des virus conditionnent leur devenir en milieu marin. En

¹ Les Norwalk-like depuis juillet 2002 sont appelés Norovirus, nous laissons cependant dans ce rapport l'appellation ancienne.

effet, leur parasitisme intracellulaire obligatoire, dépendant de cellules hôtes spécifiques, constitue un élément barrière pour leur développement après rejet dans le milieu extérieur. Ainsi, même s'ils peuvent persister pendant plusieurs semaines en milieu hostile, leur concentration n'augmentera pas. Leur capacité à résister aux traitements d'épuration des eaux usées et aux conditions défavorables du milieu extérieur leur permet de contaminer des gisements de coquillages situés parfois très loin des zones de rejet (Bosch *et al.*, 1988). En effet, les coquillages, mollusques filtreurs, peuvent concentrer les nombreuses particules sur lesquelles sont adsorbés les virus.

La mise en évidence de la contamination virale des coquillages, impliqués ou non dans des toxi-infections alimentaires, est encore restreinte en raison de la difficulté à trouver des techniques suffisamment sensibles. En effet, la majorité des virus humains, résistants dans le milieu extérieur sont des virus difficilement ou non cultivables (ce qui exclue toute possibilité d'isolement de la souche virale), les concentrations rencontrées sont souvent très faibles et, enfin, les échantillons sont fréquemment toxiques pour les tapis cellulaires. Ces dernières années, la biologie moléculaire a permis un développement très important de l'étude de la contamination microbienne de l'environnement (Metcalf *et al.*, 1995, Pommepey et Le Guyader, 1998). Cette évolution technologique a été particulièrement intéressante pour la mise en évidence de la contamination virale des coquillages. Ainsi, par exemple, seule la RT-PCR permet, à l'heure actuelle, de détecter la contamination des coquillages par les calicivirus humains. Le rôle important qu'ils jouent dans les phénomènes épidémiques liées à la consommation des coquillages, ainsi que vraisemblablement d'autres aliments, a favorisé le développement de méthodes pour les rechercher.

Ce rapport présente les résultats obtenus au cours d'une étude réalisée dans le secteur nord est du Golfe de Morbihan soumis à trois principaux rejets urbains contaminants (stations de Vannes-Tohannic, Séné-Le Ranquin et Arradon), sur la qualité des coquillages (palourdes et huîtres) pendant la période d'octobre 1999 à mai 2001.

1 Matériels et méthodes

1.1 Echantillonnage

1.1.1 Echantillons dans l'environnement

Les microorganismes ont été recherchés dans les eaux de station d'épuration rejetées dans le golfe, et, dans les coquillages. Les points d'échantillonnage des coquillages (figure 1) ont été choisis en fonction de leurs positions vis-à-vis des rejets, les uns sous influence de ces rejets (points 1 et 3, classement des secteurs conchylicoles en A, C ou D), les autres hors influence (classement A). La fréquence d'échantillonnage était mensuelle pour les eaux usées et les coquillages.

Sur la figure 1, sont reportés le secteur d'étude et la position des points de prélèvements.

Les trois stations d'épuration principales, influençant le secteur, ont été échantillonnées durant la période d'étude (octobre 1999 – mai 2001) :

- La station d'Arradon : 2 500 éq./hab. puis 7 000 éq./hab. à partir de mai 2000, boues activées faible charge, capacité hydraulique 375 m³/j, puis 1200 m³/j, rejet dans le golfe du Morbihan.
- La station de Vannes-Tohannic : 60 000 éq./hab., boues activées faible charge, capacité hydraulique 9500 m³/j, rejet dans le secteur de la rivière de Vannes.
- La station de Séné-Le Ranquin : 1 500 éq./hab., boues activées faible charge, capacité hydraulique 225 m³/j, rejet dans le secteur de la rivière de Vannes.

Les huîtres (*Crassostrea gigas*) et les palourdes (*Ruditapes philippinarum*) ont été collectées mensuellement d'octobre 1999 à mai 2001. Chaque échantillon était constitué d'environ 20 huîtres ou 30 palourdes. Les quatre sites ont été sélectionnés pour leur niveau de contamination bactérienne.

- **Point 1** : site de Rosvellec, dans l'estuaire de la rivière de Vannes, point d'échantillonnage de palourdes (*Ruditapes philippinarum*). Ce site est fréquemment contaminé par des coliformes fécaux car il est sous l'influence directe des rejets des stations Vannes-Tohannic et Séné-Le Ranquin. C'est une zone classée en D et pour partie en C, interdite à la pêche .
- **Point 2** : site du Lern, point d'échantillonnage de palourdes (*Ruditapes philippinarum*), zone classée A (secteur est du golfe).
- **Point 3** : site de Roguedas, point d'échantillonnage d'huîtres (*Crassostrea gigas*), zone classée B, peut être exceptionnellement touchée par les rejets dilués des trois stations d'épuration du secteur. Cependant ce site a vu sa contamination diminuer dans les 5 dernières années.
- **Point 4** : secteur du Creizic, point d'échantillonnage d'huîtres (*Crassostrea gigas*), zone classée A.



Figure 3.1 : Golfe du Morbihan, secteur d'étude, position des points de suivi.

1.1.2 Echantillons dans la population

Une enquête cas-témoin a débuté dans la région limitrophe de Vannes (bassin versant nord du Golfe du Morbihan), en octobre 1999 sur des cas de gastro-entérites sporadiques et des témoins indemnes de troubles digestifs et appariés aux cas selon l'âge. Les médecins généralistes libéraux de Vannes ont été sollicités par le réseau sentinelles de l'INSERM et ont été recrutés pour réaliser l'enquête. Les prélèvements de selles ont été effectués chez les cas et les témoins acceptant de participer à l'étude, puis adressés au laboratoire de virologie du CHU de Dijon (Pr Pothier).

Dans un premier temps, les échantillons de selles ont été prélevés chez des patients consultant un médecin généraliste participant à l'étude, pour une gastro-entérite aiguë (**cas**) ou chez des **témoins** consultant pour une autre raison. Dans un deuxième temps, afin d'augmenter le nombre d'échantillons, et donc les chances de détecter des souches virales pouvant être comparées à celles de l'environnement, des selles ont été aussi recueillies dans des laboratoires d'analyses médicales de ville (selles liquides ou semi-liquides adressées aux laboratoires pour analyse) ou grâce au laboratoire de Microbiologie du centre hospitalier de Vannes (patients consultant à l'hôpital pour gastro-entérite aiguë). Bien entendu, ces prélèvements n'ont pas été comptabilisés avec ceux obtenus par les médecins pour l'étude de la prévalence des différents virus dans la population consultant en médecine générale.

Tous les échantillons ont été adressés rapidement au laboratoire de Virologie du CHU de Dijon et immédiatement aliquotés et congelés à - 20 °C.

1.2 Microorganismes étudiés

1.2.1 Environnement littoral

Sur les échantillons de l'environnement (eaux de rejet et coquillages) deux types de microorganismes ont été recherchés :

- Les indicateurs de contamination fécale : *Escherichia coli* et bactériophages (F+ ARN spécifique et sur quelques eaux usées les phages de *Bacteroides fragilis*).
- Les virus entériques : astrovirus, calicivirus humains (Norwalk-like virus), entérovirus, virus de l'hépatite A, rotavirus.

1.2.2 Population

Sur les échantillons de selles les virus entériques suivants ont été recherchés : entérovirus, calicivirus humains, rotavirus, astrovirus, adénovirus et le virus de l'hépatite A.

1.3 Analyses des virus dans les échantillons

1.3.1 Protocole de préparation des échantillons

Certains problèmes analytiques s'étant présentés au cours de l'étude, un travail analytique de mise au point de méthodes a été réalisé (**chapitre 2.2. Coquillages, amélioration de la méthode de détection des virus**). En effet, les premières analyses, effectuées en utilisant la méthode proposée lors de l'appel à proposition, ont montré la présence de nombreux inhibiteurs en particulier dans les palourdes. Malgré des étapes de dilution ou de purification additionnelle des acides nucléiques (nouvelle précipitation au CTAB ou passage sur colonne), l'inhibition persistait dans certains échantillons. L'addition d'étapes supplémentaires à une méthode déjà longue (environ 8 heures d'extraction) présentait plusieurs inconvénients :

- temps d'analyse allongés et reproductibilité amoindrie,
- possibilité de perte des acides nucléiques au cours des différentes étapes (par perte du culot ou dégradation par introduction d'une RNase),
- possibilité de contamination entre les échantillons.

Nous avons donc dans un premier temps (chapitre 2.2), évalué plusieurs méthodes parmi lesquelles une seule a été sélectionnée sur des critères d'élimination des inhibiteurs, reproductibilité, sensibilité et facilité de manipulation.

De façon similaire, l'absence de détection d'entérovirus dans les eaux en utilisant une technique basée sur l'ultracentrifugation a amené à procéder à des essais supplémentaires de comparaison de méthode (chapitre 2.1).

Dans ce matériel et méthodes, seules les méthodes utilisées en final sont présentées.

1.3.2 Extraction et concentration des virus

Coquillages

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.

Pour la concentration, les échantillons sont traités selon la méthode décrite par Atmar *et al.* (1995). Brièvement, 1,5 g d'hépatopancréas congelés sont placés dans un tube de verre avec 2 ml de PBS puis broyés à l'aide d'un potter. Après transfert du broyat dans un tube falcon (50 ml), les tubes de verre sont rincés par 3 ml de PBS puis 3 ml de chloroforme-butanol. Tous les liquides de rinçage sont versés sur le broyat puis le tout est soigneusement mélangé au vortex à vitesse maximum pendant 30 sec. Après addition de cat-floc (173 µl), l'ensemble est agité pendant 5 min., décanté pendant 10 min à température ambiante puis centrifugé 15 min. à 13 500 *xg* à 4 °C. Le surnageant est récupéré et transféré dans un tube pour ultracentrifugation (Beckman). La concentration des particules virales est effectuée par ultracentrifugation pendant 1 heure à 160 000 *xg* à 4 °C. En fin de centrifugation, le surnageant est éliminé et les acides nucléiques sont extraits et purifiés comme ci dessous.

Eaux usées

Dès réception au laboratoire, les échantillons d'eaux épurées sont aliquotés (5 fractions de 50 ml) et congelés à - 20 °C. La concentration des particules virales a été réalisée à partir d'un aliquot de 30 ml par addition de NaCl (2,5 %) et de PEG 6000 (7,5 %). Après agitation 1 h à 4 °C, les virus ont été précipités par centrifugation à basse vitesse (Vilagines *et al.*, 1997).

1.3.3 Extraction des acides nucléiques (AN)

Coquillages

Les AN ont été extraits en utilisant le kit RNeasy Plant Mini kit (Qiagen) ; brièvement, les culots sont repris dans 450 µl de RLT (tampon de lyse additionné de mercapto-éthanol). Après homogénéisation, les tubes sont incubés au bain-marie à 56 °C pendant 5 min, vortexés vigoureusement puis passés sur la colonne QIAshredder par centrifugation à vitesse maximum pendant 2 min. Les éluats sont transférés dans un nouveau tube et additionnés de 0.5 volumes d'éthanol. Après mélange, les échantillons sont passés sur les colonnes RNeasy mini spin par centrifugation pendant 15 sec. Les colonnes sont ensuite lavées par 700 µl de tampon RW1, puis 2 fois 500 µl de tampon RPE. Les RNA sont alors élués par passage de 2 fois 50 µl d'eau distillée stérile additionnée de RNase inhibiteur (Gibco BRL). Puis ces 100 µl sont répartis en 2 tubes de 50 µl :

- un aliquot est immédiatement congelé à - 80 °C,
- le second aliquot est utilisé pour l'analyse.

Eaux usées

Le trizol est mis directement en contact avec le culot de PEG puis l'ARN viral est purifié par phénol-chloroforme. Les acides nucléiques sont concentrés par précipitation à l'isopropanol. Le culot final est repris dans 50 µl et immédiatement congelé à - 20 °C.

Selles

L'extraction des ARN à partir des selles est réalisée par une méthode au thiocyanate de guanidinium et silice (QIA Amp Viral RNA kit, Qiagen).

1.3.4 Détection par RT-PCR

Au début de l'étude une recherche bibliographique avait permis de sélectionner différents couples d'amorces pour typer les souches virales avec le maximum de consensus entre partenaires.

1.3.4.1 Amorces et sondes

Les différents virus recherchés au cours de cette étude ont été, autant que possible, amplifiés **par les mêmes amorces** dans les coquillages, les eaux usées, et les selles. L'utilisation des même amorces par les participants permet une comparaison entre échantillons. Différents types d'amorces ont été utilisés dans cette étude :

- des amorces sélectionnées pour leur capacité à amplifier un large éventail de souches, quelque soit le type de virus recherché,

- des amorces de "typage" permettant de caractériser les souches détectées et de faciliter les comparaisons entre les différents résultats selon les échantillons cliniques ou environnementaux.

Astrovirus (AV)

Pour l'analyse de l'eau et des coquillages des amorces situées dans la partie 3' non codante ont été utilisées (Mitchell *et al.*, 1995). Pour le typage des AV dans les selles, les amorces Mon244 et Mon245 ont été utilisées (Noël *et al.*, 1995).

Nom	Sens	Séquence (5'-3')	Position	Référence
AV1	-	gcttctgattaaatcaat	6776-6797	Mitchell <i>et al.</i> , 1995
AV1	+	cgagtaggatcgaggta	6709-6727	Mitchell <i>et al.</i> , 1995
AV3	+	atcaccatttaaaattgattaatcagaag	6768-6797	Marx <i>et al.</i> , 1997
Mon 245	-	ttagtgagccagccatg	4934- 4953	Noel <i>et al.</i> , 1995
Mon 244	+	ggtgtcacaggaccaaacc	4541-4560	Noel <i>et al.</i> , 1995

Calicivirus (CV)

Les amorces situées dans la polymérase ont été utilisées par les trois laboratoires.

La RT a été réalisée en utilisant une amorce dégénérée NVp110 (Le Guyader, 1996) puis des amorces de PCR permettant de détecter les deux génogroupes ont été utilisées (cf. tab.) Pour les selles, le couple JV12-JV13 (Vinje *et al.*, 1996) a également été testé afin de vérifier s'il permettait d'augmenter la sensibilité. De plus, dans ces échantillons cliniques, la recherche du genre Sapporo-like a été réalisée à l'aide des amorces P110/SR80.

Par ailleurs des amorces situées dans la région codant pour la protéine de capsid ont également été utilisées (Hafliger *et al.*, 1997).

Nom	Sens	séquence	Localisation	Référence
P110	-	ac(atg)at(ct)tcacatcaccata	4865-4884	Le Guyader <i>et al.</i> , 1996
P36	+	ata aaa gtt ggc atg aac a	4487- 4505	Wang <i>et al.</i> , 1994
NI	+	gaa ttc cat cgc cca ctg gct	4768-4788	Green <i>et al.</i> , 1995
SR48	+	gtg aac agc ata aat cac tgg	4766-4786	Ando <i>et al.</i> , 1995
SR50	+	gtg aac agt ata aac cac tgg	4766-4786	Ando <i>et al.</i> , 1995
SR52	+	gtg aac agt ata aac cat tgg	4766-4786	Ando <i>et al.</i> , 1995
JV13	-	tcacatcaccatagaaagag	4856- 4877	Vinje <i>et al.</i> , 1996.
JV12	+	ata cca cta tga tgc aga tta	4552-4572	Vinje <i>et al.</i> , 1996
SR80	+	tgggattctacacaaaacc	178-197 ^{? sap}	Noel <i>et al.</i> , 1997
SRI-1	-	ccaaccarccatrtacat	5640-5659	Hafliger <i>et al.</i> , 1997
SRI-2	+	aatgatgatggcgtcta	5344-5361	Hafliger <i>et al.</i> , 1997
SRI-3	-	aaaayrtcaccggkgtat	5566-5584	Hafliger <i>et al.</i> , 1997
SRII-1	-	cgccatcttcacacaaa	5339-5357	Hafliger <i>et al.</i> , 1997

SR11-2	+	twctcyttytatggatgatga	4844-4866	Hafliger <i>et al.</i> , 1997
SR11-3	-	twccaaaccaaccwgctg	5028-5046	Hafliger <i>et al.</i> , 1997
MON381	+		5362-5384	Noel <i>et al.</i> , 1997
MON 383	-		5661-5683	Noel <i>et al.</i> , 1997

Rotavirus (RV)

Des amorces situées dans les gènes 9, 4 et 6 ont été utilisées.

Nom	Gène	Séquence (5'-3')	Position	Référence
Beg9	9	ggctttaaagagagaattccgtctgg	1-28	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
End9	9	gatcctgttgccatcc	376-392	Gouvea <i>et al.</i> , 1990
Con1	4	ttgccaccaattcagaatac	676-695	Gentsch <i>et al.</i> , 1992
Con2	4	atttcggaccattataacc	868-887	Abbaszadegan <i>et al.</i> , 1999
C1	6	ctcgatgctactacagaatcag	994-1016	Gouvea <i>et al.</i> , 1991
C4	6	agccacatagttcacatttcaccc	1325-1349	Gouvea <i>et al.</i> , 1991

Virus hépatite A (VHA)

Les amorces décrites par Robertson *et al.* (1991) permettant d'amplifier une région codant pour la protéine de capsid VPI ont été utilisées. En cours d'étude des amorces plus sensibles situées dans la région 5' non codante ont été ajoutées pour les coquillages (Bosch *et al.*, 2001).

Nom	Sens	Séquence (5'-3')	Position	Référence
H1	-	ggaaatgtctcaggtactttcttg	2389-3414	Robertson <i>et al.</i> , 1989
H2	+	gttttgcctctttatcatgctatg	2167-2192	Robertson <i>et al.</i> , 1989
Hsonde	+	tcaacaacagtttctacaga	2233-2252	Robertson <i>et al.</i> , 1989
H7	-	ggagagccctggaagaaaga	220-240	Bosch <i>et al.</i> , 2001
H8	+	tcaccgccgttgcttag	68-86	Bosch <i>et al.</i> , 2001
H9	+	ttaattctgcaggttcagg	150-169	Bosch <i>et al.</i> , 2001

Enterovirus (EV)

Pour la détection dans les coquillages, le couple PV444/P1 a été utilisé tandis que dans les eaux et les selles le couple E1 et E2 a été utilisé. Ces amorces sont localisées au même endroit du génome et sont donc tout à fait comparables.

Nom	Sens	Séquence (5'-3')	Position	Référence
PV444	-	cattcaggggccggagg	444-460	Shieh <i>et al.</i> , 1997
P1	+	cgttatccgcttatgtactt	225-244	Shieh <i>et al.</i> , 1997
Psonde	+	ggctgcgttgccggcctacct	357-378	Bosch <i>et al.</i> , 1996
E2	-	caccggatggccaatccaat	622-642	Chapman <i>et al.</i> , 1990
E1	+	tcggcccctgaatgcgc	446-464	Chapman <i>et al.</i> , 1990
F2	+	cttgcgcgttacgac	577-596	Kopecka <i>et al.</i> , 1993

1.3.4.2 RT-PCR

Les réactions des RT-PCR ont été effectuées dans les trois laboratoires selon les protocoles préconisés par les fournisseurs d'enzymes (Perkin-Elmer). Pour les réactions de PCR, 40 cycles ont été effectués aux températures d'analyses appropriées selon les amorces utilisées (en général 50 °C).

1.3.5 Confirmation

Coquillages

Après lecture par électrophorèse sur gel de polyacrylamide et coloration au bromure d'éthidium, tous les produits de PCR ont été hybridés par la technique du dot-blot. Brièvement, les produits amplifiés sont dilués dans un tampon (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), dénaturés pendant 5 min. à 95 °C, et immédiatement placés sur la glace. Ils sont ensuite fixés sur une membrane de nylon (Roche) par aspiration sous vide et exposition aux UV pendant 5 min.

Un contrôle positif est introduit sur chaque dot-blot. Les sondes sont marquées en 3' selon la technique du tailing (Roche). Après pré-hybridation pendant 30 min à 50 °C, l'hybridation est réalisée pendant 2 heures à 50 °C. La révélation est ensuite effectuée par chimi-luminescence (Roche) et la lecture est effectuée à l'aide d'un multi-imager (BioRad). Un échantillon est considéré comme positif si un signal est observé après hybridation (quelle que soit l'image vue sur gel) (Le Guyader *et al.*, 2000).

Eaux usées

Une semi-nested PCR a été réalisée pour confirmer les résultats de PCR obtenus pour les entérovirus et les rotavirus en utilisant les amorces décrites ci-dessus.

Selles

Les échantillons de selle ont été screenés dans un premier temps par des méthodes plus rapides.

Les rotavirus sont recherchés par une technique immunoenzymatique (Pothier *et al.*, 1987). Les astrovirus et les adénovirus 40 et 41 sont également recherchés par une technique immunoenzymatique (IDEIA, DAKO et Adenoclone 40/41, Meridian Diagnostics respectivement).

Tous les échantillons positifs à l'exception des adénovirus 40 et 41 sont réamplifiés par RT-PCR afin de caractériser les souches détectées, par séquençage direct des produits de PCR sur le séquenceur 373 DNA Sequencer à l'aide du kit Big Dye Terminator selon les recommandations du fabricant (Applied Biosystem).

Certaines souches de virus *Norwalk-like* (NLV) présentant des particularités moléculaires ont été amplifiées et séquencées au niveau d'autres régions que l'ARN polymérase : région codant pour l'hélicase pour les NLVs du génogroupe I selon la technique décrite par Wang *et al.* (1994) et région codant la capsid pour les NLVs appartenant aux génogroupes I et II selon les techniques décrites par Häfliger *et al.* (1997) et Noel *et al.* (1997) respectivement.

1.3.6 Détection des inhibiteurs dans les coquillages

La persistance d'inhibiteurs est recherchée par amplification d'un contrôle interne simple brin (CI), construit au laboratoire à partir du génome du poliovirus de type 1 (Le Guyader *et al.*, 1997). Une dilution correspondant à 10 unités PCR du CI, est mélangée à volume égal avec l'échantillon à analyser et introduit dans le mix de RT. La RT-PCR est ensuite effectuée classiquement. Après amplification, la PCR est lue sur gel et l'absence de bandes correspondant au CI est témoin de la présence d'inhibiteurs. Dans ce cas, l'échantillon est analysé après dilution au $1/10^e$ ou re-extrait.

1.4 Analyses d'*E. coli* et de bactériophages

1.4.1 Préparation des échantillons

Les coquillages

Les bactériophages sont des virus infectant les bactéries. Ils sont inertes et ne peuvent se développer qu'en présence de la bactérie hôte. Il existe en général une haute spécificité entre la bactérie et son phage. Plusieurs classes de bactériophages ont été proposées comme indicateurs de contamination fécale (Armon et Kott, 1996). Pour cette étude nous avons retenu les deux groupes suivants :

- Les phages de *bactéroïdes fragilis*, bactérie anaérobie présente dans le tractus intestinal de l'homme exclusivement. Ces bactériophages présentent l'avantage de signer une contamination humaine et de permettre ainsi de distinguer l'origine de la pollution par rapport à une contamination d'origine agricole (Joffre *et al.*, 1997). Cependant ils ne sont pas toujours présents sinon en nombre limité dans les selles humaines et de ce fait leur concentration dans l'environnement est très faible. Par ailleurs la méthode de détection est assez délicate à mettre en œuvre : conditions d'anaérobiose, fragilité de la bactérie, etc. (Lemaître, 1990).
- Les phages F+ARN spécifiques : ces phages infectent leur hôte par l'intermédiaire de pili sexuels de fertilité (F). Ces phages appartiennent à la famille des Leviviridae (MS2), ils contiennent un brin d'ARN monocaténaire et infectent des bactéries telles que *E. Coli* ou *Salmonella spp.*

Ces deux catégories de phages ont été retenues, car elles constituent des groupes assez homogènes de structure et de taille comparable aux entérovirus (20 à 27 μm). Leurs mises

en évidence nécessitent des techniques peu coûteuses et relativement faciles à mettre en œuvre au laboratoire. Cependant la recherche de *bacteroïdes fragilis* est plus délicate puisqu'elle se fait en anaérobiose, et a posé un problème au niveau des seuils de détection. Ceci a nécessité de mettre au point un protocole de concentration des virus. Des données sur les phages de *bacteroïdes fragilis* ont ainsi été acquises durant les neuf premiers mois de l'étude.

Pour les **bactériophages**, à la réception, les coquillages sont lavés, ouverts ; la chair et le liquide intervalvaire sont récupérés, pesés et dilués dans deux volumes d'eau peptonée salée. Le broyat (6 huîtres ou 10 à 12 palourdes) s'effectue au moyen d'un Waring Blender à la vitesse rapide 3 x 30 secondes ; une centrifugation à basse vitesse (2 500 g) pendant 15 mn permet d'obtenir un surnageant plus clair sur lequel se fait l'analyse en plusieurs réplicats après dilution si nécessaire. Le surnageant est conservé à - 20 °C pour d'éventuelles vérifications. Le résultat obtenu est exprimé en nombre d'unités formant plaque pour 100 grammes de chair et de liquide intervalvaire (UFP/100 g). La limite de détection est de 150 UFP/100 g.

Pour les **bactéries** : la préparation des coquillages se fait selon la norme NF V08-600. *Escherichia coli* est recherchée par conductancemétrie selon la norme NF V08-105.

Les eaux épurées de station d'épuration

Pour les **bactériophages**, avant l'analyse, les échantillons sont aliquotés, une partie est analysée directement, l'autre partie est gardée au congélateur à - 20 °C pour des investigations ultérieures ou confirmation de résultats.

L'analyse des F ARN spécifiques se fait directement sur l'échantillon (1 ml). Les résultats sont exprimés en unité formant plaque de lyse et la limite de détection est de 100 UFP/100 ml.

Pour les bactériophages de *Bactéroïdes fragilis*, une étape de concentration s'avère nécessaire. Le protocole, décrit par Duran *et al.* en 2001, est le suivant : 10 ml de MgCl₂ (0.05 M) sont ajoutés à 100 ml d'échantillon, agités pendant 15 mn à température ambiante, puis filtrés sur filtre millipore de diamètre 47 mm et de porosité 0.22 ou 0.45 µm. Le filtre sur lequel se sont fixés les virus est récupéré soigneusement et l'élution des particules virales est obtenue par sonication du filtre dans un éluat composé d'extrait de bœuf, de tween 80 et de chlorure de sodium. Le facteur de concentration est de 20 et la limite de détection est alors de 5 PFU/100 ml.

Pour les **bactéries** : *Escherichia coli* est recherchée par conductancemétrie dans les échantillons dès réception au laboratoire selon les normes NF V08-600 et NF V08-105.

1.4.2 Méthodes analytiques

1.4.2.1 Indicateur de contamination fécale : *Escherichia coli*

La recherche d'*E. coli* est réalisée sur les échantillons d'eaux usées et de coquillages (Dupont *et al.*, 1996). Les résultats colimétriques sont exprimés en nombre d'*E. coli* par 100 g de chair et de liquide intervalvaire pour les coquillages (UFP/100 g) et nombre d'*E. coli* par 100 ml (UFP/100 ml) pour les effluents de station.

1.4.2.2. Recherche des bactériophages

Préparation des échantillons et analyse des phages

La méthode de détection est basée sur la norme ISO 10705-1 (1995) pour la détection et le dénombrement des F+ARN spécifiques dans les eaux et la norme ISO/CD 10705-4 (1999) pour la détection et le dénombrement des bactériophages infectant *Bacteroides fragilis*. Le principe de la méthode est simple (figure 1.2) et consiste à mélanger un volume connu de l'échantillon à une culture de la bactérie hôte, à l'incorporer ensuite à de la gélose molle (semi-solide maintenue en surfusion à 50 °C) et à couler enfin le mélange dans une boîte de pétri.

Après une incubation de 18 h à 37 °C, chaque phage présent dans l'inoculum se multiplie aux dépens du tapis de bactéries hôtes. Ceci se traduit par la formation de trous correspondant aux plages de lyses. La quantification sera réalisée en comptant les plages de lyse et en les rapportant à 100 ml d'eau.



Figure 1.1 : Analyse des phages.

La souche hôte utilisée pour cette méthode est une *Salmonella* WG 49 résistante à l'acide nalidixique, ce qui permet de disposer d'un critère d'élimination de la flore bactérienne présente dans l'échantillon à analyser. Un plasmide permettant à la bactérie de produire des pili sexuels a été introduit dans la Salmonelle. Cependant ce plasmide n'est pas stable et des précautions doivent être prises au moment de la culture de cette bactérie pour ne pas avoir de difficultés lors de l'analyse (résultat faux négatifs dû à la perte du plasmide de la bactérie hôte).

Il est indispensable avant de réaliser les analyses d'effectuer un contrôle de qualité de cette bactérie. Par ailleurs, un témoin constitué d'une solution de phages de titre connu sert à s'assurer du bon fonctionnement de l'analyse.

2 Optimisation des méthodes pour la recherche des virus entériques dans l'environnement

2.1 Eaux résiduaires, modification de la méthodologie

La présence d'entérovirus dans des eaux résiduaires est reconnue depuis plus d'une quarantaine d'années. C'est pourquoi, nous avons procédé chronologiquement à la recherche des virus de ce genre. L'absence systématique de leur détection dans des eaux résiduaires épurées, anormale au regard de notre expérience, nous a amenés à procéder à des essais supplémentaires sur du poliovirus type 1, destinés à améliorer le seuil de détection des entérovirus.

2.1.1 Comparaison de deux techniques d'extraction

A partir de suspensions virales (poliovirus Sabin type 1, LSc 2ab) réalisées dans du milieu de culture et dans des eaux de distribution, titrant respectivement $1,9 \cdot 10^9$ UFP, $5 \cdot 10^8$ UFP et $5 \cdot 10^7$ UFP / 11,5 ml, la comparaison de l'extraction de l'ARN avec le kit Roche-Boehringer et du Trizol™ ajouté directement sur le culot de NaCl-PEG 6000 après concentration des virus avec du NaCl-PEG 6000, a montré que le Trizol™ donnait systématiquement des résultats positifs contrairement au kit Roche-Boehringer (résultats toujours négatifs).

2.1.2 Amélioration de la détection par ajout d'une étape d'amplification (semi-nested) (Tableau II)

La sensibilité de la détection par amplification génique en utilisant les amorces "K1-K2" (Kopecka *et al.*, 1993), a été définie en procédant à l'analyse de suspensions (poliovirus Sabin type 1, LSc 2ab) de concentrations variant de $5 \cdot 10^7$ UFP / 50 μ l (= $1 \cdot 10^6$ UFP / μ l dans la réaction RT-PCR on utilise 2 μ l, donc : $2 \cdot 10^6$ UFP détectables) à $2 \cdot 10^1$ UFP / 2 μ l. Dans ces conditions, le seuil de détection obtenu a été de $2 \cdot 10^3$ UFP / 2 μ l de volume réactionnel.

La sensibilité de la méthode a donc été améliorée en introduisant une étape supplémentaire d'amplification (semi-nested) mettant en œuvre les amorces "F2-K1" (Kopecka *et al.*, 1993) : le seuil de détection a été évalué à $\leq 2 \cdot 10^1$ UFP / 2 μ l.

2.1.3 Discussion

Ces résultats concluants pour les entérovirus, ont conduit à pratiquer sur chaque échantillon (30 ml), une concentration des virus (NaCl-PEG 6000) suivie d'une extraction avec du Trizol™, réalisée directement sur le culot de centrifugation. Une RT-PCR a été réalisée sur tous les virus recherchés. Dans le cas des entérovirus, une PCR « semi-nested » a été systématiquement effectuée (amorces : K1-K2, puis F2-K1). Pour les rotavirus, le segment 9 a été amplifié dans sa totalité (Beg 9 – End9), puis une amplification supplémentaire a été systématiquement effectuée avec les amorces Beg9-R4 (semi-nested).

2.2 Coquillages, amélioration de la méthode de détection des virus

2.2.1 Analyse bibliographique et comparaison de méthodes.

Seules les méthodes récentes et présentant un intérêt méthodologique sont rapportées ici. Les méthodes sont le plus souvent décrites pour les 2 types de virus présentant un réel impact de santé publique : les virus norwalk-like (NLV) et le virus de l'hépatite A (VHA). On peut remarquer que les 2 approches basées sur une extraction-concentration ou une adsorption-élution-concentration décrites il y a plusieurs années pour les virus entériques cultivables sont toujours d'actualité (Lees, 2000). La différence essentielle repose sur la purification des acides nucléiques (AN) pour l'amplification génique utilisée pour détection des virus non cultivables. Un des autres atouts majeurs de cette technique est la possibilité de caractériser les souches détectées par l'hybridation moléculaire du fragment amplifié ou par le séquençage.

Les premières études utilisaient le plus souvent des souches de laboratoire adaptées à la culture cellulaire telle que des souches de poliovirus, rotavirus simien ou HAV pour inoculer artificiellement des coquillages et évaluer ensuite l'efficacité de la méthode par RT-PCR (Lees *et al.*, 1994 ; Atmar *et al.*, 1995 ; Cromeans *et al.*, 1997 ; Lees *et al.*, 1995 ; Jaykus *et al.*, 1996) (figure 2.1). Ces méthodes ont généralement démontré que la détection était possible mais que les chairs de coquillage introduisaient de nombreux inhibiteurs pour la détection par RT-PCR. Les efforts ont donc été dirigés sur l'extraction-concentration des virus et l'extraction-purification des AN. Une des améliorations majeures a été la démonstration que les virus sont majoritairement concentrés dans les tissus digestifs des coquillages (estomac, hépato-pancréas, intestins) (Romalde *et al.*, 1994, Schwab *et al.*, 1998). Plusieurs méthodes, basées sur une dissection préalable des tissus digestifs ont alors été proposées (Atmar *et al.*, 1995, Sugieda *et al.*, 1996 ; Green et Lewis, 1999 ; Shieh *et al.*, 1999 ; Legeay *et al.*, 2000) (figure 2.2). Lorsque la détection spécifique du VHA est effectuée, certains auteurs proposent d'utiliser la capture antigénique comme étape de concentration et purification préalable des particules virales (figure 2.3). Cependant cette méthode n'est utilisable que pour les familles de virus possédant un antigène de groupe, ce qui limite considérablement l'utilité.

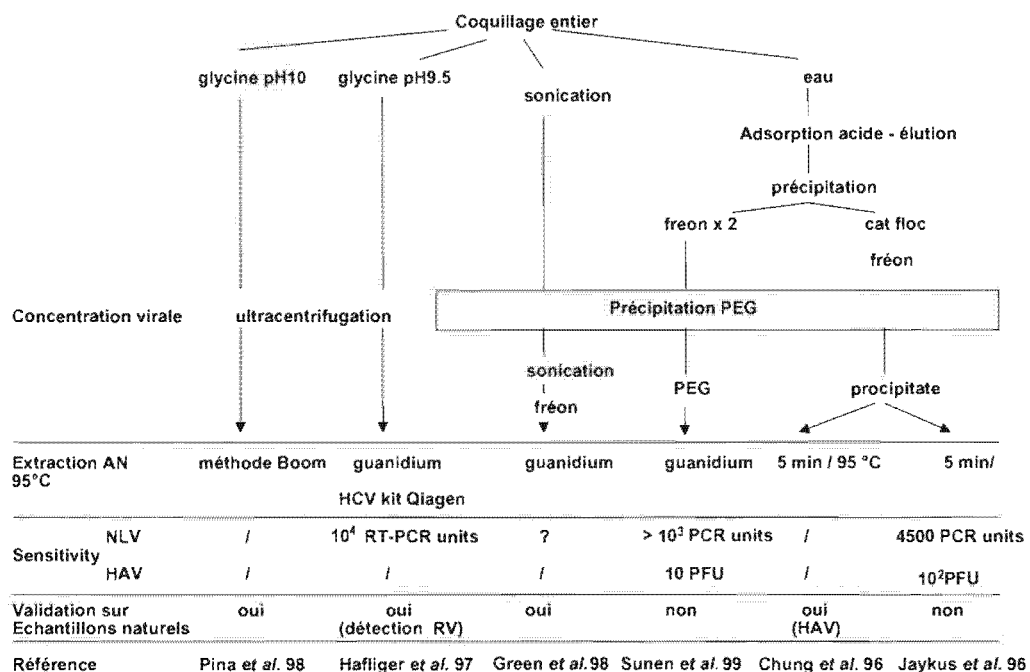


Figure 2.1. : Méthodes basées sur l'analyse de coquillages entiers.

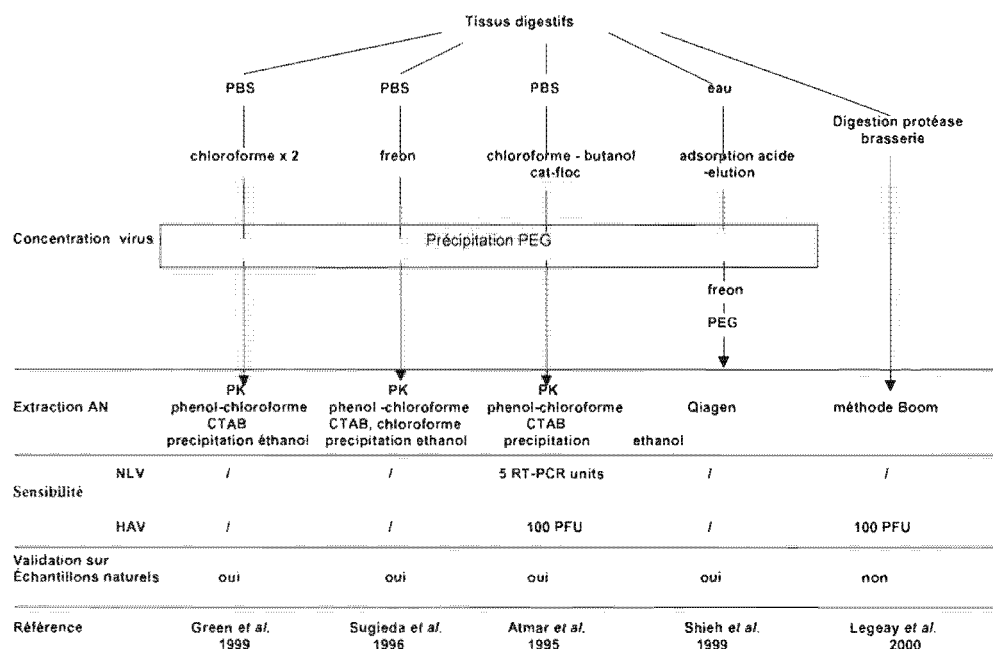


Figure 2.2. : Méthodes basées sur l'analyse de coquillages disséqués.

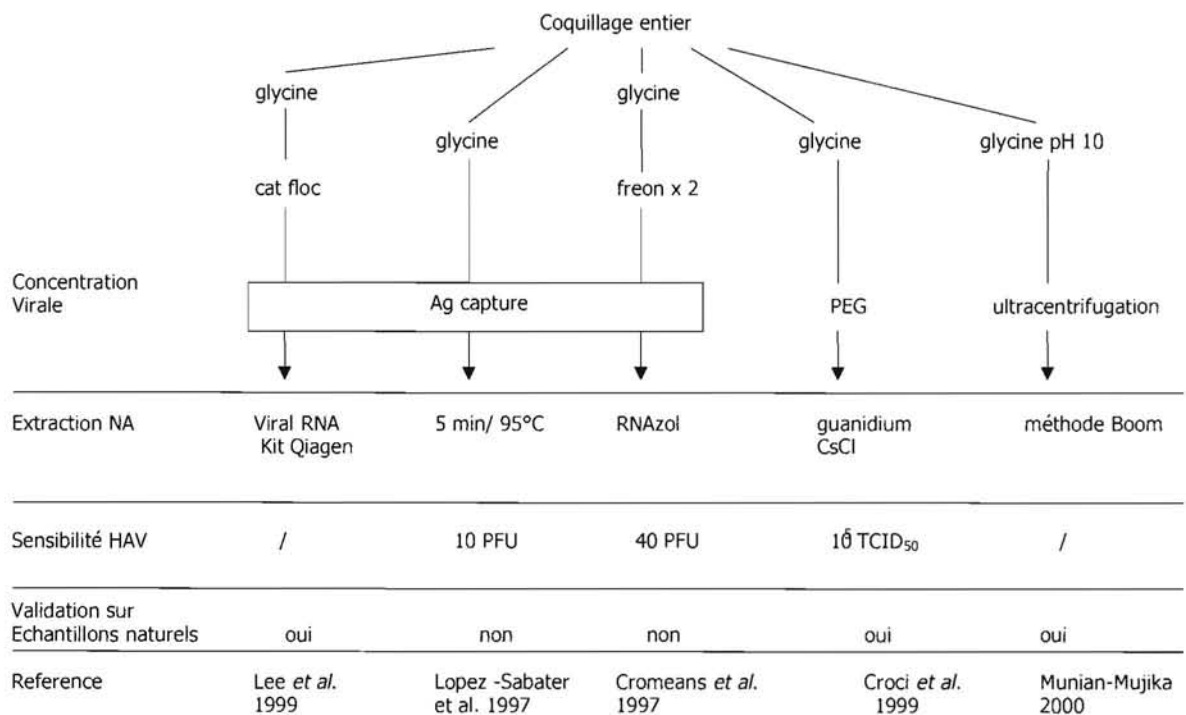


Figure 2.3 : Méthodes développées pour la détection spécifique du VHA.

Peu d'auteurs valident leurs méthodes par l'application à des échantillons naturellement contaminés. Cette étape semble cependant primordiale pour évaluer l'efficacité du protocole à purifier et à concentrer des particules qui peuvent être dans les tissus des coquillages depuis plusieurs semaines, mais aussi pour évaluer la sensibilité (la contamination étant le plus souvent très faible). Dans les figures 2.1, 2.2 et 2.3 la validation des méthodes proposées sur des échantillons naturels est notée.

Après la phase initiale d'extraction-concentration des particules virales, plusieurs protocoles d'extraction-purification des acides nucléiques ont été proposés. Le volume réactionnel de la RT-PCR étant faible, ces protocoles nécessitent d'incorporer des phases de concentration. Des méthodes utilisent la lyse par le guanidium et la purification par la silice (Lees *et al.*, 1994 ; Hafliger *et al.*, 1997), ou la purification par des solvants organiques puis une précipitation sélective des acides nucléiques comme par exemple l'utilisation du détergent cationique cetyltrimethyl ammonium bromide (Jaykus *et al.*, 1996 ; Atmar *et al.*, 1995). Il est intéressant de noter que les kits commerciaux, mis au point au départ pour le diagnostic clinique, commencent à être utilisés pour les coquillages (Hafliger *et al.*, 1997 ; Shieh *et al.*, 1999 ; Lee *et al.*, 1999).

A partir de cette analyse bibliographique nous avons décidé de comparer 2 méthodes de concentration (précipitation par le PEG ou ultracentrifugation) et une extraction directe (congélation dans l'azote liquide) et 3 méthodes d'extraction et purification des AN dont une méthode basée sur l'utilisation du trizol et 2 kits commerciaux : Rneasy Mini Plant kit

(Qiagen) et le RNA+ (Roche). Ces méthodes ont été comparées sur un échantillon de coquillage naturellement contaminé.

2.2.2 Matériel et méthode

Echantillon

Un échantillon de moules a été prélevé dans une zone insalubre, connue pour une contamination en virus humains fréquente. Un grand nombre d'individus a été ramassé, et expédié au froid sous 24 h au laboratoire. Ces moules ont alors été disséquées et 20 aliquots d'1,5 g d'hépatopancréas ont été réalisés et congelés à -20°C immédiatement.

Concentration virale

Méthode A : 6 aliquots d'hépatopancréas ont été placés dans des tubes de verre avec 2 ml de PBS. Les échantillons ont alors été broyés à l'aide d'un potter. Après transfert du broyat dans un tube falcon (50 ml), les tubes de verre ont été rincés par 3 ml de PBS puis 3 ml de chloroforme-butanol. Tous les liquides de rinçage ont été versés sur le broyat puis le tout a été soigneusement mélangé au vortex à vitesse maximum pendant 30 sec. Après addition de cat-floc (173 μl), l'ensemble a été agité pendant 5 min., décanté pendant 10 min à température ambiante puis centrifugé 15 min. à 13 500 $\times g$ à 4°C . Le surnageant a été récupéré et transféré dans un tube pour ultracentrifugation (Beckman). La concentration des particules virales a été effectuée par ultracentrifugation pendant 1 heure à 160 000 $\times g$ à 4°C . En fin de centrifugation, le surnageant a été éliminé et les culots extraits selon les 3 méthodes.

Méthode B : 6 aliquots d'hépatopancréas ont été congelés dans l'azote liquide puis placés pendant quelques heures à -70°C . Le tampon de lyse a ensuite été directement mis en contact avec les tissus encore congelés. Si la totalité des tissus a ensuite été utilisée pour l'extraction utilisant le trizol, seulement une faible proportion a été utilisée pour l'extraction par les kits commerciaux afin de respecter les protocoles.

Méthode C : le broyage des 6 aliquots a été effectué comme pour la méthode A. Après la centrifugation, le surnageant est mélangé avec 3 ml de PEG/NaCl, agité pendant 1 h à 4°C puis centrifugé pendant 30 min à 10 000 $\times g$ à 4°C . Le surnageant est éliminé et les culots utilisés pour l'extraction des AN.

Extraction des AN

Pour chacune des trois méthodes d'extraction, 2 réplicats obtenus par les trois méthodes de concentration ont été analysés (Figure 2.4). Pour chaque méthode d'extraction, les modes opératoires préconisés par les fournisseurs ont été suivis. Les principales étapes sont rappelées ci-après.

Méthode au Trizol : les culots obtenus pour la méthode A et C ont été repris dans 1 ml de Trizol. Pour la méthode B, les tissus ont été broyés directement congelés dans 2 ml de Trizol. Après contact pendant 5 min, les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 12 000 $\times g$. Les surnageants ont été récupérés, incubés pendant 5 min à température

ambiante, puis 0,2 ml (0,4 ml pour B) de chloroforme ont été ajoutés. Après agitation pendant 15 sec, incubation 3 min à température ambiante, les mélanges ont été centrifugés pendant 15 min à 12 000 xg à 4 °C. Après récupération de la phase aqueuse les AN ont été précipités par l'isopropanol. Une purification supplémentaire a été effectuée par le CTAB. Les AN ont alors été précipités par l'isopropanol puis repris dans 100 μ l d'eau stérile.

Kit Qiagen : les culots ont été repris dans 450 μ l of RLT (tampon de lyse additionné de mercapto-ethanol). Pour la méthode B, 3 ml de tampon de lyse ont été ajoutés sur les tissus congelés puis une fraction de 450 μ l a été prélevée pour la suite de l'extraction. Après homogénéisation, les tubes ont été incubés au bain-marie à 56 °C pendant 5 min, vortexés vigoureusement puis passés sur la colonne QIAshredder par centrifugation à vitesse maximum pendant 2 min. Les éluats ont été transférés dans un nouveau tube et additionnés de 0.5 volumes d'éthanol. Après mélange, les échantillons ont été passés sur les colonnes Rneasy mini spin par centrifugation pendant 15 sec. Les colonnes ont ensuite été lavées par 700 μ l de tampon RW1, puis 2 fois 500 μ l de tampon RPE. Les RNA ont ensuite été élués par passage de 40 μ l d'eau stérile.

Kit Roche : les culots ont été repris dans 200 μ l d'eau stérile puis 400 μ l de tampon de lyse (tampon contenant du RNA carrier). Pour la méthode B, les tissus ont été broyés dans 2 ml de tampon puis 600 μ l ont été prélevés pour la suite de l'analyse. Les mélanges ont été passés sur des colonnes par centrifugation pendant 15 sec à 8 000 xg . Les colonnes ont été lavées 2 fois par 450 μ l de solution de lavage par centrifugation 15 sec à 8 000 xg . Les AN sont élués par passage de 50 μ l de tampon d'éluion et centrifugation 1 min à 8 000 xg .

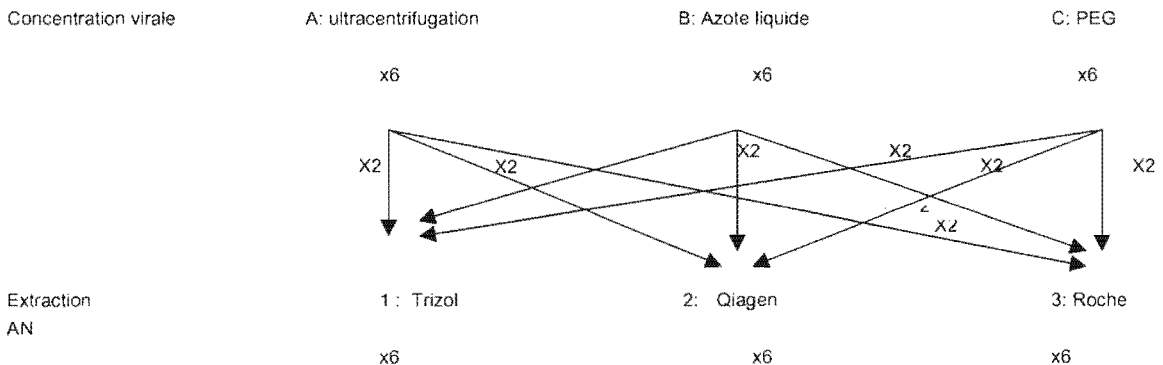


Figure 2.4 : Schéma pour la comparaison des méthodes.

Evaluation de la qualité de l'extraction

Mesure de la pureté de l'ARN par densité optique : Pour chaque extrait un aliquot de l'extrait d'AN a été dilué au 1/10 dans du Tris HCl pH 7.5 puis placé dans une cuve pour lecture au spectrophotomètre. Le rapport des valeurs lues aux longueurs d'onde 260 et 280 a été calculé pour chaque échantillon.

Contrôle de la présence d'inhibiteurs par co-amplification d'un CI sbRNA et dbRNA : des contrôles internes ARN simple brin (sbRNA) ou double brin (dbRNA) ont été construits au laboratoire à partir du génome du poliovirus de type 1 et du rotavirus souche WA respectivement. Ces CI, de concentrations connues, sont introduits dans les mix de RT-PCR à la concentration d'environ 10 Unités PCR, en présence d'1 µl de l'extrait d'AN. Les RT-PCR sont ensuite effectuées classiquement. Après amplification, l'absence de bandes sur le gel correspondant au CI est témoin de la persistance d'inhibiteurs de la RT-PCR dans l'échantillon.

Amorces et sondes

Les principaux virus entériques humains ont été recherchés : astrovirus (AV), entérovirus (EV), virus de l'hépatite A virus (VHA), virus Norwalk-like virus (VNL), et rotavirus (RV). Pour cela des amorces spécifiques déjà publiées ont été utilisées comme décrit pour l'étude.

RT-PCR

Les réactions de RT-PCR ont été réalisées comme préconisées par le fournisseur des enzymes de transcription et de Taq polymérase (Perkin-Elmer corp). La transcription a été réalisée pendant 30 min. à 42 °C. Pour la PCR, 40 cycles (94 °C pendant 30 s, 50 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s) ont été effectués. Les produits amplifiés ont été révélés après migration sur gels de polyacrylamide, coloration au bromure d'éthidium et lecture sous UV à l'aide d'un multi-imager (BioRad).

Hybridation

Tous les produits de PCR ont été hybridés par la technique du dot-blot. Brièvement, les produits amplifiés sont dilués dans un tampon (10 Mm Tris-HCl, 1 Mm EDTA), dénaturés pendant 5 min. à 95 °C, et immédiatement placés sur la glace. Ils sont ensuite fixés sur une membrane de nylon (Roche) par aspiration sous vide et exposition aux UV pendant 5 min. Un contrôle positif est introduit sur chaque dot-blot. Les sondes sont marquées en 3' selon la technique du tailing (Roche). Après pré-hybridation pendant 30 min à 50 °C, l'hybridation est réalisée pendant 2 heures à 50 °C. La révélation est ensuite effectuée par chimi-luminescence (Roche) et la lecture est effectuée à l'aide d'un multi-imager (BioRad). Un échantillon est considéré comme positif si un signal est observé après hybridation (quelle que soit l'image vue sur gel).

2.2.3 Résultats

Qualité des Acides Nucléiques

Analyse par DO :

	A : Ultracentrifugation			B : Azote liquide			C : PEG		
	Trizol	Qiagen	Roche	Trizol	Qiagen	Roche	Trizol	Qiagen	Roche
Replicat 1	1,2	1,2	0,6	1,2	1,9	1,8	1,2	1,1	1,3
Replicat 2	1,8	1,3	0,5	1,2	1,9	1,8	1,1	1,5	1,3

Tableau 2 : Estimation de la pureté des acides nucléiques extraits par estimation du rapport des densités optiques lues à 260 et à 280 nm.

On estime que la pureté d'un ARN extrait est satisfaisante si le rapport de DO se situe entre 1,8 et 2,1. Les résultats obtenus ici sont donc variables : par exemple après ultracentrifugation aucune méthode de purification ne donne de résultats vraiment satisfaisants. Par contre, par extraction totale des ARN dans l'azote liquide, les 2 kits commerciaux donnent une bonne pureté.

Persistence d'inhibiteurs :

	A : Ultracentrifugation			B : Azote liquide			C : PEG		
	Trizol	Qiagen	Roche	Trizol	Qiagen	Roche	Trizol	Qiagen	Roche
sbIC	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	-/-	-/+	+/-	-/-
dbIC	+/+	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	-/+	-/-

Tableau 3 : Co-amplification des contrôles internes en présence des AN extraits.

sbIC : Contrôle interne simple brin, db IC : contrôle interne double brin

+ : amplification donc absence d'inhibiteurs, - : absence d'amplification donc présence d'inhibiteurs. résultats donnés pour les 2 répliquats pour chaque méthode.

Les résultats obtenus sont variables selon les méthodes de concentration. Après ultracentrifugation les extractions des AN par la méthode au Trizol ou l'utilisation du kit Qiagen sont efficaces pour éliminer les inhibiteurs. Par contre, après extraction en utilisant le kit Roche, aucune amplification n'est obtenue. Après extraction sur broyat dans l'azote liquide, seul le kit Qiagen permet d'éliminer efficacement les inhibiteurs. Enfin après précipitation par le PEG, les résultats sont assez variables d'un répliquat à l'autre. Après le kit Roche tous les extraits sont inhibés.

Détection des virus

Après ces premiers résultats, les virus n'ont été recherchés que sur les AN obtenus après extraction, en utilisant le Trizol ou le kit Qiagen. En effet, trop d'inhibiteurs persistaient après extraction, en utilisant le kit Roche.

	A : Ultracentrifugation		B : Azote liquide		C : PEG	
	Trizol	Qiagen	Trizol	Qiagen	Trizol	Qiagen
AV	+/+	+/+	+*/+*	+/*	+/+	-/+*
EV	-/-	+/*	-/-	-/-	-/-	-/-
NLV	-/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-
VHA	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
RV	-/+*	+/+	-/-	+/*	-/-	-/-

Tableau 4 : Résultats obtenus sur les répliquats extraits par les différentes méthodes.

+ ou - : résultat positif ou négatif observé sur gel et confirmé par hybridation.

+* : résultat positif obtenu après hybridation (absence de signal sur gel).

Les résultats sont donnés pour les 2 répliquats effectués pour chaque méthode.

- Les astrovirus ont été détectés dans tous les répliquats, quelque soit la méthode utilisée. Aucun signal n'était visible sur gel après traitement à l'azote liquide, la lecture pouvait se faire néanmoins après hybridation.
- Les entérovirus, n'ont été détectés qu'après concentration par ultracentrifugation et extraction en utilisant le kit Qiagen.
- Les virus Norwalk-like n'ont également été détectés qu'après ultracentrifugation, les 2 répliquats étant positifs après le kit Qiagen et un seul après extraction en utilisant le Trizol.
- Les rotavirus ont été détectés directement sur gel, après concentration par ultracentrifugation et extraction avec le kit Qiagen. Cependant après hybridation, un répliquat était positif après ultracentrifugation et extraction au trizol ou extraction totale (azote liquide) en utilisant le kit Qiagen.

2.2.4 Discussion

Selon les critères établis préalablement pour choisir une méthode (absence d'inhibiteurs, sensibilité, reproductibilité), la méthode la plus performante est celle qui associe l'ultracentrifugation et l'extraction par le kit Qiagen :

- *Absence d'inhibiteurs*

Après extraction par le kit Roche, les 6 extraits étaient inhibés pour l'amplification des ARN sb et 4 pour l'amplification des ARN db. Après extraction au Trizol, seuls 3 extraits étaient inhibés pour l'amplification des ARNs b et aucun pour les db. En ce qui concerne le kit Qiagen, un extrait était inhibé pour l'ARNsb et un autre pour l'ARNdb. Donc l'extraction par le kit Rneasy MiniPlant kit est la méthode qui permet d'éliminer le plus efficacement les inhibiteurs.

- *Comparaison réalisée sur 18 répliquats issus d'un même lot.*

Après dissection, les tissus coupés en petits morceaux ont été mélangés avant la répartition en aliquot de 1,5 g. On peut donc espérer une répartition homogène de la contamination. Cependant, compte tenu de notre expérience concernant l'analyse d'échantillons naturellement contaminés, l'analyse a été faite en duplicat pour chaque méthode afin de limiter la variabilité. De même l'hybridation en augmentant la sensibilité permet d'obtenir des résultats plus fiables que la lecture sur gel. Apparemment l'échantillon sélectionné

n'était pas contaminé par du VHA puisque aucune méthode n'a permis de détecter ce virus. Par contre toutes les méthodes ont permis de détecter les AV dans les différents aliquots. Ceci peut être expliqué soit par une concentration importante de virus dans cet échantillon, soit par les caractéristiques de la PCR (petit fragment amplifié de 89 bp qui peut être moins sensible aux inhibiteurs). Ceci montre que la détection des AV n'est pas un bon critère pour sélectionner une méthode. Pour les ARN sb, les critères de sélection seront donc basés sur la détection des EV et des NLV. L'ultracentrifugation associée au kit Qiagen a permis de détecter ces 2 types de virus (sur gel pour les NLV et pour un réplikat en EV) tandis que l'ultracentrifugation associée au Trizol n'a permis la détection que des NLV (sur gel mais pour un seul réplikat), les 2 réplikats étant trouvés négatifs en EV. Toutes les autres méthodes ont donné des résultats négatifs pour la détection de ces 2 types de virus. En ce qui concerne la détection des RV, l'ultracentrifugation associée soit au trizol soit au kit Qiagen a permis de les détecter mais aussi l'extraction directe dans l'azote avec le kit Qiagen.

- *Plus une méthode est simple, plus on peut espérer une bonne reproductibilité.*

Les 3 méthodes de concentration des particules virales avaient donc été sélectionnées dans ce but. De même pour le choix des méthodes d'extraction des AN : le Trizol est une méthode assez simple et les 2 kits commerciaux parfaitement standardisés. La concentration par ultracentrifugation est rapide : environ 2 heures pour l'obtention du culot de particules virales pour 6 échantillons. La concentration par le PEG nécessite à peu près le même temps de préparation. L'extraction par congélation dans l'azote liquide est plus longue. Les 2 kits commerciaux Qiagen ou Roche nécessitent le même temps de procédure (environ 30 min.), la méthode par le Trizol étant un peu plus longue. Compte tenu des résultats expérimentaux et des critères de sélection, la méthode ultracentrifugation et extraction par le kit Qiagen a été sélectionnée pour l'étude.

3 Epidémiologie des gastro-entérites virales dans le secteur de l'étude

3.1 Recrutement des médecins

L'enquête continue a été effectuée d'octobre 1999 à mai 2001. Deux phases de recrutement de médecins ont eu lieu, nécessitant le déplacement de deux personnes dans le golfe du Morbihan. Une première phase de recrutement a eu lieu en octobre 99 et une seconde en mai 2000. Une campagne de relance a également été conduite en décembre 2000 en présence de deux membres de l'Ifremer-Nantes, soit 3 personnes au total. Au total 42 médecins généralistes ont été recrutés sur les communes de Vannes, Séné, Arradon, Saint-Avé, Baden, Auray et Sarzeau (figure 3). Le recrutement de ces médecins s'est fait sur une base volontaire et bénévole avec un taux de participation de 50 %. Au cours de l'étude, 6 médecins ont choisi de sortir du protocole.

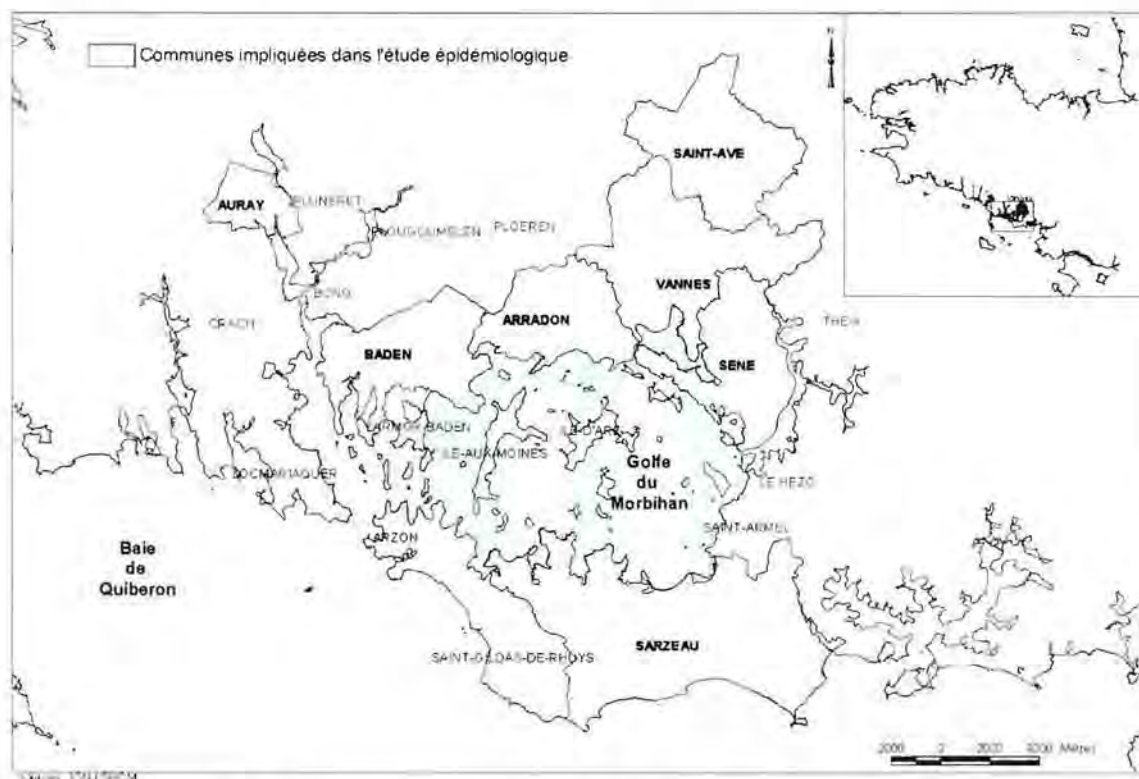


Figure 3 : Communes impliquées dans l'étude épidémiologique.

* cf. « Epidémiologie virale des gastro-entérites dans le golfe du Morbihan. Versant humain de l'étude Liteau. Enquête continue effectuée d'octobre 1999 à septembre 2000 ». R. Brachet, A. Flahault – Inserm 4444 – Réseau sentinelle. Contrat 98.2.436.400 Del.

3.2 Description générale des sujets ayant consulté au 1^{er} septembre 2001

Le critère d'inclusion pour les cas était celui édicté par l'OMS pour la description de diarrhée aiguë (DA) : au moins 3 selles molles ou liquides en 24 heures depuis moins de 14 jours. Le critère d'inclusion des témoins était l'absence, lors de la consultation, de tout signe gastro-intestinal. Les patients participant à l'étude acceptaient bénévolement de répondre à un questionnaire clinique et de remettre un prélèvement de selles à l'un des laboratoires de ville. Ceux-ci ont accepté de réceptionner les prélèvements de selles et de joindre au protocole leurs échantillons de selles afin d'augmenter le nombre total d'échantillons. L'ensemble des prélèvements était ensuite acheminé par une société de transport privée au laboratoire de virologie du CHU de Dijon.

Le nombre total de sujets inclus (fiches cliniques reçues) depuis octobre 1999² était de 214 cas et 42 témoins (figure 3.1). Parmi les témoins, 12 ont été inclus en 1999, 23 en 2000 et 7 entre janvier et août 2001. Parmi les cas et témoins inclus, la classe d'âge la plus représentée était celle des 16-65 ans en notant toutefois que c'est la classe également la plus large en nombre d'années (figure 3.2).

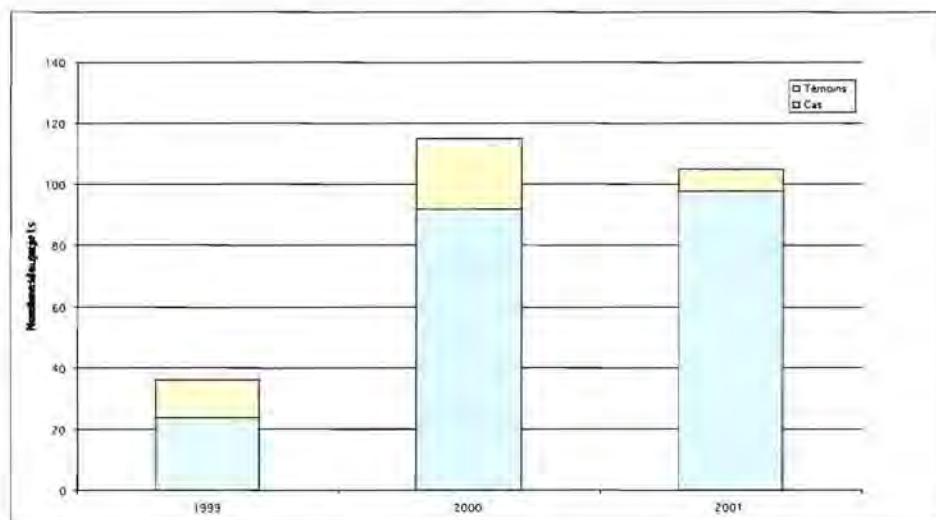


Figure 3.1 : Répartition des cas et témoins sur la période d'étude.

² Après recouplement des fiches cliniques reçues au réseau et des selles identifiées à Dijon comme provenant des médecins généralistes participant à l'étude. Ne sont pas prises en compte les selles issues des laboratoires et de l'hôpital de Vannes.

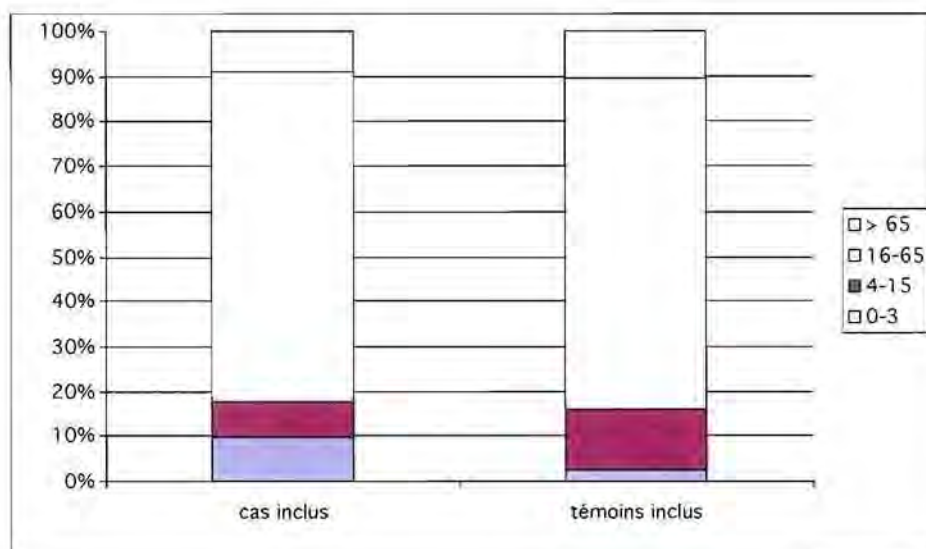


Figure 3.2 : Répartition en classes d'âges des sujets inclus.

3.2.1 Eléments cliniques

Les données qui suivent ne tiennent pas compte du statut des cas vis-à-vis de l'analyse virologique des selles.

Description de la diarrhée

Environ 55 % des cas ont consulté dès le 1^{er} jour de gastro-entérite et 5 % après le 14^e jour. Par ailleurs, plus de 80 % des cas présentaient au moins 3 selles molles ou liquides par jour.

Chez 85 % des cas les selles étaient liquides avec du sang dans 1 % des selles et des glaires dans 6 %.

Signes associés

- Des nausées ou vomissements étaient présents chez 70 % des cas quelque soit la classe d'âge.
- Des douleurs abdominales étaient signalées pour 50 % des 0-3 ans, 93 % des 4-15 ans et 80 % des plus de 16 ans ($P = 0.01$). Les jeunes enfants étaient donc les moins touchés par ce type de symptômes.
- La fièvre était essentiellement répandue parmi les 0-3 ans avec 60 % de cette classe d'âge contre 26 % des 4-65 ans et 12 % des > 65 ans ($P = 0.008$).
- Des difficultés respiratoires étaient rapportées par 44 % des 0-3 ans avec cette fois une décroissance régulière de 10 % d'une classe d'âge à une autre (4-15 ; 16-65 ; > 65 ans).

3.2.2 Facteurs de risques

L'association avec l'un des facteurs de risques potentiels suivants a été renseignée pour les 10 jours précédant la consultation.

- **Consommation de coquillages et d'eau du robinet**

Les coquillages ont constitué un facteur de risque significatif ($P = 0,004$). Leur consommation a été rapportée par 51 % (97/189) des cas et 26 % des témoins (10/38). La consommation d'eau du robinet quant à elle n'était pas associée à la DA (43 % des cas vs 54 % des témoins, $P > 0,05$).

- **Contage** : Aucune association significative avec un contact récent avec un enfant de moins de 3 ans (44 % des cas et 41 % des témoins, $P > 0,05$ NS) ni avec un cas de diarrhée aiguë dans l'entourage du cas (33 % des cas vs 36 % des témoins, $P > 0,05$ NS) n'a été détectée.
- **Antibiotiques** : La prise d'antibiotiques n'a pas constitué un facteur de risque (11 % des cas –22/190- vs 5 % des témoins –2/38- $P > 0,05$ NS)

3.2.3 Prise en charge de la diarrhée aiguë

Un traitement par réhydratation orale a été prescrit pour 14 cas. Onze cas ont reçu un traitement par un anti-diarrhéique, et 6 par un antiseptique.

3.3 Epidémiologie

Les données d'épidémiologie clinique en terme de symptômes et de facteurs de risques associés à chaque virus détecté montrent les éléments suivants :

- Le taux d'infection (par au moins 1 virus) était de 40 % parmi les cas contre 16 % parmi les témoins ($P = 0,02$).
- Parmi les 4 classes d'âges de sujets, 16 % étaient âgés de 0-3 ans, 12 % de 4-15 ans, 6 % de 16-65 ans et 6 % avaient plus de 65 ans ($P = 0,09$ NS).

3.3.1 Description des signes cliniques selon le statut infectieux des cas

Description de la diarrhée

Globalement parmi les 39 cas positifs (pour au moins un virus), 6 cas ont consulté. Ils avaient un nombre de selles inférieur à 3 par jour.

Concernant l'aspect des selles, des selles liquides étaient plus fréquentes chez les cas infectés par au moins un virus par rapport aux cas sans virus détecté (33/37 cas positifs et 14/63 cas négatifs ; $P = 0,17$). La présence de sang ou de glaires était très rare (12 selles parmi 100 selles analysées et identifiées cliniquement par une fiche).

Ancienneté de la diarrhée au moment de la consultation

Globalement, la majorité des sujets positifs pour au moins un virus ont consulté leur médecin dans les premières 24 heures (63 %), 34 % ont consulté dans la 1^{ère} semaine de gastro-entérite et 3 % durant la 2^e semaine.

Les cas négatifs ont en moyenne consulté plus tardivement avec 49 % des visites lors de la 2^e semaine et 7 % (4/59) après 14 jours ($P = 0.006$).

Symptômes associés

1. Des nausées ou vomissements ont été rapportés par 73 % des cas positifs et pour 55 % des cas négatifs ($P = 0.06$ NS).
2. Des douleurs abdominales ont été aussi souvent rapportées par des cas positifs (76 %) que pour des cas négatifs (75 %).
3. La présence de fièvre a été rapportée par 47 % des cas positifs contre 26 % des cas négatifs ($P = 0.03$).
4. Des difficultés respiratoires ont été rapportées par 40 % des cas positifs et pour 20 % des cas négatifs ($P = 0.03$).

Prise en charge de la diarrhée selon le statut infectieux

Une ré-hydratation orale a été prescrite à 71 % des cas positifs et à 66 % des cas négatifs ($P > 0.05$, NS). Il n'y a pas eu plus de prescriptions de traitements spécifiques (anti-diarrhéiques, antiseptiques ou antibiotiques) chez les cas révélés positifs pour un virus que chez les cas pour lesquels aucun virus n'a été identifié ($P > 0.05$, NS).

En revanche, les diarrhées virales (au moins un virus identifié) ont plus souvent nécessité un arrêt de travail par rapport aux diarrhées sans virus identifiés (55 % contre 22 % $P = 0.002$).

3.3.2 Facteurs de risques associés au statut infectieux

Antibiotiques

La prise d'antibiotiques dans les 10 jours précédant la consultation n'a pas constitué un facteur de risque de diarrhée virale. Parmi les 42 cas positifs ayant renseigné cette variable, 4 ont pris des antibiotiques, soit 9 % contre 12 cas négatifs en virus parmi 82, soit 15 % ($P > 0.05$, NS).

Coquillages et eau du robinet

La consommation de coquillages n'était pas significativement associée à la présence d'un virus dans les selles (52 % des cas positifs contre 44 % des cas négatifs ; $P > 0.05$ NS). De même que l'eau du robinet qui a été rapportée pour 47 % des cas positifs et 51 % des cas négatifs ($P > 0.05$).

Contage

Un contact avec un enfant de moins de 3 ans était significativement plus fréquent chez les cas positifs (55 %) que chez les cas négatifs en virus (30 %), $P = 0.007$. En revanche, un contact avec un cas de diarrhée aiguë dans l'entourage du cas, n'a pas constitué un facteur de risque supplémentaire d'avoir une diarrhée virale ; du moins pour ce qui est des virus identifiés dans cette étude ($P > 0.05$ NS)

3.4 Discussion

Le but de ce volet humain de LITEAU, en plus des comparaisons de souches virales entre population humaine et environnement, était d'établir un profil épidémiologique pour chacun des virus tant en termes de symptômes associés que de facteurs de risque. Concernant le 1^{er} point, seules la fièvre et les difficultés respiratoires ont été significativement plus souvent rapportées chez les cas infectés par au moins un virus.

Pour ce qui est des facteurs de risque, la consommation de coquillages était plus fréquente chez les cas de diarrhée aiguë, mais n'a pas constitué un facteur de risque spécifique aux diarrhées virales. En revanche, la notion de contagé par un enfant d'âge < 3 ans était significativement associée à une diarrhée virale. Par ailleurs, les diarrhées virales ont nécessité plus souvent un arrêt de travail mais sans qu'un type de virus y soit plus associé qu'un autre.

Il est important de noter les *biais intervenus* d'une part dans l'inclusion des sujets durant l'hiver 99/2000 ainsi que dans la sélection des témoins. En effet, le premier hiver de l'étude (99/00) la majorité des médecins nous ont précisé avoir délaissé le protocole du fait d'une très forte épidémie de grippe ayant sévi à cette époque (données confirmées par le réseau sentinelles), et ce malgré des relances téléphoniques régulières. De ce fait, un manque important de données a fortement handicapé l'analyse épidémiologique des cas de diarrhée durant le 1^{er} hiver de l'étude. Par ailleurs la sélection des témoins s'est avérée très délicate à entreprendre au dire des médecins, tant de la part de ceux-ci qui ressentaient des difficultés à demander un prélèvement de selles à des témoins, que de la part des témoins qui bien qu'ayant répondu au questionnaire, n'envoyaient aucun échantillon de selles à Dijon.

De nombreuses relances de motivation ont été effectuées auprès des médecins afin d'encourager à la sélection des témoins même sans un total appariement en âge sur les cas inclus. La comparaison se serait alors faite 'à posteriori' mais sur des échantillons plus importants, ce qui aurait fourni une meilleure précision statistique.

Globalement, il ressort de cette étude et des résultats épidémiologiques, qu'il est nécessaire de réunir l'ensemble des pré-requis à une analyse statistique rigoureuse avant et durant toute la durée de l'étude. Il est en effet indispensable de disposer de données épidémiologiques chez des témoins, tant pour assurer des comparaisons fiables et précises entre facteurs de risque, que pour estimer la diffusion et le portage des virus dans la population générale. La notion de risque relatif ou d'Odds-Ratio lié à un agent pathogène

est en effet conditionnelle d'une part, à la présence d'échantillons de cas et de témoins appariés (en âge en localisation géographique, voir en sexe pour certaines pathologies), et d'autre part, à des tailles d'échantillons relativement importantes afin d'avoir une sensibilité de tests statistiques optimale.

En définitive, et dans le cas où d'autres études de ce type seraient envisagées, il sera utile de tirer les conséquences du déroulement de cette étude afin d'améliorer au maximum le protocole et son application.

3.5 Etude de la contamination des selles *

Deux cent quatre vingt une selles ont été réceptionnées par le laboratoire de Dijon : 149 provenaient de patients ayant consulté un médecin généraliste, 127 ont été envoyées par les laboratoires participant à notre étude et pour 5 selles, l'origine du prélèvement n'a pu être identifiée (aucune information sur le pot de prélèvement).

3.5.1 Etude cas - témoins (population consultant un médecin généraliste)

Vingt-quatre médecins généralistes, principalement situés à Vannes (figure 3.4), ont participé activement à notre étude et permis le recueil de 149 échantillons de selles provenant d'une part de 121 patients présentant des signes de gastro-entérite (**cas**) et de 27 témoins (patients consultant pour une autre pathologie et n'ayant pas eu de diarrhée durant les 15 jours précédant la consultation). Enfin, pour un patient, l'origine cas - témoin n'a pas été précisée (figure 3.3).

D'autres prélèvements ont été obtenus grâce à des laboratoires d'analyses médicales de ville (selles liquides ou semi-liquides adressées aux laboratoires pour analyse) ou grâce au laboratoire de Microbiologie du centre hospitalier de Vannes (patients consultant à l'hôpital pour gastro-entérite aiguë). Bien entendu, ces prélèvements n'ont pas été comptabilisés avec ceux obtenus par les médecins pour l'étude de la prévalence des différents virus dans la population consultant en médecine générale.

* Cf. rapport janvier 2002 . Programme Liteau contamination virale et indicateur de risque. Rapport final. Bon F., Pothier P., Kohli E., Université de Bourgogne, CHU Dijon, contrats 01.2436403 ; 02.2436402 ; 99.24366401.

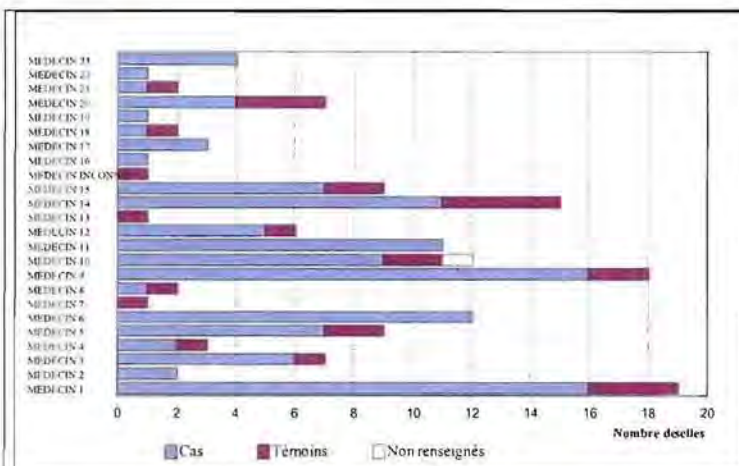


Figure 3.3 Nombre de patients inclus par les médecins et pour lesquels un prélèvement de selles a été reçu

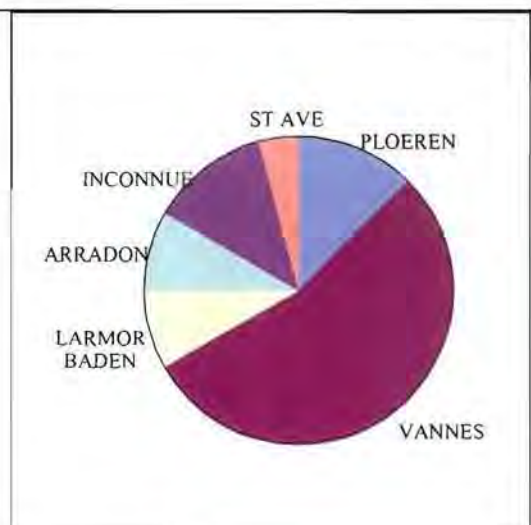


Figure 3.4 : Localisation des médecins participant à l'étude

3.5.2 Prélèvements collectés par les laboratoires

Outre le laboratoire de Microbiologie du centre hospitalier de Vannes qui a envoyé 84 échantillons de selles, 5 laboratoires d'analyses médicales de ville ont permis de collecter 43 selles diarrhéiques (figure 3.4) :

- Laboratoire Chaillet – Kervadec, rue Renaudot, 56 000 Vannes
- Laboratoire Bonnet, 6 avenue V. Hugo, 56 000 Vannes
- Laboratoire Desplanques – Vermond, 63 rue A. Defforges, 56000 Vannes
- Laboratoire Cini et Le Roux, 4 rue Irlande, 56400 Auray
- Laboratoire Lévêque Morlat, 19 rue Keriolet, 56400 Auray

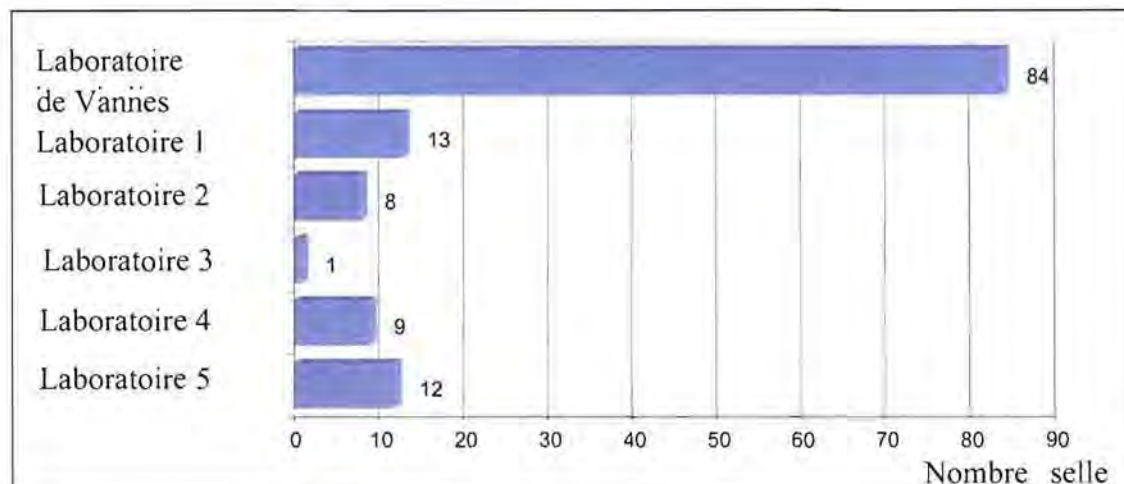


Figure 3.5 : Nombre d'échantillons reçus des laboratoires d'analyses médicales.

3.5.3 Age des patients

L'âge des patients se répartit entre 0 et 74 ans. Ceux-ci ont été classés selon 6 tranches d'âge [0, 2 ans], [2, 5 ans], [5, 15 ans], [15, 65 ans], ≥ 65 ans et une tranche 'inconnu' pour les patients dont l'âge n'a pas été donné (figure 3.4). L'âge a été renseigné sur le pot à prélèvement pour 238 échantillons (sur 281) sur toute l'étude et pour 142 (sur 149) pour les patients de médecine générale.

Le recrutement a été majoritairement réalisé chez des patients entre 15 et 65 ans pour les prélèvements cas-témoins (figure 3.6) et ceux récoltés par les laboratoires de ville. Par contre, pour le laboratoire de l'hôpital de Vannes, seules des selles d'enfants ont été prélevées dans les tranches d'âge situées entre 2 mois et 15 ans, avec une majorité de prélèvements chez des enfants de moins de 2 ans (58/84 ; 69 %) (figure 3.7).

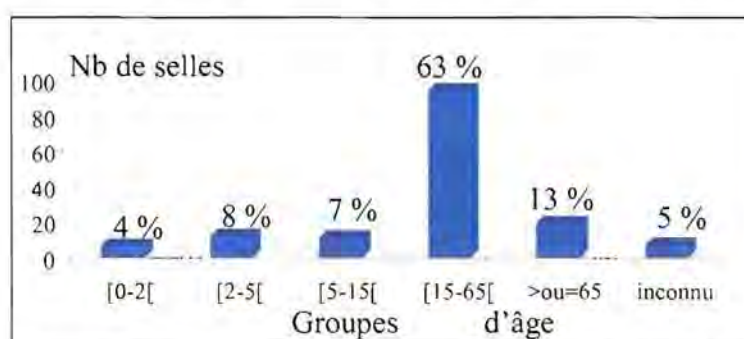


Figure 3.6 Répartition des patients inclus par les médecins par tranches d'âge

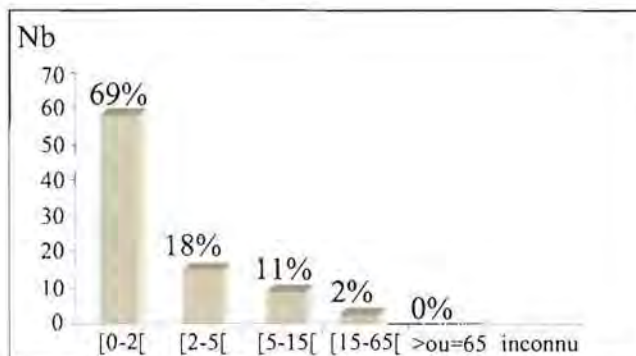


Figure 3.7 : Répartition des patients inclus par le laboratoire hospitalier de Vannes par tranches d'âge

3.5.4 Répartition des prélèvements durant l'étude

La majorité des prélèvements est parvenue après mai 2000, date à laquelle les médecins avaient été de nouveau motivés. Par ailleurs, 44,5 % des prélèvements ont été recueillis durant les pics hivernaux, à savoir entre novembre et février (figure 3.8). Par contre, la période d'inclusion des échantillons des laboratoires de ville s'est étendue majoritairement hors de cette période puisque 23 % des selles seulement ont été collectées durant le pic hivernal.

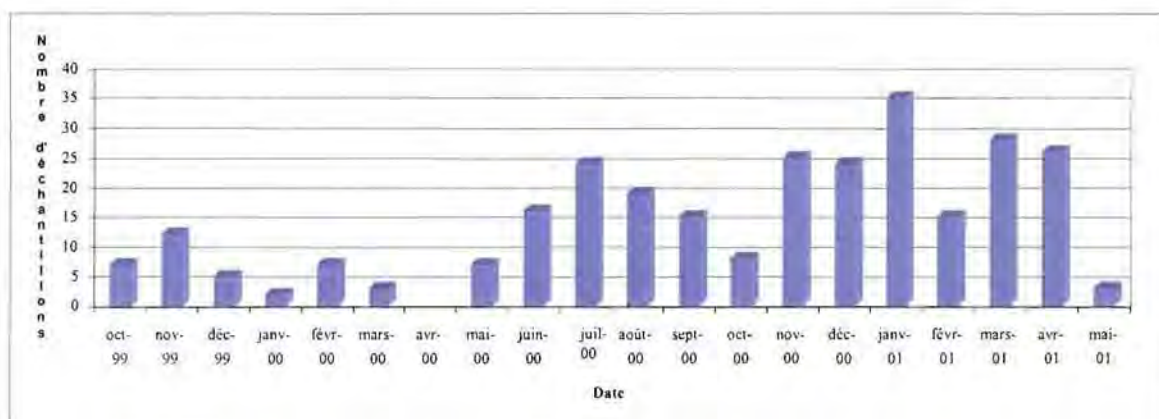


Figure 3.8 : Répartition temporelle des échantillons collectés au cours de l'étude

3.6 Analyse virologique des selles

3.6.1 Prévalence des différents virus dans les selles

3.6.1.1 Résultats pour l'ensemble de l'étude

Les résultats de l'analyse virologique des selles ont été compilés dans le tableau 1.

- La recherche de **rotavirus du groupe C** a été réalisée pour 148 selles sur les 281 analysées (52 %) : aucun résultat positif n'a été observé .
- Par ailleurs, 82 échantillons négatifs pour le **dépistage des astrovirus** par technique immunoenzymatique ont été repris et testés par RT-PCR selon la technique utilisée pour le typage et décrite par Noël *et al.* (1995). Tous se sont avérés négatifs.
- Au cours d'une épidémie de gastro-entérite associée à la consommation d'huîtres durant l'hiver 2000-01, une souche **NLV du génogroupe I et proche de la souche Norwalk** avait été mise en évidence par amplification par RT-PCR à l'aide d'amorces SRI1-2 ciblant le gène de la capsid et décrites par Häfliger *et al.* (1997), alors qu'aucune amplification n'était réalisable avec les amorces utilisées en routine situées sur le gène de la polymérase.

Afin de vérifier si de telles souches n'avaient pas échappé à nos techniques de dépistage, 62 selles précédemment diagnostiquées calicivirus négatives ou douteuses ont été testées avec les amorces SRI1-2.

Après RT-PCR, 10 souches sur les 62 ont été trouvées positives. Ces 10 selles ont été réextraites et testées à nouveau par RT-PCR du gène de la polymérase. Finalement, 5 selles se sont avérées faiblement positives et 5 négatives. Ces 10 souches ont été comptabilisées avec l'ensemble des souches de calicivirus.

Origine	Adénovirus 40-41	Astrovirus	Rotavirus	Calicivirus	Entérovirus	VHA	Co-infections	Selles virus négatives	Selles virus positives
Médecins									
Cas (n=121)	2	1	13 (2)*	28 (3)*	8 (3)*	0	4	73 (60 %)	48 (40 %)
Témoins (n=27)	0	0	0	3	0	0	0	24 (89 %)	3 (11 %)
Inconnu (n=1)	1	0	0	0	0	0	0	0	1
Laboratoire CH Vannes N=84	0	0	20	18	5	0	0	41 (49 %)	43 (51%)
Laboratoires de ville n=43	0	0	0	2	0	0	0	41 (95 %)	2 (5 %)
Inconnue N=5	0	0	1	0	0	0	0	4 (80 %)	1 (20 %)
Total LITEALI N=281	3	1	34 (2)*	51 (3)*	13 (3)*	0	4	183 (65 %)	98 (35 %)

* (nombre de co-infections avec ce virus)

Tableau 4.1 : Répartition des différents virus recherchés parmi la totalité des 281 prélèvements reçus au cours de l'étude.

3.6.1.2 Etude cas – témoins

Les prélèvements de selles des patients ayant consulté un médecin généraliste se répartissent comme suit : 121 cas, 27 témoins auxquels il faut ajouter un prélèvement non renseigné. Ce dernier s'est avéré positif à adénovirus 40 et 41.

Par ailleurs, la grande majorité des prélèvements (76 %) provient d'adultes ou de grands enfants (figure 3.9).

Parmi les **121 cas**, l'analyse virologique a été trouvée positive pour au moins 1 virus pour 48 d'entre eux (40 %) (figures 3.8, 3.11 et tableau 4.1). Les calicivirus et les rotavirus ont été trouvés prédominants (23 et 11 % des cas respectivement). Au contraire, les astrovirus et les adénovirus 40 et 41 ont été rarement détectés (moins de 2 % des cas). Pour 4 cas, une co-infection virale a été observée mettant en jeu soit un entérovirus associé à un calicivirus (2 cas), ou à un rotavirus (1 cas) ou encore un rotavirus associé à un calicivirus (1 cas).

Parmi les **27 témoins**, seule la recherche de calicivirus a été trouvée positive pour 3 (11 %) d'entre eux. Aucun autre virus n'a été détecté (figures 3.8 – 3.10 et tableau 3.1).

Nombre d'échantillons

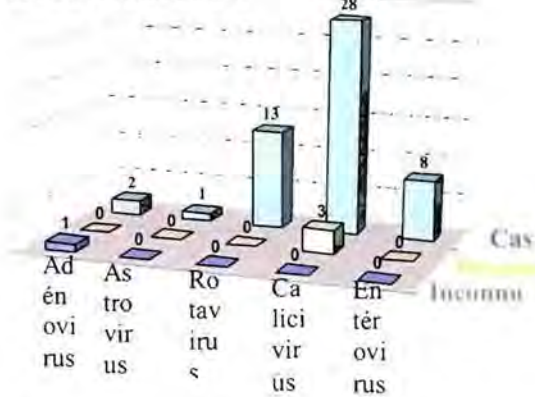


Figure 3.8 : Répartition des différents virus dans les prélèvements des patients inclus par les médecins

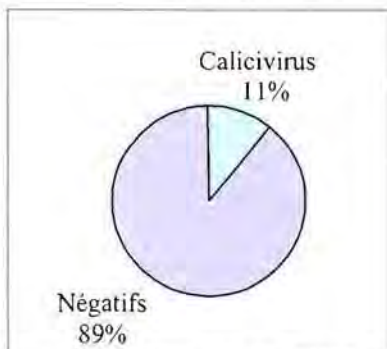


Figure 3.10 : Fréquence des différents virus parmi les témoins

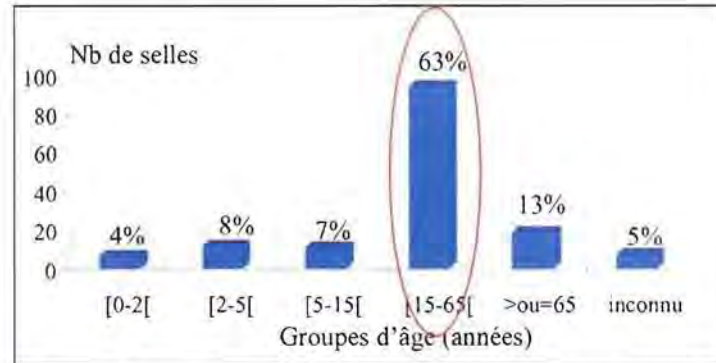


Figure 3.9 : Répartition des patients inclus par les médecins selon les tranches d'âge

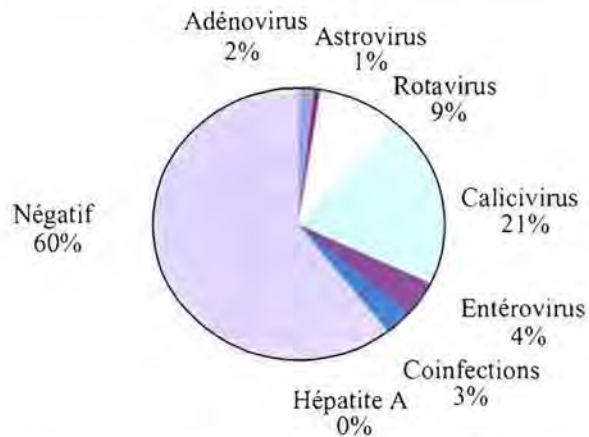


Figure 3.11 : Fréquence des différents virus parmi les cas

3.6.1.3 Prélèvements inclus par le laboratoire du centre hospitalier de Vannes

Plus de la moitié des prélèvements inclus par le laboratoire de l'hôpital de Vannes (43/84, 51 %) contient des virus, parmi lesquels 20 rotavirus du groupe A (24 %), 18 calicivirus (21 %) et 5 entérovirus (6 %) (figure 3.12). Pour rappel, les prélèvements proviennent essentiellement d'enfants de moins de 2 ans présentant une gastro-entérite (figure 3.13).

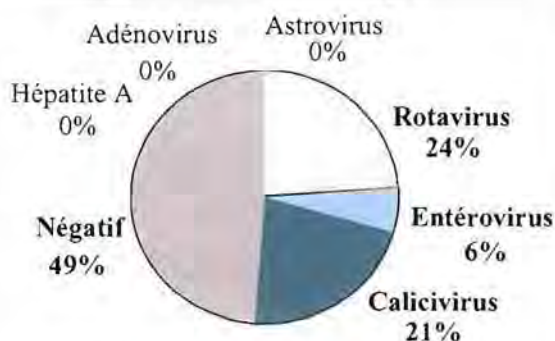


Figure 3.12 : Fréquence des différents virus dans les prélèvements du centre hospitalier de Vannes

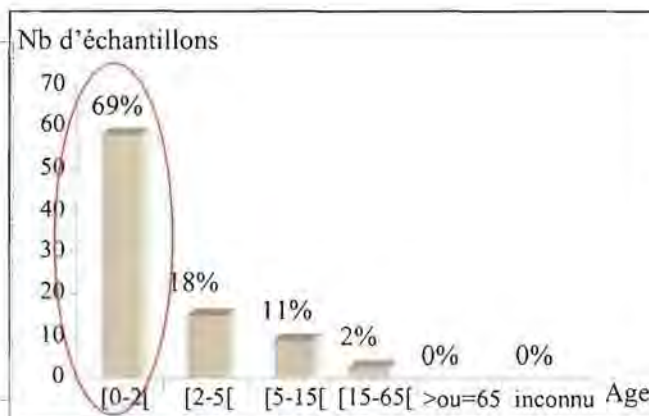


Figure 3.13 : Répartition des patients inclus par le laboratoire hospitalier de Vannes en fonction des tranches d'âge

3.6.1.4 Prélèvements inclus par les laboratoires d'analyses médicales

L'analyse des selles diarrhéiques collectées par les laboratoires d'analyses médicales de ville n'a permis la mise en évidence que de 2 calicivirus sur les 43 prélèvements recueillis (figure 3.14). Les selles incluses sont des selles ayant un aspect liquide ou semi-liquide. Pour rappel, la grande majorité des prélèvements a été réalisée hors du pic hivernal.

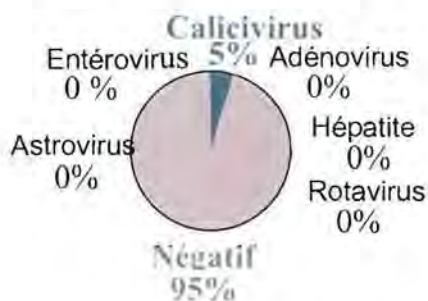


Figure 3.14 : Fréquence des différents virus dans les prélèvements des laboratoires d'analyses médicales.

3.6.1.5 Prélèvements d'origine inconnue

Parmi ces 5 prélèvements, il a été isolé une souche de rotavirus du groupe A (Tableau I).

3.6.2 Répartition des différents virus selon l'âge des patients

D'une façon globale, la présence d'au moins un des virus recherchés a été trouvée positive chez 58,5 ; 40,7 ; 40,0 ; 32,7 et 26,3 % des patients dans les 5 tranches d'âge [0-2 ans], [2-5], [5-15], [15-65], ≥ 65 ans respectivement (figure 3.15).

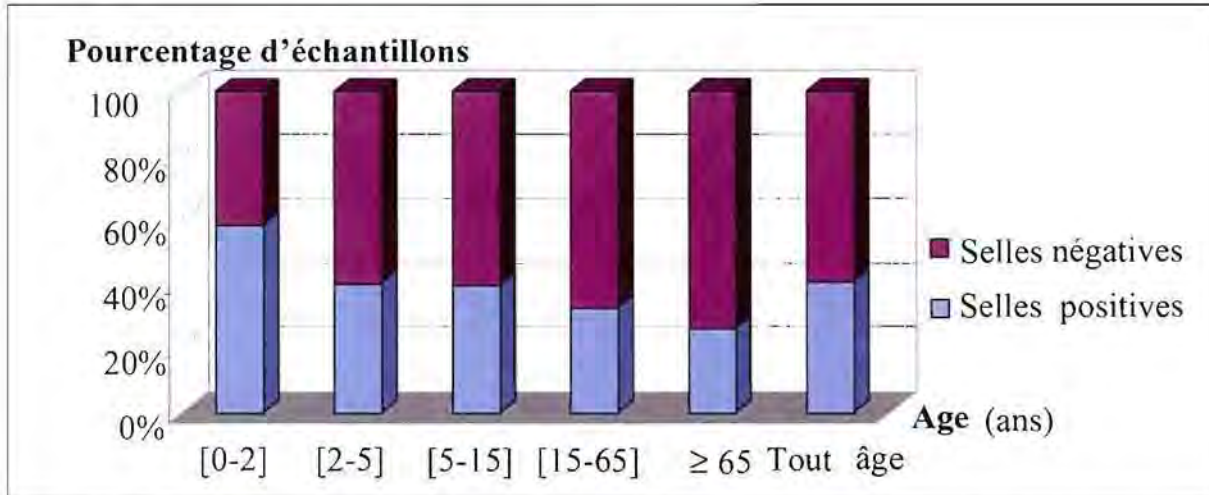


Figure 3.15 : Détection virale positive selon les tranches d'âge tous types de prélèvements confondus.

Les infections à **rotavirus** et à **calicivirus** ont été observées dans toutes les tranches d'âge (figure 3.16). Si l'on considère les 5 tranches d'âge par ordre croissant, la fréquence des infections à calicivirus est respectivement de 23, 18, 15, 21 et 16 % et pour le rotavirus, de 32, 7, 10, 4 et 10 %.

Les entérovirus n'ont pas été retrouvés dans les selles d'adultes de plus de 65 ans.

Enfin, dans cette étude la seule souche d'astrovirus isolée a été retrouvée dans les selles d'un adulte de 47 ans.

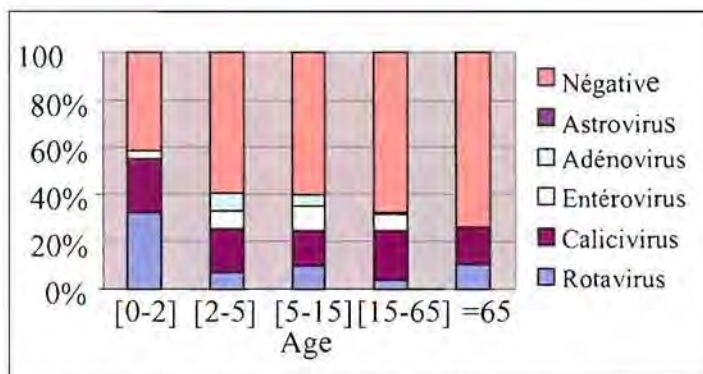


Figure 3.16 : Répartition des différents virus par tranche d'âge

3.6.3 Infection virale et aspect des selles

L'aspect plus ou moins liquide des selles n'a pas pu être corrélé avec la présence ou non de virus dans les selles (figure 3.17).

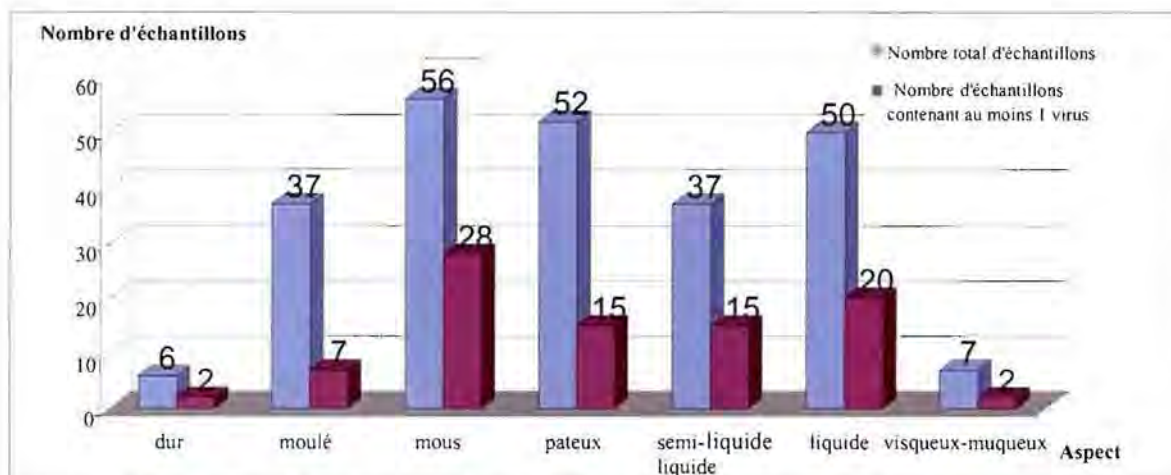


Figure 3.17 : Aspect des selles et présence de virus

3.7 Caractérisation des souches d'astrovirus, rotavirus, calicivirus et entérovirus

3.7.1 Typage des souches d'astrovirus

Une seule souche d'astrovirus a été mise en évidence sur les 281 prélèvements de l'étude. Les selles prélevées début mai 2001 proviennent d'un(e) patient(e) de 47 ans présentant des signes de gastro-entérite et ayant consulté un médecin généraliste de Vannes. La souche (L274) typée par séquençage d'une région de l'ORF2 est un astrovirus humain de type 1.

3.7.2 Typage moléculaire des souches de rotavirus

Durant la période de l'étude, une co-circulation de différentes souches de rotavirus a été observée. En effet, parmi les 34 souches de rotavirus détectées, ont été retrouvées 22 souches P[8] ; G1, 6 souches P[4] ; G2, 2 souches P[6] ; G4 et 1 souche P[8] ; G9 (figure 3.18). Par ailleurs, le gène 9 de 2 souches de génotype P[4] n'a pas pu être amplifié ; de même qu'une souche significativement positive en ELISA n'a pas été amplifiée par RT-PCR ni par la technique décrite par Gouvea *et al.* (1990), ni par celle décrite par Gentsch *et al.* (1992).

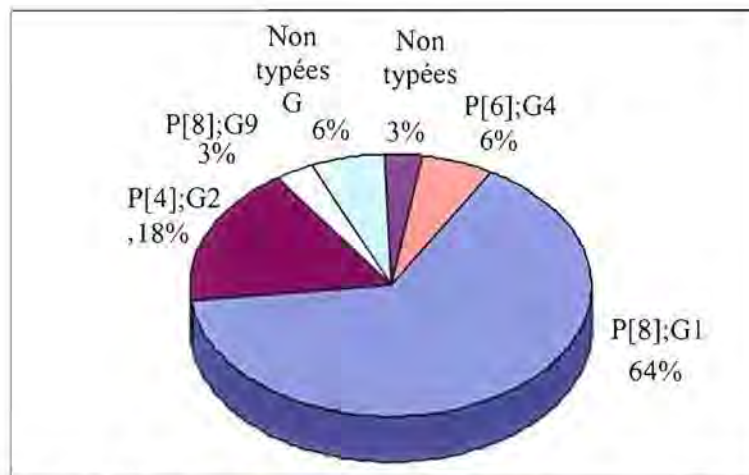


Figure 3.18 : Répartition des différents types de rotavirus du groupe A

3.7.3 Caractérisation moléculaire des souches de calicivirus

3.7.3.1 Répartition des 51 souches détectées durant l'étude.

Les calicivirus présentent une grande variabilité génétique et antigénique. Les souches humaines appartiennent aux genres Norwalk-like et Sapporo-like. Chacun de ces 2 genres est en outre subdivisé en 2 génogroupes (génogroupes I et II) à l'intérieur desquels on distingue des génotypes (Vinje *et al.*, 2000) ou clusters (Ando *et al.*, 2000).

Parmi les 51 souches détectées, une souche (2 %) appartenant au **genre Sapporo-like**, proche du virus London a été retrouvée chez un enfant de 33 mois. Le **genre Norwalk-like** est de loin **le plus représenté** (98 % des souches) avec une proportion de 2/3 de souches du génogroupe II (66 % des souches détectées) et de 1/3 (32 %) de souches du génogroupe I (figures 3.19 et 3.20).

Les 3 souches isolées chez **les témoins** (personne ne présentant pas de signes cliniques de GEA) se répartissent comme suit : une souche Saratoga-like (NLV GGI) (patient de 34 ans), une souche Snow-Mountain-like (NLV GGII) (56 ans) et une souche nouveau variant (NLV GGII) (4 ans).

La répartition des souches Norwalk-like entre les enfants et les adultes semblerait différente. En effet, chez les enfants de moins de 5 ans, 17/20 souches (85 %) appartiennent au génogroupe II versus 13/26 (50 %) chez les adultes (plus de 15 ans). En d'autres termes, 13/16 (81 %) des souches NLV GGI ont été détectées chez des adultes.

La figure 3.19 montre la répartition des différentes souches au cours du temps. Comme pour les rotavirus, il a été observé une co-circulation de souches.

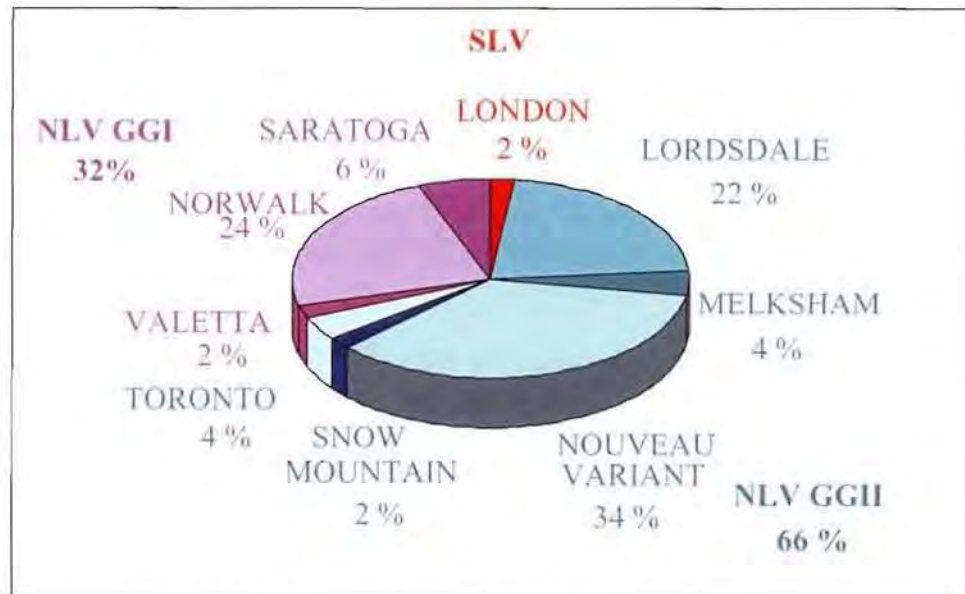


Figure 3.19 : Distribution des différentes souches de calicivirus au cours de l'étude, tous prélèvements confondus

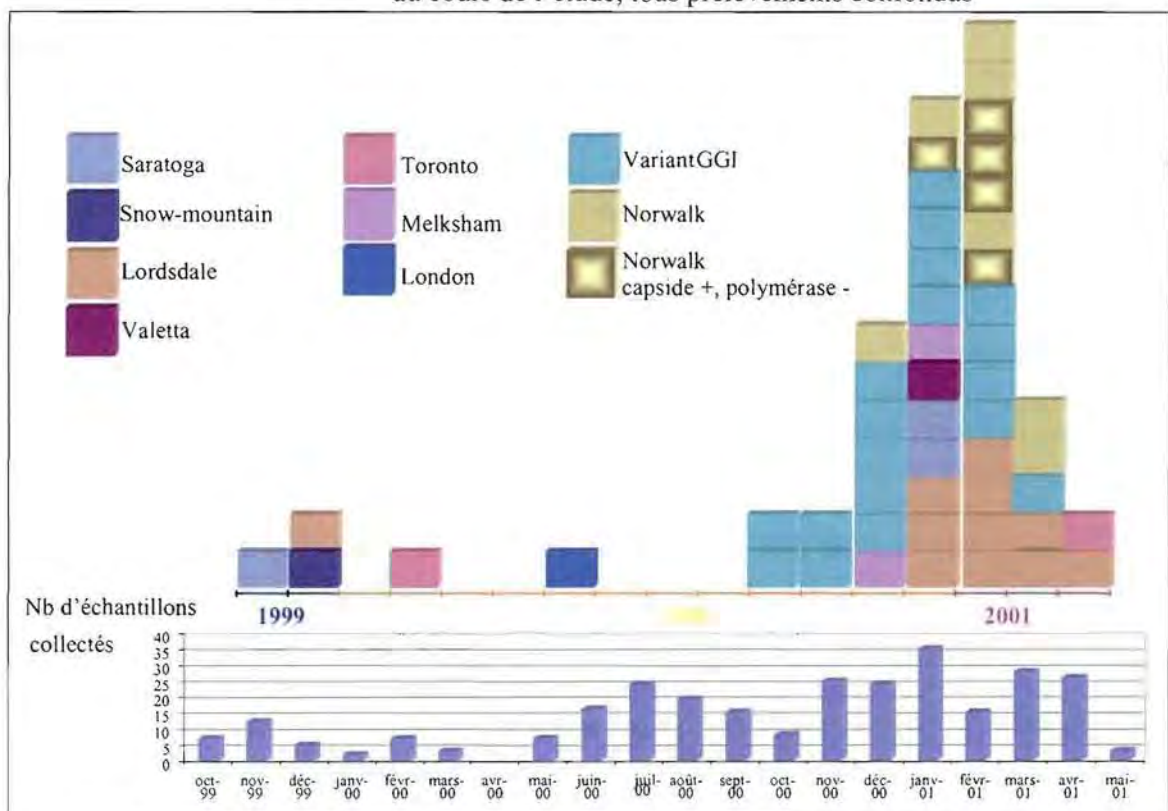


Figure 3.20 : Répartition des différentes souches de calicivirus au cours du temps

3.7.3.2 Caractérisation de souches particulières (figures 3.19, 3.21, 3.22 et 3.23)

Lors de cette étude, il a été observé des souches présentant des particularités moléculaires posant des problèmes pour leur dépistage (souches proches du virus Norwalk) ou leur classification (variants génogroupe II). Ces souches ont clairement émergé au cours de l'hiver 2000-2001 et représentent au total 55 % des souches de calicivirus détectées au cours de l'étude.

- Parmi les 12 souches proches du virus Norwalk (24 % des souches), 10 soit 20 % des souches de calicivirus ont posé des problèmes de détection, 5 ont été difficilement amplifiées et 5 autres, soit 10 % des souches de calicivirus détectées, n'ont pu l'être avec les amorces classiquement utilisées (région codant l'ARN polymérase). Des essais infructueux ont par ailleurs été réalisés : températures d'hybridation plus basses pour augmenter la sensibilité aux dépens de la spécificité, PCR nichée, utilisation d'autres amorces spécifiques du génogroupe I précédemment décrites (NVp289-290, Jiang *et al.*, 1999). En fait, ces souches ont été détectées par amplification génique d'une région codant la capsid avec les amorces décrites par Häfliger *et al.* (1997). Elles présentent environ 90 % d'identité nucléotidique sur cette région avec la souche Norwalk et 96,7 % d'identité en acides aminés (Genbank n° d'accèsion M87661). Par ailleurs, le gène codant pour l'hélicase de 3 souches 'capsid+', polymérase- présente lui aussi environ 90 % d'identité en nucléotides avec la souche Norwalk. Ces souches posent un problème diagnostique du fait qu'elles sont mal ou non amplifiées par les méthodes d'amplification génique classiquement utilisées. D'autres essais utilisant de nouvelles amorces (Yuen *et al.*, 2001) sont en cours.
- Par ailleurs, deux nouveaux variants appartenant au genre Norwalk-like, génogroupe II ont été trouvés dans 18 prélèvements, représentant 35 % des souches de calicivirus détectées au cours de l'étude. Ces souches présentent une forte identité (supérieure à 98 %) entre elles au niveau de la région codant l'ARN polymérase et seulement 85 % d'identité avec la souche Hawaii, souche prototype la plus proche (Genbank n° d'accèsion U07611). Dans le but de déterminer si ces souches appartiennent à un nouveau groupe, 11 d'entre elles ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée par séquençage de la région 5' codant la protéine de capsid. Sur la base de la séquence de ce gène, deux groupes présentant seulement 74 % d'identité entre eux ont été observés : un groupe de 10 souches proches de la souche Arg320 (Genbank n° d'accèsion AF190817) de génotype Mexico et une souche proche de la souche Grimsby (97,8 % d'identité en nucléotides) (Genbank n° d'accèsion AJ004864) de génotype Lordsdale.

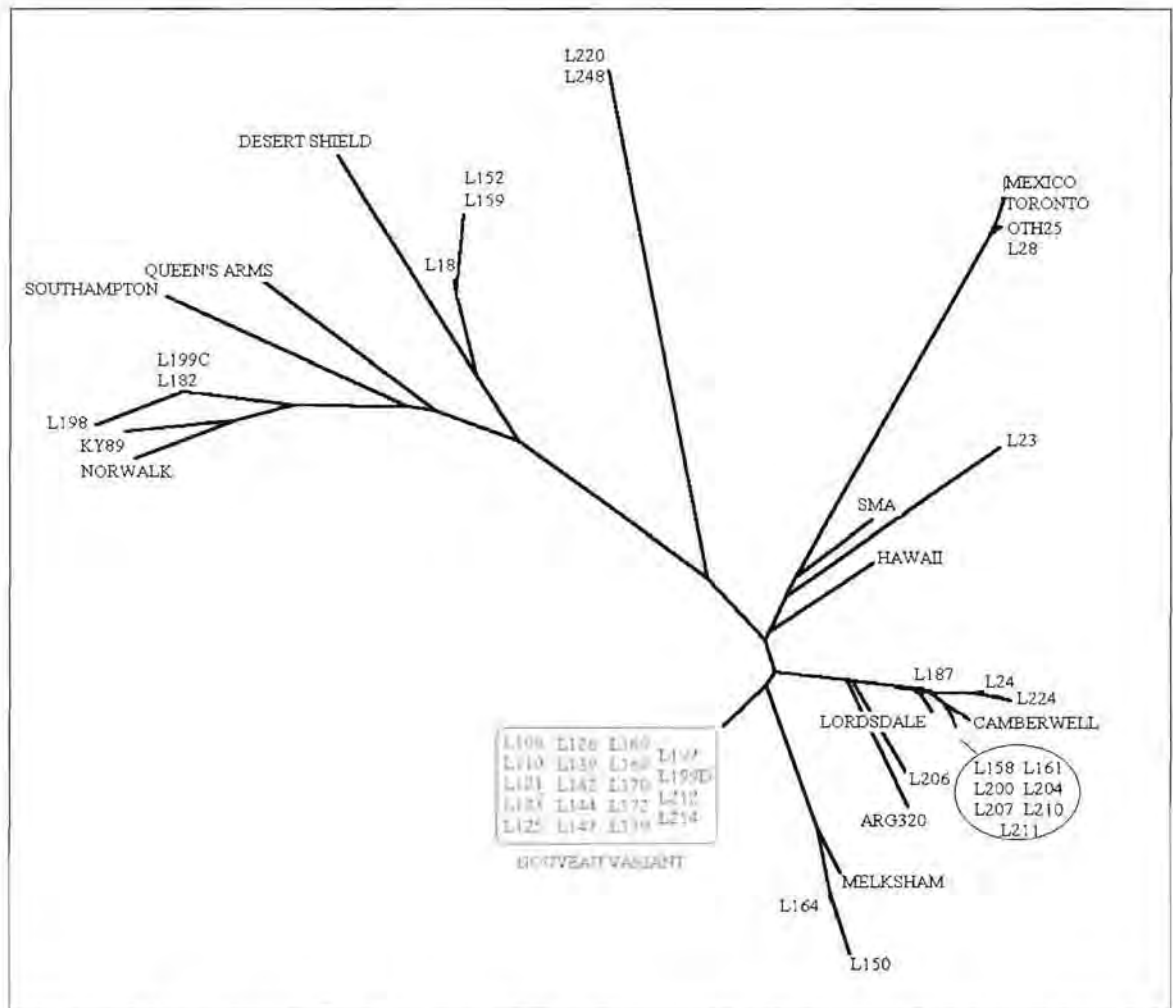


Figure 3.21 :Alignement phylogénique des séquences amplifiées dans la région codant la polymérase ORF1 des souches Norwalk-like. Alignement Clustalw et Phylip sur le site internet www.infobiogen.fr puis élaboration de l'arbre grâce au logiciel Drawtree sur le site bioweb.pasteur.fr

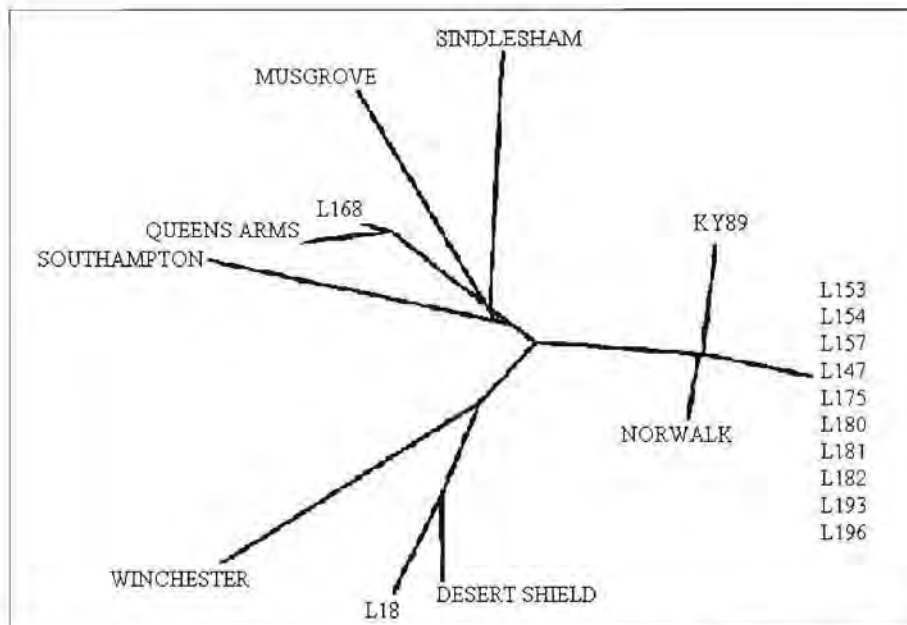


Figure 3.22 : Alignement phylogénique des séquences amplifiées dans la région codant la capsidie des souches Norwalk-like génogroupe I.

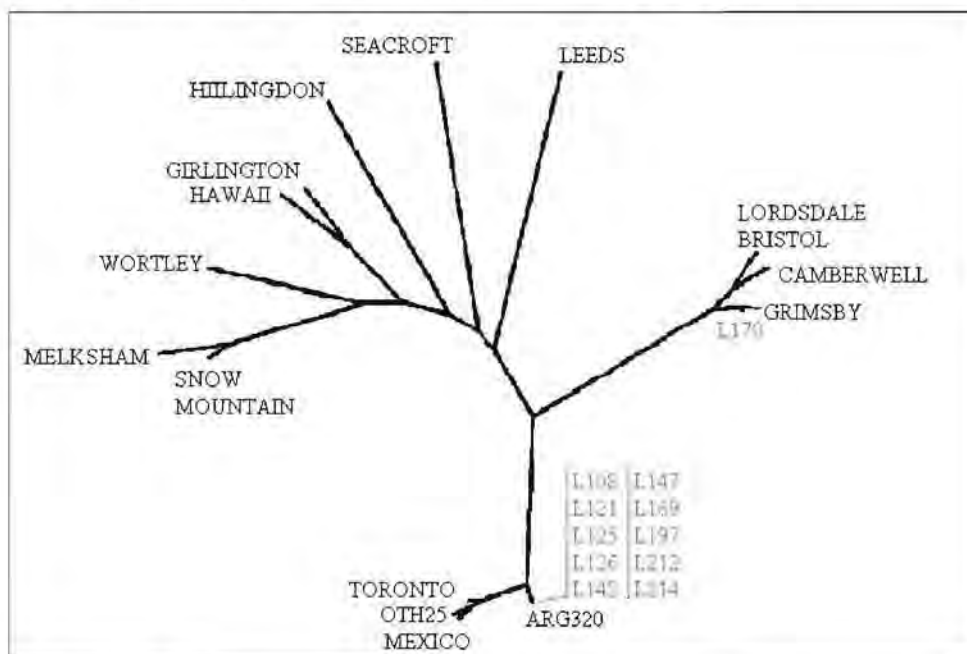


Figure 3.23 : Alignement phylogénique des séquences amplifiées dans la région codant la capsidie de souches Norwalk-like génogroupe II.

3.7.4 Typage moléculaire des souches d'entérovirus

Le typage des 13 souches d'entérovirus est en cours. En effet, la région amplifiée pour le dépistage est située dans la région 5' non codante, partie très conservée du génome des entérovirus. Ainsi, si cette technique est de bonne sensibilité pour la détection, le séquençage des souches détectées par ces mêmes amorces n'est pas pertinent. Le séquençage d'une région située dans VP1 permettra de typer ces souches.

3.8 Discussion - conclusion

La détection et le typage des principaux virus responsables de gastro-entérites circulant dans la population de la région de Vannes d'octobre 1999 à juin 2001 montrent la présence de rotavirus des groupes A, calicivirus humains, astrovirus, adénovirus 40 et 41 ainsi que, des souches d'entérovirus. Cependant, pour ces deux derniers virus, la recherche a été faite de façon systématique sur les prélèvements reçus et n'a pas été ciblée sur une population présentant des signes cliniques en rapport avec une infection avec ces virus. De même l'absence de prélèvements positifs en virus de l'hépatite A peut s'expliquer par les critères de sélection des selles, basées sur une symptomatologie de gastro-entérites.

La population concernée par cette étude peut être répartie en deux groupes principaux: d'une part, des patients consultant un **médecin généraliste** pour **gastro-entérite aiguë (cas)** ou pour une autre raison (**témoins**) et d'autre part, des patients consultant au **centre hospitalier de Vannes** pour **gastro-entérite aiguë**. Le recueil des prélèvements a reposé exclusivement sur le volontariat des différents partenaires de santé tels que médecins généralistes, laboratoires d'analyses médicales de ville et laboratoire hospitalier de Microbiologie de Vannes.

A ces deux groupes, il faut ajouter des patients pour lesquels une analyse des selles ayant été prescrite et réalisée par les laboratoires d'analyse médicale de ville, nous a permis de recueillir des selles.

D'une façon générale, cette étude montre **l'importance des virus entériques**. Plus de 35 % des selles prélevées au cours de toute l'étude contenaient au moins un virus, les 4 principaux virus de gastro-entérite représentant 30 % et les entérovirus 5 %, **aucun VHA n'a été détecté**.

Si l'on considère les **différents groupes de patients**, la présence d'un virus au moins a été détectée chez 40 % des cas consultants en médecine générale et 51 % des patients consultants au centre hospitalier. La forte prévalence des virus dans les selles provenant du centre hospitalier peut être expliquée par le fait que les patients étaient âgés de 15 ans au plus, avec une majorité d'enfants de moins de 2 ans très sensibles aux infections virales. Seulement 5 % des selles provenant des laboratoires d'analyse médicale de ville

contenaient un virus. Ce résultat est difficile à interpréter du fait de l'absence de renseignements cliniques sur les patients concernés. Il peut en effet s'agir de pathologies infectieuses, mais avec une forte suspicion d'infection bactérienne, une coproculture ayant été demandée afin d'adapter la thérapeutique, ou même de pathologies non infectieuses.

Si l'on considère les **différentes classes d'âge**, la fréquence d'une détection virale positive diminue avec l'âge. Un tel résultat a clairement été montré lors d'une investigation du pic épidémique de gastro-entérites de l'hiver 1998-99 réalisée au niveau national (Chikhi-Brachet *et al.*, soumis).

Comme nous l'avons montré au cours de cette précédente étude (Chikhi-Brachet *et al.*, sous presse J. Clin. Microbiol.), **les calicivirus et les rotavirus ont été trouvés prédominants** (23 et 11 % des cas consultant en médecine générale respectivement et 21 et 24 % des patients consultant au centre hospitalier), tandis que les astrovirus et les adénovirus 40 et 41 ont été rarement détectés (inférieur à 2 % des cas). La différence de fréquence pour les rotavirus entre les 2 groupes peut être aisément attribuée à la différence d'âge des patients, la majorité d'entre eux pour le centre hospitalier étant des enfants âgés de moins de 2 ans très sensibles aux infections par le rotavirus. Les calicivirus ont été observés dans toutes les tranches d'âge avec une fréquence relativement constante. Il est maintenant admis que les calicivirus sont un agent majeur de gastro-entérites chez les jeunes enfants (Bon *et al.*, 1999, Pang *et al.*, 2000). Les rotavirus ont été également détectés dans toutes les tranches d'âge mais avec une fréquence nettement plus élevée chez les jeunes enfants (32 % versus 4 à 10 % pour les autres tranches d'âge) comme cela est classiquement décrit. Toutefois, il est intéressant de noter la persistance d'infections symptomatiques à rotavirus dans toutes les classes d'âge. Un tel résultat avait également été observé au cours du pic hivernal 98-99 (Chikhi-Brachet *et al.*, soumis).

Aucun rotavirus du groupe C n'a été observé parmi les 148 échantillons analysés. Des entérovirus ont été détectés chez 6 % des cas consultants un médecin généraliste, 3 % d'entre eux présentant une coinfection avec un virus de gastro-entérite, et chez 6 % des patients consultant à l'hôpital pour gastro-entérite. Seuls certains sérotypes d'entérovirus ont été associés à des épidémies de gastro-entérite aiguë. Le typage des souches permettra de compléter ce résultat.

Aucun prélèvement n'a été trouvé contenir le virus de l'hépatite A.

Le typage des souches de rotavirus et de calicivirus détectées a montré une **co-circulation** sur cette région de différentes souches tant pour les rotavirus que pour les calicivirus. Il est à noter la présence de souches de rotavirus P[8] ; G9 souches émergentes dans différentes régions du monde et déjà détectées en France au cours de l'hiver 97-98 (Bon *et al.*, 2000).

Le séquençage des souches de calicivirus a souligné l'importance du genre Norwalk-like et tout particulièrement du génogroupe II. De tels résultats avaient déjà été observés au cours d'études précédentes réalisées en France (Bon *et al.*, 1999, Chikhi-Brachet *et al.*, soumis) ainsi que dans d'autres pays (Koopmans *et al.*, 2000).

De plus, lors de cette étude, il a été observé des souches présentant des particularités moléculaires posant un problème pour leur dépistage (difficulté d'amplification du gène codant pour la polymérase pour les souches proches du virus Norwalk) ou leur classification (variants génogroupe II). Ces nouveaux variants sont des souches recombinantes possédant des ORF 1 et 2 provenant de deux souches parentales différentes. De telles souches recombinantes ont été décrites précédemment (Jiang *et al.*, 1999 ; Vinjé *et al.*, 2000). Elles pourraient contribuer à la diversité des calicivirus.

Les souches proches du virus Norwalk ainsi que les nouveaux variants ont par ailleurs été retrouvés en France à l'origine d'épidémies liées à la consommation d'huîtres, d'eau du robinet ou encore chez des patients hospitalisés durant la même période. Enfin, le nouveau variant (Hawaii-Arg320 - génogroupe II, génotype Mexico) a été également observé dans différents pays d'Europe durant l'hiver 2000-01 notamment à l'origine de toxi-infections alimentaires associées à la consommation d'huîtres, suggérant que ces souches ont rapidement diffusé au cours de l'hiver 2000-2001.

Ce résultat tend à montrer que l'étude approfondie de l'épidémiologie moléculaire de virus détectés sur une région donnée peut permettre d'appréhender la circulation de ces virus à plus grande échelle.

Par contre la collecte des échantillons n'a pas été ajustée pour répondre au nombre de cas et ne reflète donc pas exactement le phénomène observé au niveau épidémiologique. Pour palier à cette information nous avons consulté le site du Réseau Sentinelles.

Importance des gastro-entérites dans la population pendant la période étudiée*

Les données du « Réseau sentinelles » sont reportées (figures 3.24 à 3.26) pour situer la période d'étude dans un contexte pluriannuel et national. On constate que notre travail encadre deux pics de gastro-entérites dans la population : le pic de l'hiver 1999-2000 (maximum 620 cas/100 000 habitants) et un autre nettement plus important situé d'octobre 2000 à février 2001. Le dernier épisode de gastro-entérite est le plus important observé en France (figure 3.25) ou en Bretagne (figure 3.25) ces dix dernières années, avec un maximum observé de 1 100 cas/100 000 habitants en Bretagne et près de 900 cas/100 000 habitants en France. Bien que les informations reportées ici soient très générales du fait du manque de précisions liée au faible nombre de médecins sentinelles dans ce secteur, elles n'en sont pas moins intéressantes. ***Elles montrent que sur le plan quantitatif, l'étude se place donc dans une période « favorable » aux rejets de virus dans l'environnement.***

* <http://www.b3e.jussieu.fr/sentiweb/>

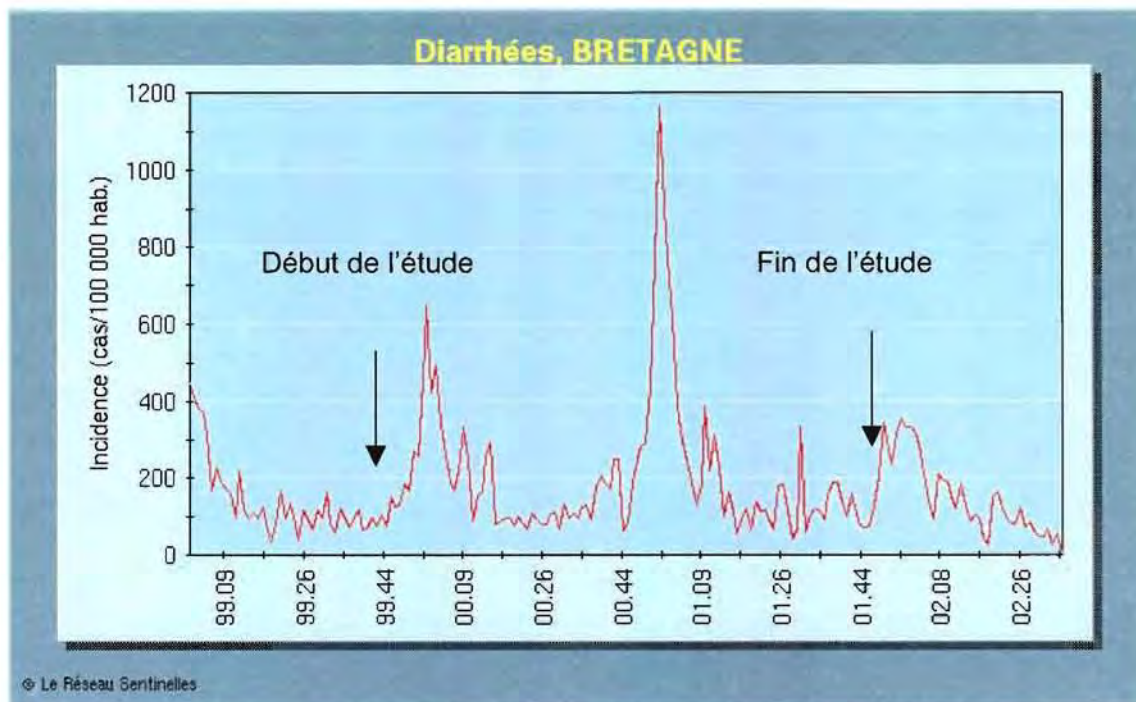


Figure 3.24 : Bretagne 1999- 2002 – Incidence des cas de gastro-entérites dans la population (données du Réseau Sentinelles).

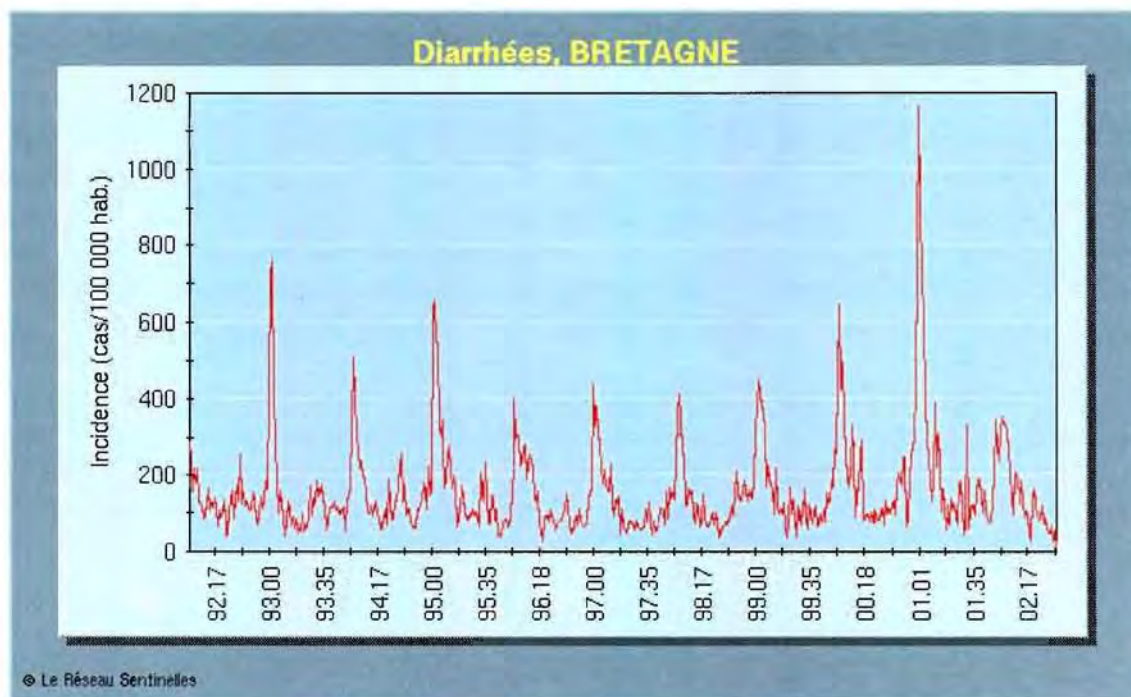


Figure 3.25 : Bretagne 1992-2002 – Incidences des cas de gastro-entérites dans la population (données du Réseau Sentinelles).

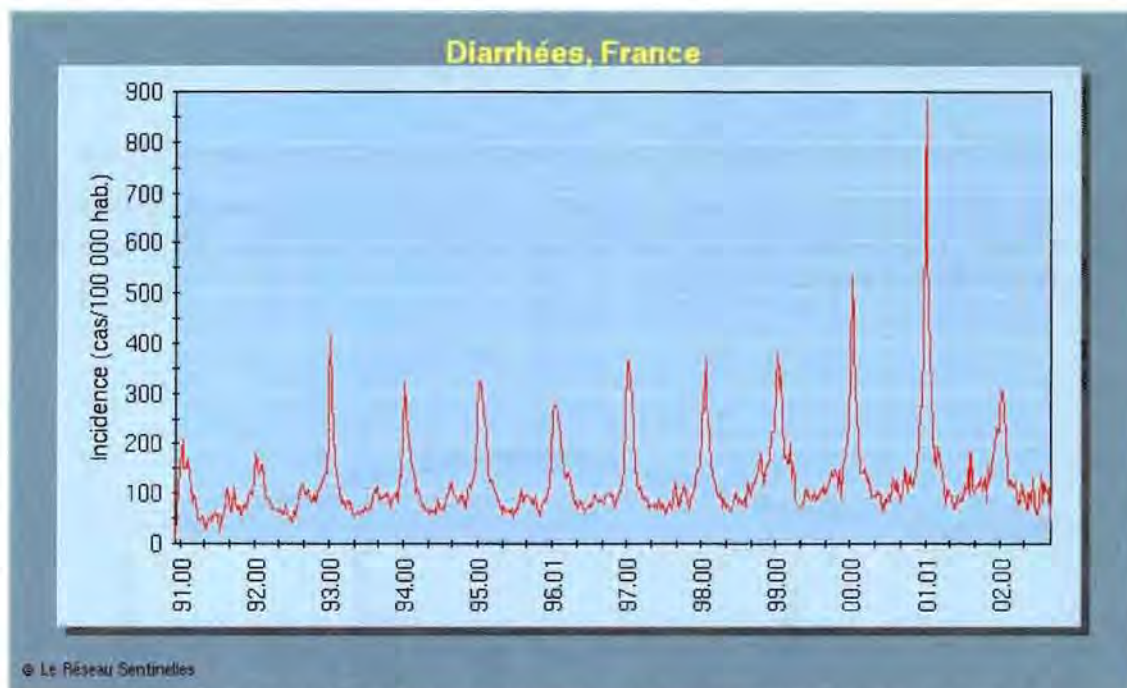


Figure 3.26 : France 1991 –2002 - Incidences des cas de gastro-entérites dans la population (données du Réseau Sentinelles).

Epidémie de méningites à entérovirus *

Une autre information sur la circulation de virus dans la population émane du Centre National des Entérovirus et hépatite A (CHU-Lyon, Prof. M. Aymard*). Une alerte résultant d'une situation épidémique de méningite à entérovirus (échovirus type 30) a été déclenchée au premier semestre 2000. D'une manière générale, cette épidémie a touché différentes régions françaises entre mars et mai 2000. Le bilan effectué le 26 mai 2000 faisait état d'une épidémie à échovirus 30 sur le secteur de Vannes en avril 2000 avec détection de l'entérovirus dans une série de prélèvements. Ceci tend à montrer qu'il existait à cette époque la présence de nombreux entérovirus circulant en grande quantité dans la population, la forme méningée ne concernant qu'un faible pourcentage des personnes infectées. Les virus entériques excrétés par la population ont pu être rejetés dans les eaux usées du secteur de Vannes.

* Aymard@rockfeller.univ-lyon.fr

4 Contamination des apports et des coquillages³

4.1 Conditions météorologiques observées pendant la période d'étude

Les figures ci-dessous reportent les conditions météorologiques observées pendant la période d'étude. On constate que celle-ci débute (octobre 1999) après des pluies assez abondantes en début d'automne (figure 4.1).

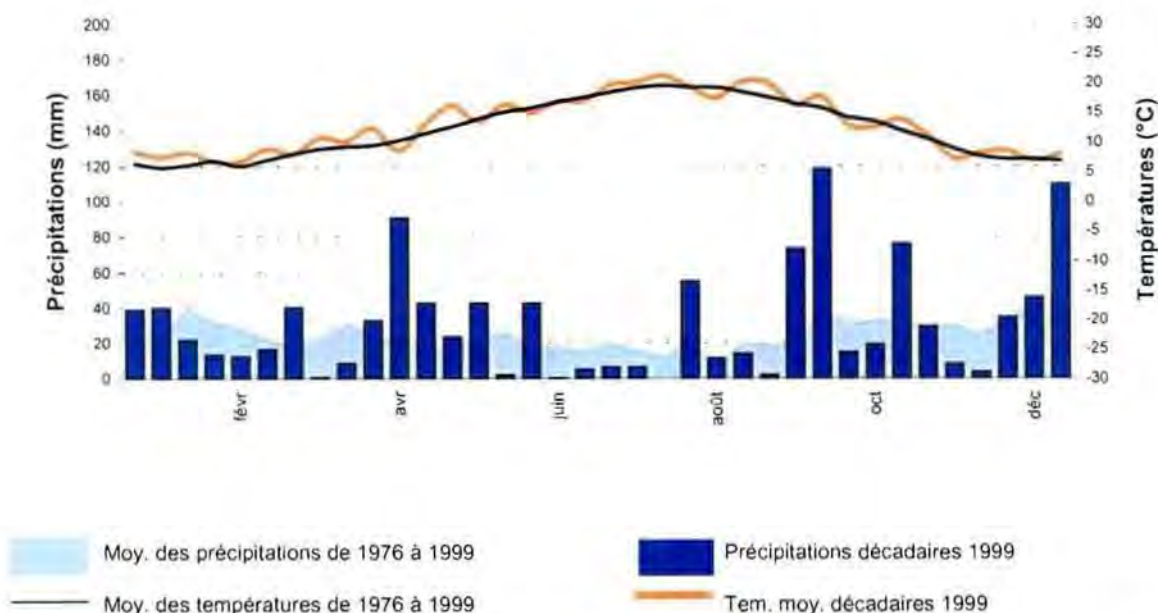


Figure 4.1 : Précipitations et températures décennales de l'année 1999 par rapport aux moyennes des précipitations et températures observées de 1976 à 1999.

La période allant de janvier à octobre 2000 (figure 4.2), est marquée par des pluies peu abondantes et en dessous de la moyenne des précipitations (1976-1999). A partir du mois de novembre 2000, jusqu'en février 2001, puis pendant le mois de mars 2001, des précipitations très abondantes sont observées dans ce secteur, comme dans tout le reste de la France (figure 4.3).

³ Cf. Rapport Liteau ; Synthèse et conclusion – contamination des apports et des coquillages. Mai 2002. Le Guyader S., Caprais M.P., Camus P., Parnaudeau S., Le Menec C., Dimeet J., Treguier C., Pommepuy M., Ifremer, DEL (rapport interne).

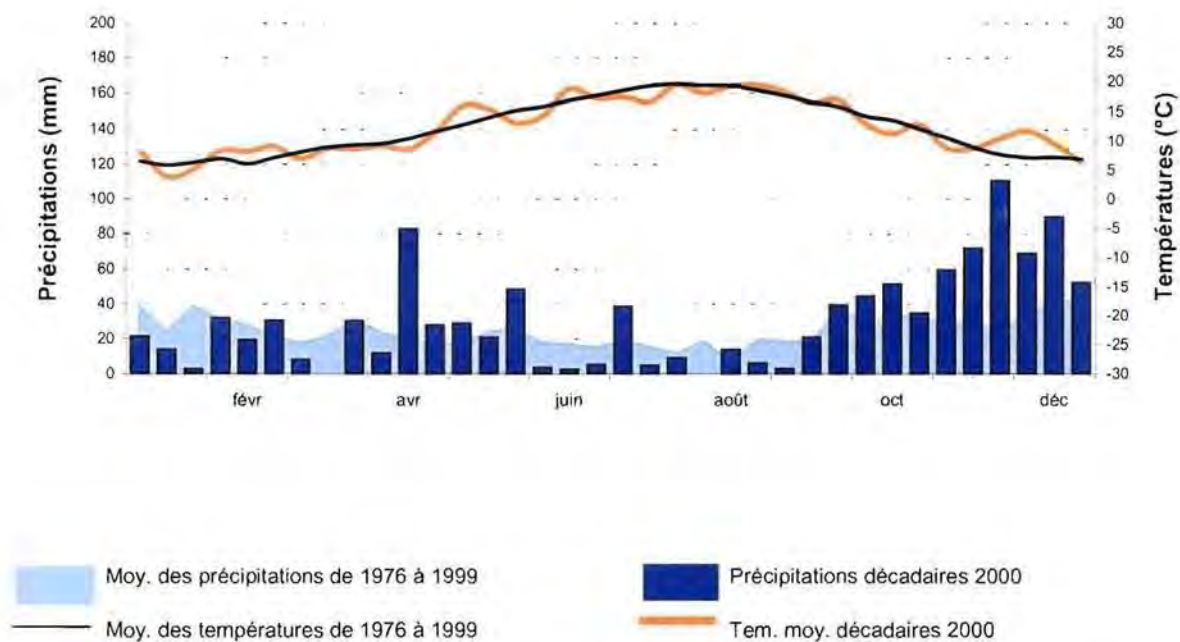


Figure 4.2 : Précipitations et températures décadaires de l'année 2000 par rapport aux moyennes des précipitations et températures observées de 1976 à 2000.

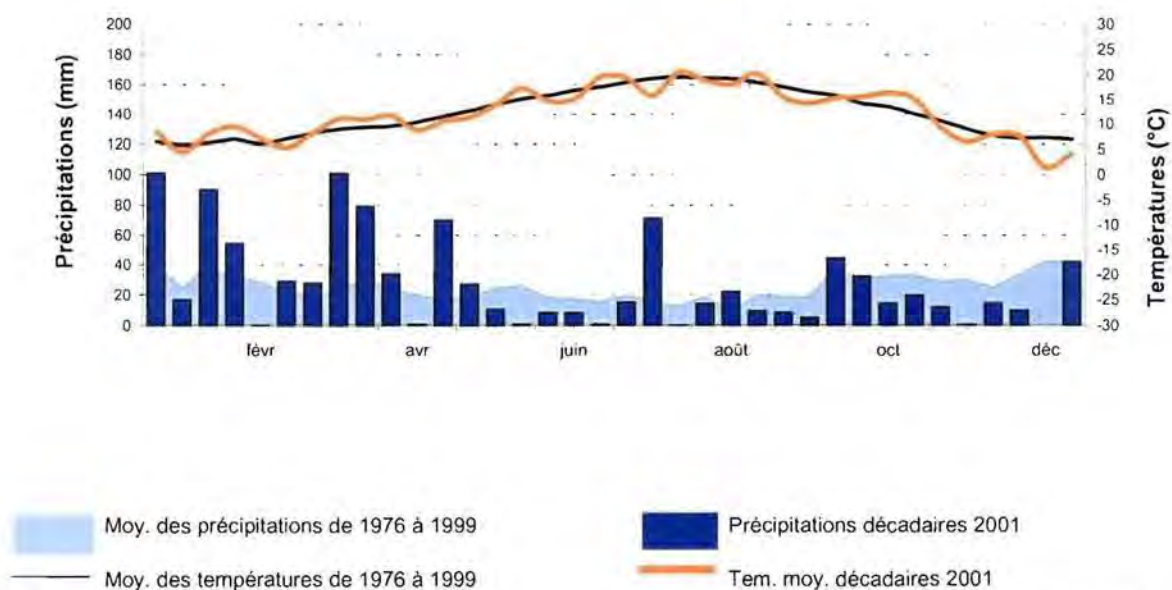


Figure 4.3 : Précipitations et températures décadaires de l'année 2001 par rapport aux moyennes des précipitations et températures observées de 1976 à 2001

4.2 Observation des débits journaliers des stations d'épuration pendant la période d'étude

Pendant cette étude, les débits ont été enregistrés dans les stations d'épurations se rejetant dans le secteur d'étude :

- **La station d'Arradon** : 7 000 éq./hab., boues activées faible charge, capacité hydraulique 1 200 m³/j, rejet dans le golfe du Morbihan (pointe d'Arradon). Cette station de charge nominale 1 200, mise en place en février 2 000, a remplacé la station de Pen Meil (2 500 éq./hab.) qui était obsolète*. On constate pendant la période novembre 2000 à février, puis mars 2001, une surcharge hydraulique de la station (figure 4.4). Ces surcharges sont en relation avec les pluies observées à ces époques (figures 4.2 ; 4.3).

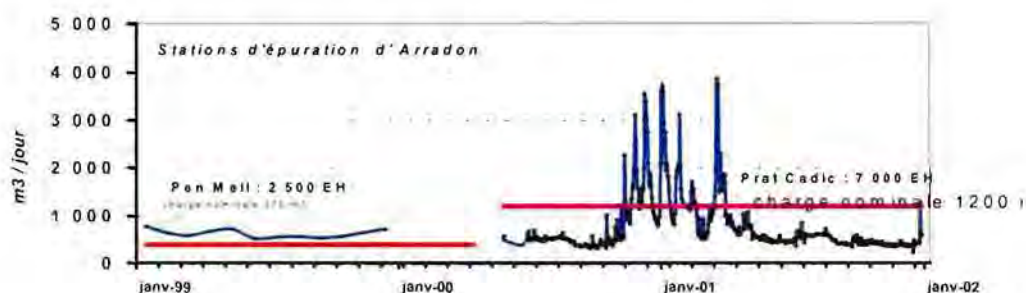


Figure 4.4 : Débits journaliers de la station d'Arradon.

- **La station de Vannes-Tohannic** : 60 000 éq./hab., boues activées faible charge, capacité hydraulique 9500 m³/j, rejet dans le secteur de la rivière de Vannes (figure 4.5). L'impact des pluies de l'hiver 2000-2001, se fait également sentir dans cette station, avec des débits élevés plus soutenus dans le temps par rapport à l'hiver précédent.

* Jusqu'en janvier 2000, il faut noter l'existence d'un by-pass fonctionnant régulièrement en période de fortes pluies.

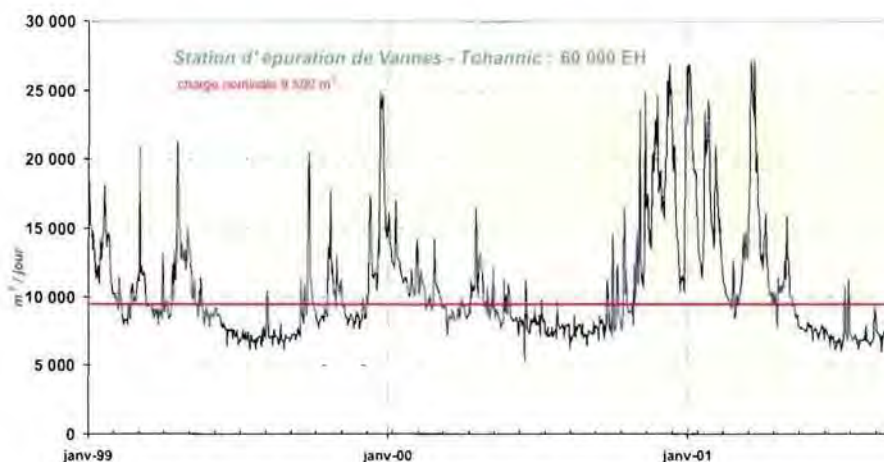


Figure 4.5 : Débits journaliers de la station de Vannes-Tohannic.

- **La station de Séné-Le Ranquin** : 1 500 eq./hab., boues activées faible charge, capacité hydraulique 225 m³/j, rejet dans le secteur de la rivière de Vannes. Il s'agit dans ce cas d'une évaluation du débit de la station réalisée à partir des temps de fonctionnement des pompes en entrée de station, car il n'existe pas de mesure de débit en sortie de station. Les résultats (figure 4.6) indiquent comme pour les autres stations des surcharges anormales pendant la période allant de novembre 2000 à février 2001 en raison de fortes intrusions d'eaux parasites.

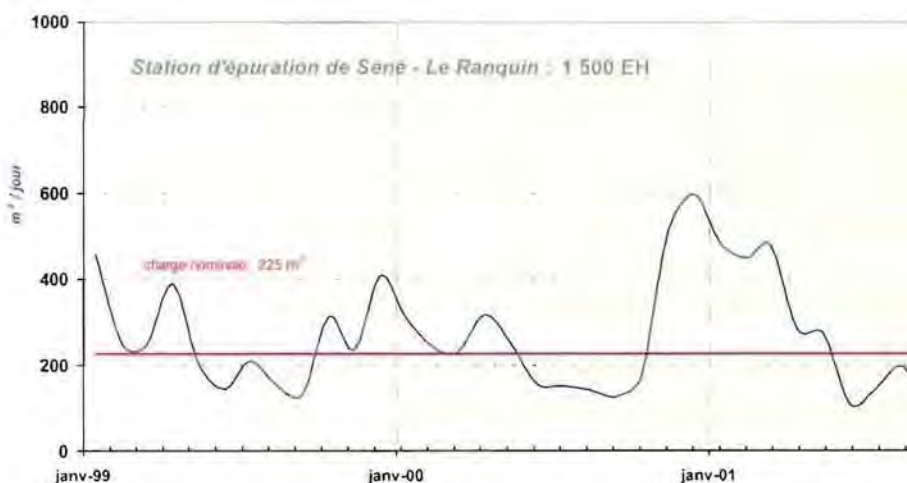


Figure 4.6 : Evaluation des débits journaliers de la station Séné-Le Ranquin.

4.3 Rendement épuratoire des stations

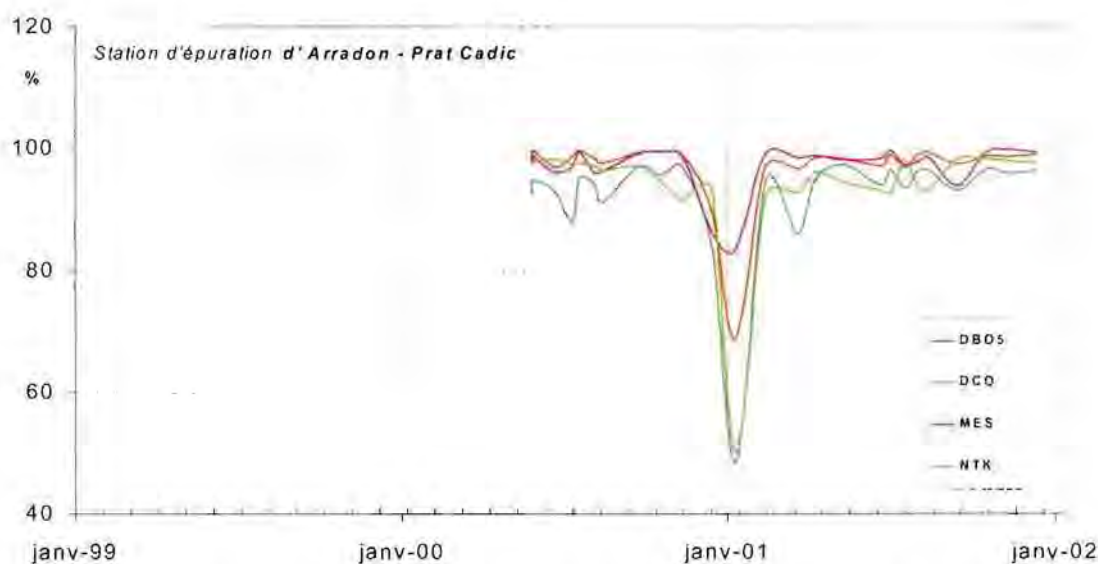


Figure 4.7 : Rendement physico-chimique épuratoire de la station Arradon (mai 2000-Janv. 2002).

Sur les deux stations d'épuration Vannes-Tohannic et Arradon, nous disposons d'informations concernant le rendement épuratoire sur les paramètres DBO5, DCO, MES et NTK à partir des auto-contrôles des exploitants. Il est intéressant de voir que les rendements des quatre paramètres sont identiques, et lorsqu'il y a un défaut de rendement, il atteint les paramètres de la même façon.

Les rendements en MES sont particulièrement intéressants sachant que les paramètres microbiologiques leur sont liés (adsorption des virus et d'une partie des bactéries aux matières en suspension). Sur la station d'Arradon, ils ont été de presque 100 % pendant la période d'étude, sauf à la mi-janvier 2001 (figure 4.7). A cette époque on a noté un dysfonctionnement, marqué par une chute de 20 % du rendement sur les MES. Par contre, sur Vannes Tohannic, c'est en mars-avril 2000, que l'on a eu une rupture dans le fonctionnement de la station (figure 4.8) avec un rendement de MES qui a chuté à 60 %.

On peut souligner la correspondance entre les précipitations anormalement élevées d'octobre 2000 à mars 2001, la surcharge observée et la perte du rendement épuratoire des stations à cette même période. A Arradon la perte de performance est liée aux apports hydrauliques excessifs alors qu'à Vannes-Tohannic il s'agit de problèmes techniques liés à l'extraction des boues du clarificateur (mars 2001).

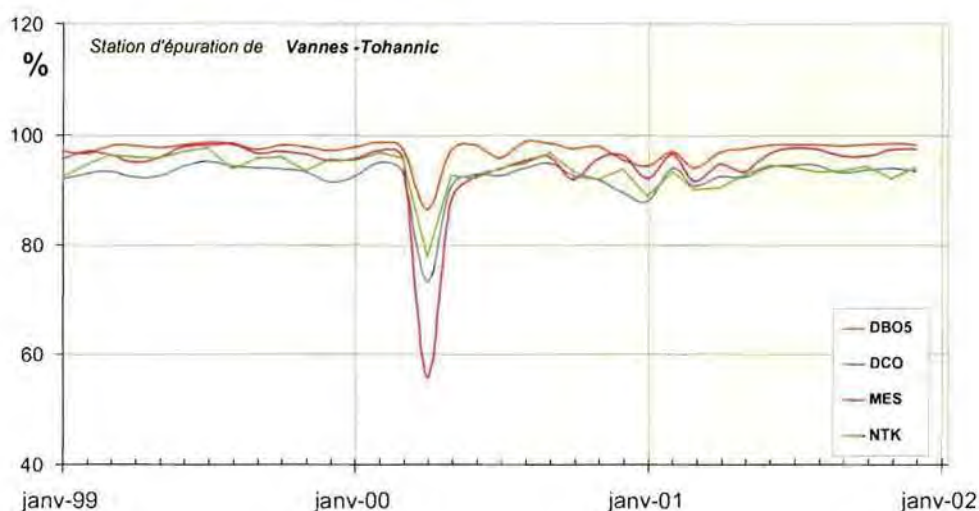


Figure 4.8 : Rendement physico-chimique épuratoire de la station Vannes-Tohannic (janvier 1999 à janvier 2002).

4.4 Les Flux d'*E. coli* en sortie des stations d'épuration

Les flux en *E. coli* en sortie de station ont été calculés pour les trois stations à partir des données de débits et des concentrations mesurées en *E. coli* réalisées lors de l'étude. Les flux sont exprimés en Unité Habitant (U.H) *

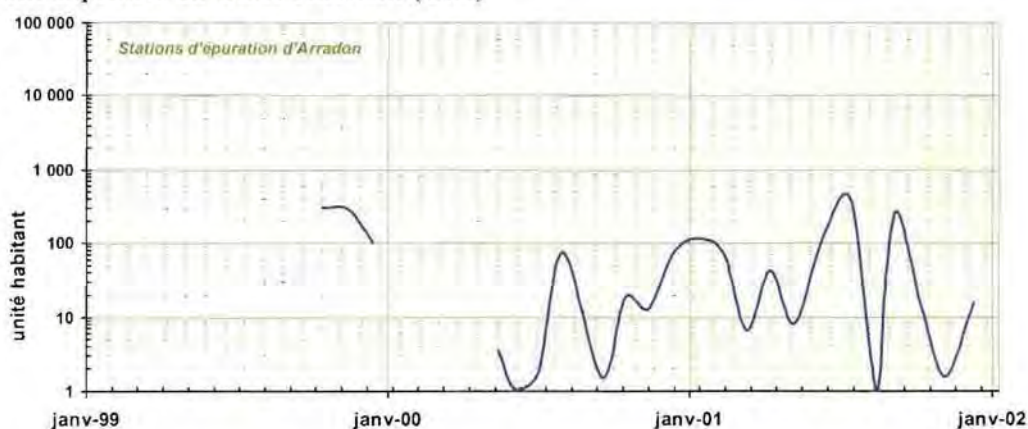


Figure 4.9 : Flux d'*E. coli* en sortie de la station d'épuration d'Arradon (avril 2000 - janvier 2002).

* Unité Habitant = 10^{10} *E. coli*/jour

- Station Arradon** (7 000 eq/h) : le flux moyen observé en *E. coli* pendant la période d'étude (figure 4.9) a été d'environ 10 unités/habitant (UH) avec des minima de 1 UH et des maxima de 100, voire 400 UH).

Les flux maxima ne sont pas en relation avec l'augmentation des débits et la baisse du rendement épuratoire observées pendant la période allant de novembre 2000 à mars 2001, contrairement à ce que l'on aurait pu attendre. Ils sont à mettre en relation avec les à-coups hydrauliques que peut recevoir cette station en période de nappe haute et de forte pluviosité, ainsi qu'à des difficultés techniques (soutirage des boues).

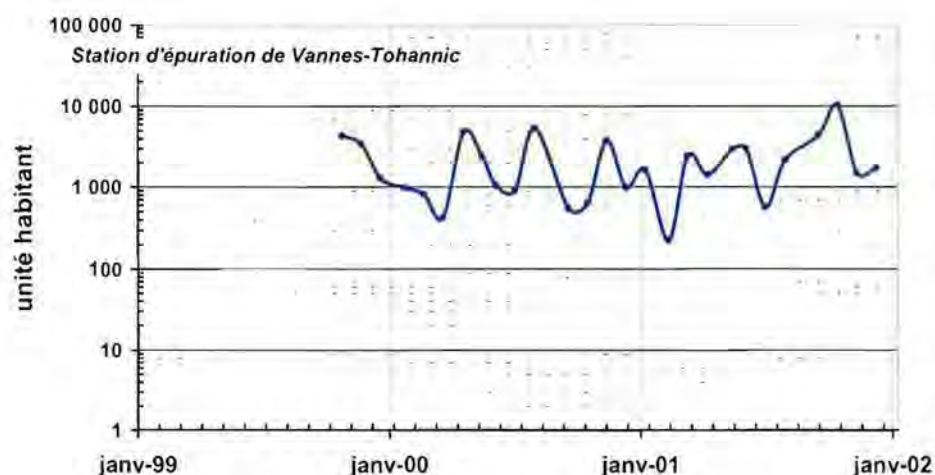


Figure 4.10 : Flux d'*E. coli* en sortie de la station d'épuration de Vannes-Tohannic.

- Le flux de Vannes-Tohannic en *E. coli* (60 000 eq./hab.) est en moyenne de 2000 H/jour, avec des pics allant jusqu'à 10 000 UH (figure 4.10). Cette station représente l'apport principal dans ce secteur puisque les flux de Séné-Le Ranquin (figure 4.11) sont par ailleurs très inférieurs.

On n'observe pas de pic particulier dans les flux observés pendant la période d'étude en relation avec la pluie. Cependant, il faut noter que le pas de calcul de ces flux est assez grand (1 mois) et que, de ce fait, il peut ne refléter des incidents techniques de fonctionnement dans les stations entre deux séries de prélèvements. Toutefois les contrôles journaliers des exploitants sur les stations de Vannes et Arradon ne signalent pas d'incidents majeurs et/ou récurrents.

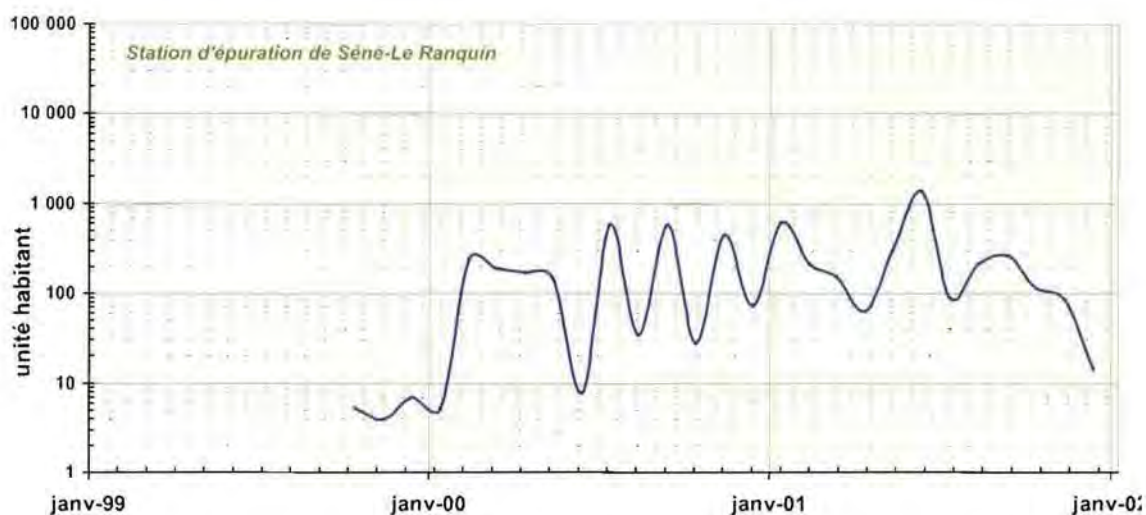


Figure 4.11 : Flux d'*E. coli* en sortie de la station d'épuration de Séné-Le Ranquin.

Pour conclure, le tableau 4.1. résume les principales données recueillies sur les trois stations d'épuration pendant la période d'étude :

	eq./hab.	m ³ /j Moyenne - maxima	Défaut épuratoire MES	Flux <i>E. coli</i> * Moyenne - maxima	Concentration
					<i>E. coli</i>
Arradon	7 000	1 200 - 4 000	- 20 % (01-01)	10 - 300	8,3 10 ⁴ (7·10 ³ – 5 10 ⁵)
Vannes- Tohannic	60 000	10 000 - 25 000	- 60 % (02-01)	1 000-10 000	1,9 10 ⁵ (1,7 10 ⁴ – 8 10 ⁵)
Séné-Le Ranquin	1 500	200 - 600	ND	100 – 1 000	8.10 ⁵ (27.10 ⁴ – 4.5 10 ⁶)

* : en Unité Habitant ;

ND : non déterminé

Tableau 4.1 : Principales données sur les stations d'épuration pendant la période étudiée (octobre 1999 – mai 2001).

4.5 Résultats microbiologiques dans les eaux usées

L'ensemble des résultats obtenus entre octobre 1999 et mai 2001 a été rassemblé dans les trois tableaux ci-dessous (4.2. ; 4.3 ; 4.4) :

ARRADON									
	E.coli	FARNspecificiques	Bact.fragilis	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus	total virus
25/10/99	540 000	3600	12,5	+	-	-	-	-	1
22/11/99	440 000	2590	50	+	-	-	+	-	2
20/12/99	140 000	3100	141	-	-	+	-	-	1
24/01/00	77 000	83500	15	+	-	-	-	-	1
21/02/00	6 100	6470	200	+	-	-	-	-	1
20/03/00	5000	#N/A	400	+	-	+	+	-	3
19/04/00	30000	666	<LD	+	+	+	-	-	3
16/05/00	7700	830	300	+	-	-	-	-	1
05/06/00	1 900	70		+	-	-	-	-	1
03/07/00	3 800	300	400	-	-	-	-	-	0
01/08/00	146 000	566	nf	-	-	-	-	-	0
19/09/00	3 800	1300	nf	-	-	-	-	-	0
17/10/00	52 000	4633	nf	-	-	-	-	-	0
14/11/00	10 000	430	nf	-	-	-	-	-	0
12/12/00	22 000	300	nf	-	-	-	-	-	0
09/01/01	59 000	12470	nf	+	+	-	-	-	2
12/02/01	65 000	300	nf	-	-	-	-	-	0
12/03/01	7 200	1000	nf	-	-	-	-	-	0
10/04/01	55 000	5400	nf	-	+	-	-	-	1
09/05/01	16 000	1933	nf	-	-	-	-	-	0
moyenne	84 375	6814	190						
total virus				9	3	3	2	0	17
% virus				45	15	15	10	0	

Tableau 4.2 : Résultats de la contamination bactériologique et virale dans les eaux épurées de la station d'Arradon entre octobre 1999 et mai 2001. Les résultats bactériologiques sont exprimés en UFC/100 ml. Les résultats des phages sont exprimés en UFP/100 ml. Les virus recherchés par RT-PCR sont exprimés en terme de présence (+) ou absence (-). nf : analyse non réalisée.

Dans la station d'Arradon (2 500 eq./hab. puis 7 000 eq/hab) et pendant l'étude, nous avons observé des variations en indicateurs fécaux très élevées, sans lien direct avec les phénomènes météorologiques, les périodes de surcharges mentionnées plus haut ou les saisons. Ces variations semblent aléatoires et aucune relation n'existe entre les pics observés en *E. coli*, F + RNA ou phages de *Bacteroides fragilis*.

La présence de virus a été surtout mise en évidence la première année de l'étude : les rotavirus surtout étaient abondants. Dans 3 échantillons (avril 2000, janvier et avril 2001) on a noté la présence de VHA.

VANNES - TOHANNIC									
DATE	<i>E.coli</i>	FARNspecificques	Bact.fragilis	rotavirus	VHA	enterovirus	calciivirus	astrovirus	total virus
25/10/99	310 000	1600	32,5	-	-	-	-	-	0
22/11/99	430 000	2120	300	-	-	-	-	-	0
20/12/99	120 000	1100	98	+	-	+	-	-	2
24/01/00	98 000	3250	300	+	-	+	-	-	2
21/02/00	88 000	4230	100	+	-	+	-	-	2
20/03/00	50 000	3330	250	+	-	-	-	-	1
19/04/00	420000	2450	58	+	-	+	-	+	3
16/05/00	280000	2100	400	-	-	-	-	-	0
05/06/00	123 000	2430		-	-	-	-	-	0
03/07/00	115 000	2100	350	-	-	-	-	-	0
01/08/00	800 000	10366	nf	-	-	-	-	-	0
19/09/00	80 000	1800	nf	-	-	-	-	-	0
17/10/00	70 000	2266	nf	-	-	-	-	-	0
14/11/00	250 000	3500	nf	-	-	-	-	-	0
12/12/00	40 000	2900	nf	-	-	-	-	-	0
09/01/01	82 000	2560	nf	-	-	-	-	-	0
12/02/01	17 000	4900	nf	-	-	-	-	-	0
12/03/01	180 000	200	nf	+	-	-	-	-	1
10/04/01	116 000	2050	nf	-	-	-	-	-	0
09/05/01	300 000	766	nf	-	-	-	-	-	0
moyenne	198 450	3820	210						
total virus				6	0	4	0	1	11
% virus				30	0	20	0	5	

Tableau 4.3 : Résultats de la contamination bactériologique et virale dans les eaux épurées de la station de Tohannic entre octobre 1999 et mai 2001. Les résultats bactériologiques sont exprimés en UFC/100 ml. Les résultats des phages sont exprimés en UFP/100 ml. Les virus recherchés par RT-PCR sont exprimés en terme de présence (+) ou absence (-).nf : analyse non réalisée.

Dans la station Vannes-Tohannic (60 000 éq./hab.), la concentration moyenne en *E. coli* est 10 fois supérieure à celle observée sur Arradon, alors que les concentrations en phages ne sont guère plus élevées. On note une plus grande régularité dans les concentrations rejetées. La présence de virus, comme pour la station précédente, a été observée le premier hiver de l'étude.

La station du Ranquin est la moins importante des trois stations avec une capacité de 1500 E/H. Cependant la moyenne de coliformes affichée en sortie de cette station est la plus élevée avec une valeur de 800 000 *E. coli*/100 ml. En effet sa filiaire de traitement est dépassée. De même les concentrations en bactériophages ont pu atteindre des valeurs très élevées spécialement pendant les mois de juillet et septembre 2000 où les concentrations en sortie étaient importantes.

LE RANQUIN									
DATE	<i>E. coli</i>	FARN spécifiques	Bact. fragilis	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus	total virus
25/10/99	720 000	1420	185	-	-	-	+	-	1
22/11/99	420 000	1810	1600	+	-	-	-	-	1
20/12/99	600 000	1850	433	-	-	-	-	-	0
24/01/00	17 000	400	150	+	-	-	-	-	1
21/02/00	1 030 000	2430	350	+	-	+	-	-	2
20/03/00	83 000	4570	1850	+	-	-	-	-	1
19/04/00	550000	650	24	-	-	-	-	-	0
16/05/00	600000	10630	350	+	+	-	-	+	3
05/06/00	50 000	6100		+	-	-	-	-	1
03/07/00	3 800 000	11300	70	-	+	-	-	-	1
01/08/00	240 000	24533	nf	-	-	+	-	-	1
19/09/00	4 500 000	12000	nf	-	-	-	-	-	0
17/10/00	160 000	10566	nf	-	-	+	-	-	1
14/11/00	870 000	7100	nf	-	-	-	-	-	0
12/12/00	120 000	900	nf	-	-	-	-	-	0
09/01/01	126 000	2430	nf	+	+	-	-	-	2
12/02/01	480 000	1800	nf	+	-	-	-	-	1
12/03/01	320 000	1000	nf	-	-	-	-	-	0
10/04/01	224 000	non fait	nf	-	-	-	-	-	0
09/05/01	1 130 000	1000	nf	-	+	-	-	-	1
moyenne	802 000	5400	557						
total virus				8	4	3	1	1	17
% virus				40	20	15	5	5	

Tableau 4.4 : Résultats de la contamination bactériologique et virale dans les eaux épurées de la station de Ranquin entre octobre 1999 et mai 2001. Les résultats bactériologiques sont exprimés en UFC/100 ml. Les résultats des phages sont exprimés en UFP/100 ml. Les virus recherchés par RT-PCR sont exprimés en terme de présence (+) ou absence (-). nf : analyse non réalisée.

La présence de virus a été mise en évidence tout au long de l'étude : les rotavirus surtout étaient fréquemment détectés. On a noté la présence de VHA dans quatre échantillons. Ces résultats reflètent assez bien la mauvaise qualité des eaux rejetées par cette station par rapport aux autres stations.

En conclusion, aucune relation ne s'observe entre les variations des différents indicateurs entre eux. L'étude permet de voir cependant le rapport des populations *E. coli*/F+RNA/phages de *Bacteroides fragilis* : les F+RNA sont dix fois plus présents dans les eaux usées que les bactériophages de *Bacteroides fragilis* ; quant aux *E. coli* ils sont respectivement 100 fois et 1 000 fois plus abondants que les F+RNA et les phages de *Bacteroides fragilis*. La difficulté d'analyse de ces derniers (anaérobiose) et leur faible présence nous a incité à limiter leur analyse aux 10 premiers mois d'étude.

En ce qui concerne les virus, leur présence est aléatoire par rapport aux concentrations en indicateurs, ce qui est conséquent avec leur caractère saisonnier lié à des épidémies dans les populations des bassins versants. Enfin, il n'y a aucun lien entre le fonctionnement ou le dysfonctionnement des stations et la présence de virus dans les eaux usées épurées.

Sur les 60 prélèvements réalisés, 44 résultats positifs ont été obtenus. Le tableau 4.5. montre les résultats concernant la contamination virale dans les eaux épurées des trois stations d'épuration d'octobre 1999 à mai 2001.

	Arradon	Ranquin	Tohannic
N	20	20	20
rotavirus	9	8	6
%rot	45	40	30
VHA	3	4	0
%	15	20	0
entero	3	3	4
%	15	15	20
calici	2	1	0
%	15	5	0
astro	0	1	1
%	0	5	5

Tableau 4.5 : Résultats en % des virus retrouvés sur les trois stations par virus.

Les résultats mettent en évidence *une faible fréquence de la contamination virale* des eaux usées de station d'épuration, puisque dans l'ensemble, les résultats ne dépassent jamais 30 % des échantillons analysés à l'exception des rotavirus dans la station de Arradon (45 %). Il n'y a pas de grande différence d'une station à une autre ; les résultats les plus élevés concernent les rotavirus dans les trois stations, ensuite on trouve les VHA et les entérovirus ; quant aux calicivirus et astrovirus, ils sont détectés peu fréquemment (aucun astrovirus n'a été retrouvé dans les eaux d'Arradon et aucun calicivirus dans celles de Tohannic). Ces virus ont été surtout trouvés les dix premiers mois de l'étude, sauf dans la station d'Arradon et ceci malgré une recherche approfondie (réplicats, recherche des inhibiteurs, etc.).

4.6 Traitement statistique sur les relations entre indicateurs et la présence de virus

4.6.1 Relation entre les virus entériques

La comparaison des résultats obtenus sur les trois stations d'épuration a été faite **sur les moyennes**. Cette comparaison des moyennes entre les trois stations (t test) confirme une positivité statistiquement non significativement différente :

ARRADON - RANQUIN : $P_{\text{value}} = 1,0$
 ARRADON - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,332$
 RANQUIN - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,288$

De même, la comparaison des **écarts types** (F-test) donne des résultats équivalents traduisant une dispersion statistiquement non significativement différente des échantillons positifs enregistrés dans les trois stations d'épuration :

ARRADON - RANQUIN : $P_{\text{value}} = 0,402$
 ARRADON - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,846$
 RANQUIN - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,520$

Mais le fait que le test de comparaison des **médianes** (Kolmogorov-Smirnov test) démontre qu'il existe au contraire, une différence significative, *confirme que la distribution (fréquence d'apparition) de virus est différente entre les trois stations d'épuration*.

ARRADON - RANQUIN : $P_{\text{value}} = 0,035$
 ARRADON - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,0001$
 RANQUIN - TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 0,0001$

4.6.2 Relation entre les résultats analytiques sur les bactériophages.

Comparaison des valeurs des résultats d'Ifremer-Brest et du CRECEP

Le test des signes ($P_{\text{value}} = 0,646$) montre que les *valeurs obtenues par les deux laboratoires sur les échantillons analysés ne sont pas statistiquement significativement différentes. Ces résultats sont confirmés* par un autre test non paramétrique (signes / rangs ; $P_{\text{value}} = 0,732$) et un test paramétrique (t test ; $P_{\text{value}} = 0,448$).

Comparaison des trois stations d'épuration

Si l'on élimine le résultat « atypique » du 24 janvier 2000 (121 600, corroboré par Ifremer-Brest : 83 500) très supérieur à toutes les autres valeurs, les tests statistiques sur les moyennes, médianes et les variances montrent qu'il *n'y a pas de différence statistiquement significative entre les concentrations de bactériophages détectés dans chaque station d'épuration.*

Comparaison entre les virus et les bactériophages F-ARN-spécifiques

L'importance des chiffres obtenus pour les bactériophages F-ARN spécifiques et le nombre d'échantillons positifs en virus ne permettent pas de procéder directement à une analyse de série appariée. La solution retenue a consisté à coder les valeurs des bactériophages F-ARN spécifiques en trois classes (valeurs du CRECEP, non significativement différentes des données Ifremer-Brest) :

1 : $\leq 1\ 000$

2 : $> 1\ 000 - < 5\ 000$

3 : $> 5\ 000$

Puis, d'effectuer un calcul de fréquence assortie du pourcentage de représentation. Ces calculs ont été également réalisés sur les virus en prenant directement les résultats des analyses.

La comparaison des pourcentages de représentation montre *que pour chaque station d'épuration, la moyenne, la médiane et la distribution des deux micro-organismes sont significativement différentes.*

ARRADON : $P_{\text{value}} = 0,008$

RANQUIN : $P_{\text{value}} = 0,00001$

TOHANNIC : $P_{\text{value}} = 4,5140E-7$

En conclusion, il n'existe aucune similitude de comportement statistiquement significative entre les bactériophages F-ARN spécifiques et les échantillons positifs en virus.

4.7 Conclusion

Sur le plan analytique

D'une manière générale, le nombre de résultats positifs en virus apparaît relativement faible pour des eaux résiduaires épurées. Diverses raisons peuvent être imputables à ce résultat :

- La quantité de virus rejetée par la population pendant la période étudiée, les épidémies dans la population ont été peu importantes en début d'étude (données du réseau sentinelle) ; cependant le pic hivernal 2000-2001 a été exceptionnel au niveau des gastro-entérites en France et en Bretagne. On devrait donc retrouver ces virus dans les eaux usées. Cependant les pluies également très abondantes au cours de la période octobre 2000 - mars 2001 ont pu avoir un rôle de dilution des eaux usées et de ce fait des virus. Par ailleurs, de l'eau brute a pu être by-passée par certaines portes de relèvements avant l'arrivée dans la station d'épuration et être non prise en compte dans cette étude.
- *La quantité d'eau analysée* : chaque analyse a été réalisée à partir d'un échantillon de 30 ml d'eau de station d'épuration, le volume analysé par virus correspond seulement à 1,2 ml de l'échantillon de départ. Cependant des études antérieures ont montré la possibilité de retrouver plusieurs souches virales dans quelques microgrammes d'échantillon.
- *La qualité des eaux analysées* qui peut interférer avec la qualité de la PCR par la présence d'inhibiteurs : il a été déjà reporté que la concentration de l'échantillon, provoque également la concentration en inhibiteurs de la PCR
- *L'effet méthode* : certaines méthodes de concentration des particules virales peuvent favoriser la détection de certains types de virus. Ainsi par exemple l'ultracentrifugation favorise la détection des astrovirus (données Ifremer non publiées). Cependant la mise au point réalisée en début d'étude a permis de sélectionner la méthode la mieux adaptée.

Les résultats positifs enregistrés sous-estiment probablement le nombre réel de virus entériques présents dans les eaux usées.

Sur le plan qualitatif

Par rapport aux virus circulant dans la population (rotavirus, calicivirus, entérovirus, astrovirus, VHA), tous les virus ont été retrouvés dans les eaux usées. On peut noter la présence dans les eaux usées de VHA alors que ce virus n'a pas été trouvé dans les échantillons cliniques.

La fréquence de positivité en virus a été enregistrée majoritairement durant la période d'octobre 1999 à juin 2000 (en dehors du pic hivernal 2000-2001). Les eaux de rejets de la

station d'épuration de Tohannic sont moins contaminées virologiquement depuis mai 2000, que celles des autres stations (Arradon et Le Ranquin). Les rotavirus ont été majoritairement détectés dans les trois stations d'épuration (moyenne = 38 %), puis dans un ordre décroissant les entérovirus (17 %), le VHA (12 %), les calicivirus (5 %) et les astrovirus (2 %).

Le faible signal observé en PCR à partir des échantillons d'eaux usées n'a malheureusement pas permis de séquencer les virus trouvés dans ces prélèvements. Malgré les efforts analytiques (reprise des échantillons pour analyses par le CHU Dijon) les signaux se sont avérés trop faibles et le séquençage impossible. Il n'est donc pas possible de réaliser de comparaisons entre souches humaines et souches de l'environnement pour savoir lesquelles ont été retrouvées dans le milieu côtier.

Sur le plan épidémique

Deux événements majeurs ont été décrits dans cette région à cette période :

Une épidémie à entérovirus (premier semestre 2000) : ceux-ci ont été retrouvés essentiellement dans les eaux usées de Vannes-Tohannic à cette période ; bien qu'il ait été impossible de les séquencer, ils peuvent refléter un apport par la population à cette époque ; leur présence dans les eaux d'Arradon est moins fréquente ; par ailleurs sur la petite station du Ranquin dont le fonctionnement n'est pas optimal, des résultats positifs ont été trouvés jusqu'en octobre 2000.

Une épidémie exceptionnelle en gastro-entérites entre octobre 2000 et février 2001 qui passe totalement inaperçue dans nos prélèvements d'eaux usées. A cette époque dans la population (données sur les selles du réseau de gastro-entérites, CHU Dijon) on a observé la circulation de souches de calicivirus et de rotavirus. Or dans notre étude nous n'observons aucun calicivirus et seulement des prélèvements positifs en rotavirus à cette époque.

Seule l'explication d'une grande dilution des eaux par les pluies exceptionnelles simultanées semble pouvoir expliquer ces résultats : le niveau de détection de la technique ne serait alors pas suffisant pour mettre en évidence les virus présents à des concentrations faibles.

Enfin à l'opposé, il est également surprenant de constater **la présence assez fréquente de virus de l'hépatite A** dans les eaux usées et ceci en l'absence d'épidémie déclarée de cette maladie dans le secteur ou même de détection dans les selles. L'Institut de Veille Sanitaire consulté sur ces résultats, après enquête auprès de la DDASS n'a pu mettre en évidence de cas cliniques liés à ce virus dans ce secteur. Cette situation, déjà décrite par d'autres auteurs et dans d'autres régions en 2000-2001 (Gironde, Manche, Cotentin) pourrait refléter une circulation à bas bruit en France de ce virus dans la population.

4.8 Résultats dans les coquillages

Les indicateurs classiques de contamination bactériologique, *E. coli* et pour l'indicateur "viral" le bactériophage F-RNA spécifique, montrent que les zones ostréicoles étudiées sont de bonne qualité concernant essentiellement les gisements d'huîtres. En effet, les analyses effectuées sur les sites de Roguedas et de Crézic sont souvent en limite de détection pour *E. coli* et très faibles ou en limite de détection pour les bactériophages F ARN spécifiques.

En ce qui concerne les gisements de palourdes (tableau 4.6), on observe des différences importantes selon le site étudié :

- le secteur de palourdes de Rosvellec est contaminé avec une moyenne de 11 142 *E. coli*/100 g et de 17 565 F-RNA/100 g. A part pour les astrovirus, la contamination virale est faible. Cependant si l'on se réfère au pourcentage de virus retrouvé le secteur de Rosvellec montre une contamination moins fréquente que celui de Lern, alors que ce dernier, au vu des résultats bactériologiques, est beaucoup moins contaminé. Les palourdes de Lern sont les seuls coquillages de l'étude où a été détecté un VHA (au mois de mars 2000). Aucune corrélation n'est observable entre indicateurs bactériens et présence de virus. Le site est constitué principalement de vasières molles et de sable vaxeux ; la turbidité des eaux est élevée en situation hivernale de crue. L'hydrodynamisme y est faible et le temps de renouvellement des masses d'eaux supérieur à plusieurs semaines (Marcos *et al.*, 1994).

ROSVELLEC								LERN							
DATE	E.coli	FARNspécifiques	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus	DATE	E.coli	FARNspécifiques	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus
27/10/99	120000	32550					+	27/10/99	159	1350					
22/11/99	10600	21750						22/11/99	53	300			+		
20/12/99	3380	28650					+	20/12/99	57	9400			+		
24/01/00	4830	29500				+		24/01/00	147	9900					
21/02/00	5910	25450					+	21/02/00	47	4200			+		
20/03/00	1440	19600			+		+	20/03/00	30	1000		+	+		
19/04/00	33200							19/04/00	271	150			+		+
16/05/00	2086	12500						16/05/00	24	150			+		+
05/06/00	296	9050					+	05/06/00	11	150			+		
03/07/00	5510	4050						03/07/00	11	150			+		+
01/08/00	2090	10200						01/08/00	47	150			+		
19/09/00	163	5700						19/09/00	11	150					
17/10/00	56	15600					+	17/10/00	11	150			+		+
14/11/00	9660	23700						14/11/00	475	4500			+		
12/12/00	3250	1200						12/12/00	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
09/01/01	2090	14900						09/01/01	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
12/02/01	733	19200						12/02/01	36	230			+		+
13/03/01	5670	25000						13/03/01	nd	nd					
10/04/01	733	nd						10/04/01	30				+		
09/05/01	nd	nd					+	09/05/01	nd	nd					
moyenne	11142	17565						moyenne	89	2129					
total virus			0	0	1	2	6	total virus			0	1	13	0	5
% virus			0	0	5	10	30	% virus			0	5	72	0	27

Tableau 4.6 : Résultats microbiologiques obtenus sur les échantillons de palourdes de Rosvellec et du Lern.

- Le secteur Lern (Palourde point 2) : on note la présence fréquente d'astrovirus, mais surtout dans 76 % des cas la présence d'entérovirus. Il est intéressant de noter que, contrairement aux eaux usées, où ces virus étaient détectés en début 2000 (période épidémique), dans le cas des palourdes la présence des entérovirus persiste jusqu'en avril 2001. Ceci peut s'expliquer d'une part par la présence d'autres apports (rivière de Noyal non prise en compte dans l'étude des apports) mais surtout par la persistance du virus dans l'environnement. Sur ce secteur un prélèvement s'est trouvé positif en hépatite A. Ce site est constitué de sable fin et grossier plus ou moins envasé. L'hydrodynamisme y est plus important que sur le site de Rosvellec.

CREIZIC							ROGUEDAS								
DATE	E.coli	FARNspecificques	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus	DATE	E.coli	FARNspecificques	rotavirus	VHA	enterovirus	calicivirus	astrovirus
27/10/99	123	450			+		+	27/10/99	30	1950					
22/11/99	30	150					+	22/11/99	30	150			+		
20/12/99	30	150						20/12/99	57	150					
24/01/00	30	150			+			24/01/00	18	150			+		
21/02/00	30	150			+			21/02/00	30	150					
20/03/00	30	150					+	20/03/00	30	150					
19/04/00		150			+	+		19/04/00		150			+		
16/05/00	11	150					+	16/05/00	139	150			+		
05/06/00	12	150						05/06/00	11	150					
03/07/00	12	150						03/07/00	12	150					+
01/08/00	27	150						01/08/00	27	150					
19/09/00	12	150						19/09/00	27	150					
17/10/00	11	150					+	17/10/00	11	150			+		
14/11/00	139					+		14/11/00	1440	150				+	
12/12/00	12							12/12/00	99	150			+		
09/01/01	41	150						09/01/01	24	6800					
12/02/01	30	150						12/02/01	30	150					
13/03/01	30	150			+		+	13/03/01	32	150			+		
10/04/01	30							10/04/01	30						
09/05/01								09/05/01							
moyenne	36	169						moyenne	115	619					
total virus			0	0	5	2	6	total virus			0	0	7	2	0
% virus			0	0	25	10	30	% virus			0	0	35	10	0

Tableau 4.7 : Résultats microbiologiques obtenus sur les échantillons d'huîtres des sites du Créizic et Roguedas.

En ce qui concerne les échantillons d'huîtres (tableau 4.7), ils proviennent de secteurs propres (Le Créizic, classé A et Roguedas en limite du secteur B). Les résultats en *E. coli* et en bactériophages F ARN spécifiques sont souvent proches de la limite de détection. Ceci est particulièrement vrai pour Créizic (deux valeurs en *E. coli* légèrement au-dessus de la limite de détection et une valeur pour les phages dépassant le seuil de détection). Sur ces deux secteurs, le temps de renouvellement est de l'ordre de la semaine (Marcos *et al.*, 1994).

Cependant, le nombre de virus retrouvé sur ce secteur est supérieur à celui du secteur de Roguedas qui par ailleurs affiche des valeurs en *E. coli* légèrement plus élevées. Comme précédemment décrit, la présence d'entérovirus est observée sur de nombreux échantillons alors que calicivirus et rotavirus restent en nombre très limité.

L'analyse de l'ensemble des résultats s'est effectuée sur la période de l'étude soit 18 mois d'échantillonnage correspondant à 40 analyses d'huîtres et 38 analyses de palourdes pour chacun des paramètres suivants : *E. coli*, phages ARN spécifiques et les cinq virus recherchés. Sur le tableau 4.8 est reporté le pourcentage de résultats positifs pour chacun des virus recherchés dans les différents secteurs d'étude.

	Rosvellec	Lern	Créizic	Roguedas
N	17	17	18	17
EV total	1	13	5	7
EV %	5	74	25	35
VHA total	0	1	0	0
VHA %	0	5	0	0
CV total	2	0	2	2
CV %	10	0	10	10
AV total	6	5	6	0
AV %	30	18	30	0
RV total	0	0	0	0
RV %	0	0	0	0

Tableau 4.8 : Pourcentage de virus entériques trouvés par point de prélèvements de coquillages.

Les figures suivantes présentent la **répartition mensuelle** de cette série de données pour chacun des virus étudiés. L'analyse des résultats est présentée de façon globale sans tenir compte des années afin d'essayer de souligner la saisonnalité des phénomènes de contamination virale de l'environnement littoral, enregistrés dans les coquillages.

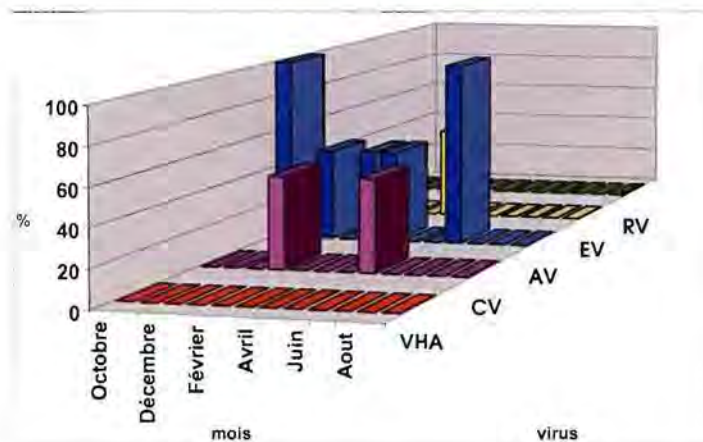


Figure 4.12 : Contamination virale dans les palourdes de Rosvellec.

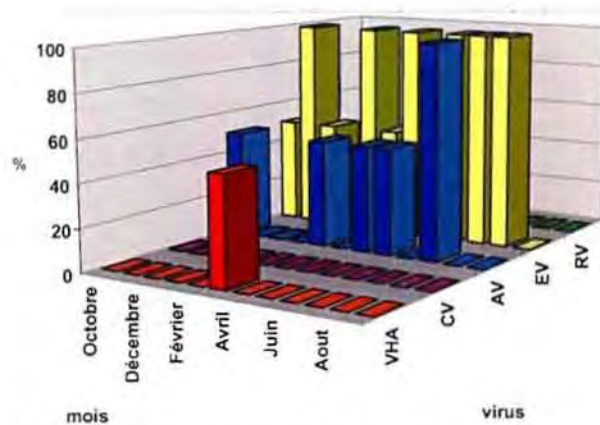


Figure 4.13 : Contamination virale dans les palourdes de Lern.

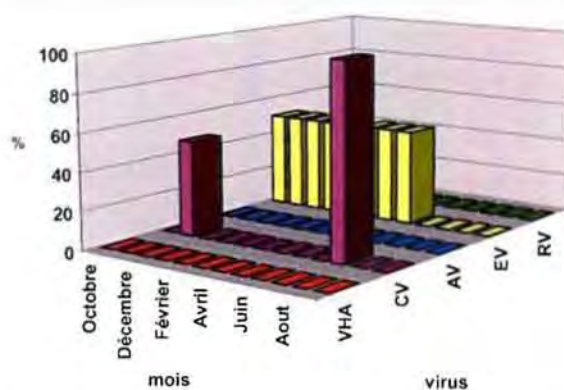


Figure 4.14 : Contamination virale dans les huîtres de Roguedas.

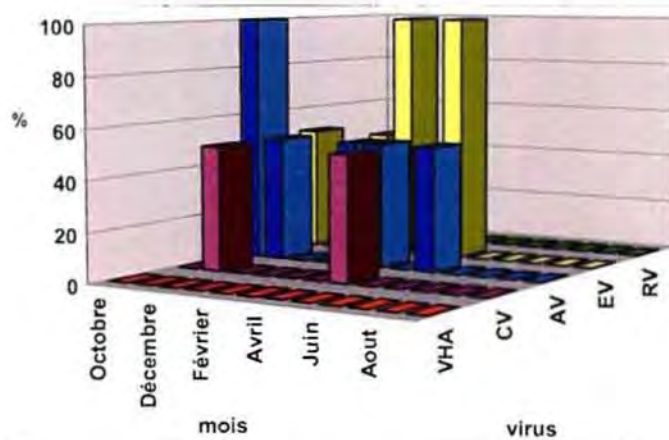


Figure 4.15 : Contamination virale dans les huîtres de Crézic.

Aucun VHA, ni rotavirus n'ont été retrouvés dans les huîtres.

4.9 Discussion – Conclusion

L'analyse de ces résultats met en évidence :

- la faible contamination virale des palourdes de Rosvellec issues d'un secteur classé C et D : ce résultat est surprenant et il serait intéressant de voir si la présence d'autres polluants (par exemple chimiques), ne pourrait pas être responsable de cette « absence » de virus. Aucun inhibiteur de la PCR n'a été mis en évidence, et les extractions ont été réalisées plusieurs fois pendant les mois d'hiver.
- Le manque de caractère de « saisonnalité » de la présence de virus : on ne remarque pas, comme dans d'autres secteurs étudiés (lagunes méditerranéennes) des effets liés aux pluies ou aux épidémies.
- La présence fréquente d'entérovirus dans tous les coquillages même dans ceux issus de secteur propre (classé A).
- Les amorces de RT-PCR utilisées pour l'environnement étaient les mêmes que celles utilisées pour les échantillons cliniques et ne peuvent donc être responsables de ce résultat.

Ces résultats vont dans le sens de ceux obtenus dans les eaux usées, à savoir qu'il semble que l'impact des apports de virus par la population au golfe soit limité. En effet on observe :

- Un faible pourcentage de virus trouvé dans les coquillages comme dans les eaux usées. Ces virus sont très vraisemblablement en faible concentration car il a été impossible de séquencer les souches détectées (comme pour les eaux usées).
- Un manque de « saisonnalité » marqué dans les résultats sur les coquillages, malgré une période « favorable » d'excrétion de virus (épidémie hivernale 2000-2001 dans la population). On pourrait supposer que la dilution des eaux usées a diminué les concentrations de virus rejetés ; la limite de détection des analyses n'étant pas alors suffisante pour les détecter dans les eaux usées et la dilution dans le golfe ayant disséminé ces virus à bas niveau. Par ailleurs les virus ont également pu être piégés par les boues de station et les sédiments vaseux des rivières avant d'arriver sur les zones conchylicoles.

Cependant le cas des entérovirus contredit en partie ces résultats ; sauf à considérer que les entérovirus sont :

- mieux détectés que les autres virus par la méthode (niveau de détection plus bas) : en effet, les amorces situées dans la région 5'NC permettent d'amplifier efficacement la majorité des souches car les séquences sont très conservées dans cette partie,
- peuvent persister plus longtemps que d'autres virus entériques dans l'environnement. Il n'existe que peu de données sur la persistance des différents virus entériques humains dans l'environnement. Cependant les entérovirus semblent être parmi les virus les plus résistants (Melnick *et al.*, 1995). Le même auteur donne également des temps de survie allant jusqu'à 130 jours dans l'eau de mer et 90 jours dans les huîtres (Melnick *et al.*, 1979).
- peuvent être excrétés plus longtemps et en plus grand nombre par une population porteuse, saine ou malade. Si l'on se rapporte aux résultats obtenus sur les selles de malades, les entérovirus représentaient seulement 13/98 des virus détectés chez les malades (troisième rang après les calicivirus et les rotavirus) sur l'ensemble des prélèvements positifs. Le manque de données quantitatives tant en terme d'épidémiologie qu'en terme de concentration dans les prélèvements (selles, eaux, coquillages) ne permet pas d'aller plus loin dans l'interprétation de ces résultats.

5 Outils d'aide à la décision et conclusion

Au vu des résultats obtenus, nous avons décidé d'utiliser *in fine* un modèle hydrodynamique comme outil d'aide à la compréhension et à la décision. Ce modèle permet en effet de simuler l'impact des rejets en *E. coli*, bactériophages et virus entériques afin d'évaluer l'effet sur la qualité microbiologique des coquillages de la zone d'étude. En ce qui concerne les virus, le modèle "calicivirus" a été retenu, car ce virus est couramment impliqué dans des pathologies liées aux coquillages.

Il est à souligner que **ce type d'approche pour les virus est purement théorique** puisque de nombreuses imprécisions existent aussi bien sur la quantité de virus rejetés par la population, que sur leur comportement en mer ou leur taux de concentration dans les coquillages.

Cependant la disponibilité d'un modèle Ifremer sur le secteur, ainsi que la possibilité de le faire tourner dans des conditions assez vraisemblables pour *E. coli*, et assez réalistes pour les bactériophages, nous a incité à faire cette démarche.

5.1 Utilisation d'un modèle de dispersion pour simuler l'impact des rejets

5.1.1 Présentation du modèle

Un modèle hydrodynamique à petite maille (80 m) avait été précédemment construit sur le site du Golfe du Morbihan (Ifremer/AO F. Dumas). Il est inclus dans des modèles à moyenne et grande mailles couvrant la région sud Bretagne. Ce modèle de 80 m tient compte aussi bien de la morphologie de la baie (chenaux étroits, zones découvrantes importantes), que du devenir en mer des microorganismes.

Les modèles hydrodynamiques sur ce secteur sont des modèles en deux dimensions dans le plan horizontal (2DH). Ils résolvent les équations mathématiques pour l'hydrodynamique appelées équations de Saint-Venant, décrivant à chaque point un courant moyenné sur la profondeur. Les conditions aux limites qui sont imposées sont l'élévation de la marée (données par le modèle mondial FES 99) et les flux déchargés par les principales rivières et rejets d'eaux usées (données Ifremer). Le modèle détaillé (80 m, mars 2DH, Ifremer) est un compromis entre les coûts acceptables d'informatiques et la nécessité de prendre en compte la configuration particulière du secteur (chenaux...). Précisons enfin que le modèle prend en compte des valeurs de turbidité moyennes sur l'ensemble du secteur.

Le modèle de dispersion/advection/microbiologie est semblable à celui décrit par Salomon et Pommepuy (1990). Le modèle microbiologique intègre un terme résumant le devenir biologique des microorganismes. Ce devenir - lié à des lois biologiques faisant appel aux conditions environnementales contraignantes⁴ - peut être décrit par une simple loi, qui est actuellement suffisante dans l'état des connaissances, pour avoir un niveau raisonnable de vraisemblance. Les équations qui décrivent le devenir des bactéries ou virus sont les mêmes que pour un quelconque contaminant dissous, exception faite du terme "T90" - temps nécessaire pour que 90 % des microorganismes ne soient plus cultivables - qui prend en compte le devenir des organismes vivants (Salomon et Pommepuy, 1990).

Equations de Saint Venant :

$$\frac{\partial u}{\partial t} + \frac{u}{R \cos \phi} \frac{\partial u}{\partial \phi} + \frac{v}{R} \frac{\partial u}{\partial \phi} - \frac{uv}{R} \operatorname{tg} \phi - 2\Omega v \sin \phi + g u \frac{\sqrt{u^2 + v^2}}{K_r^2 H^{4/3}} + \frac{g}{R \cos \phi} \frac{\partial \zeta}{\partial \lambda} - \varepsilon \nabla^2 u + \frac{\tau_\lambda}{\rho H} + \frac{\alpha g H}{2} \frac{\partial S}{R \cos \phi \partial \lambda} + \frac{\partial P_a}{\rho R \cos \phi \partial \lambda} = 0$$

$$\frac{\partial v}{\partial t} + \frac{u}{R \cos \phi} \frac{\partial v}{\partial \lambda} + \frac{v}{R} \frac{\partial v}{\partial \phi} + \frac{u^2}{R} \operatorname{tg} \phi - 2\Omega u \sin \phi + g v \frac{\sqrt{u^2 + v^2}}{K_r^2 H^{4/3}} + \frac{g}{R} \frac{\partial \zeta}{\partial \phi} - \varepsilon \nabla^2 v + \frac{\tau_\phi}{\rho H} + \frac{\alpha g H}{2} \frac{\partial S}{R \partial \phi} + \frac{\partial P_a}{\rho R \partial \phi} = 0$$

$$\frac{\partial \zeta}{\partial t} + \frac{1}{R \cos \phi} \frac{\partial H u}{\partial \lambda} + \frac{\partial H v}{R \partial \phi} - \frac{H v}{R} \operatorname{tg} \phi = 0$$

⁴ Conditions pénalisantes en mer pour ces microorganismes d'origine intestinale : lumière solaire, température de l'eau, salinité, compétition (pour les bactéries), prédation...etc.

$$\frac{\partial HC}{\partial t} + \frac{1}{R \cos \phi} \frac{\partial (H(uC - K_{\lambda} \frac{\partial C}{R \cos \phi \partial \lambda}))}{\partial \lambda} + \frac{\partial (Hv - K_{\phi} \frac{\partial C}{R \partial \phi})}{R \partial \phi} - \frac{HvC}{R} \operatorname{tg} \phi = \text{decay}$$

- u, v : Composante est et nord des courants
 ζ : Elevation de la surface de la mer
 H : Hauteur d'eau
 C : Concentration
 φ, λ : Latitude et longitude
 g : gravité
 R : Rayon de la terre
 K_λ, K_φ : Coefficient diffusion dans les deux directions (est et nord)
 K_r : Coefficient de strikler
 P_a : Pression atmosphérique
 τ_f : Coefficient de frottement au fond

La décroissance est proportionnelle à c :

$dc/dt = Kc$, où k peut être directement relié au T90 (-temps nécessaire pour que 90 % de la concentration initiale diminue). $T90 = 2.3/k$.

Différents T90 ont été utilisés pour *E. coli*, les bactériophages et les calicivirus i.e respectivement 2 jours, 7 jours, 4 et 30 jours.

5.1.2 Rappel des valeurs mesurées dans les eaux et les coquillages

Contamination des rejets :

Le tableau ci-dessous représente les valeurs moyennes en *E. coli* et bactériophages dans les échantillons collectés chaque mois dans les trois stations d'épuration (58 échantillons).

	<i>E. coli</i>	F+RNA phages
Tohannic	$1.9 \cdot 10^5$ ($1.7 \cdot 10^4 - 8.0 \cdot 10^5$)	$2.8 \cdot 10^3$ ($2.0 \cdot 10^2 - 1 \cdot 10^4$)
Arradon	$8.4 \cdot 10^4$ ($1.9 \cdot 10^3 - 5.4 \cdot 10^5$)	$6.8 \cdot 10^3$ ($7.0 \cdot 10^1 - 8.3 \cdot 10^5$)
Le Ranquin	$8.0 \cdot 10^5$ ($1.7 \cdot 10^4 - 1.0 \cdot 10^6$)	$5.4 \cdot 10^3$ ($4.0 \cdot 10^2 - 2.4 \cdot 10^4$)

Tableau 5.1 : Concentration moyenne en *E. coli* (UFC/100 ml) et bactériophages (UFP/100 ml) dans les trois stations d'épuration (minimum- maximum).

Par ailleurs, la présence en calicivirus a été détectée dans 20 % des échantillons (octobre, novembre et mars).

Contamination des coquillages :

Cette contamination a été décrite dans un chapitre précédent, auquel on se reportera pour plus de précision. Le tableau 5.2 résume les résultats trouvés en virus pendant l'étude dans les

classes définies par les directives européennes pour *E. coli* et pour les bactériophages dans les deux classes données par la limite de détection (150 PFU/100 g) :

	Concentration/100 g	CV+	CV -
<i>E. coli</i>	< 230	70 %	70 %
<i>E. coli</i>	230 < X < 4 600	30 %	15 %
<i>E. coli</i>	> 4 600	0 %	15 %
Total		100 %	100 %

	Concentration/100 g	CV+	CV -
F+ spécifique	< 150	60 %	60 %
F+ spécifique	> 150	40 %	40 %
Total		100 %	100 %

Tableau 5.2 : Pourcentage des résultats positifs ou négatifs en calicivirus par rapport à un niveau de contamination fécale (*E. coli* et bactériophages F+RNA spécifiques).

5.1.3 Valeurs simulées dans les rejets

Simulation des flux d'E. coli et bactériophages

Les simulations ont été réalisées en condition hivernale, les flux pour *E. coli*, les bactériophages F+ RNA spécifiques correspondent à l'épidémie de diarrhées essentiellement virales observée en France pendant cette période (hiver 2000-2001). Les rejets d'eaux usées arrivant par les stations d'épuration après traitement, ont été calculés, et sont reportés sur la table 5.3

Simulation des flux de calicivirus

La mesure actuelle des virus dans l'environnement ne donne que des informations qualitatives de la présence des calicivirus. Pour calculer le flux de calicivirus, nous avons pris le nombre de malades calculé à partir de données du "Réseau Sentinelle" et les hypothèses suivantes :

1. La population dans la région est de 64 000 habitants.
2. Le taux d'attaque 6 %.
3. Un malade a trois selles/jour.
4. La concentration en calicivirus dans les selles est de 10^5 CV/g (Atmar, 1998).

	Tohannic	Arradon	Le Ranquin
<i>Population nominale</i>	60 000	2 500 - 7 000	1 500
<i>Débit (m³/s)</i>	9 500	373 - 1 200	500

<i>E. coli</i> /s	$2.3 \cdot 10^8$	$8.0 \cdot 10^7$	$3.5 \cdot 10^7$
Phages/s	$3.0 \cdot 10^6$	$8.0 \cdot 10^5$	$1.6 \cdot 10^5$
Calicivirus/s	$1.0 \cdot 10^6$	$4.0 \cdot 10^4$	$2.0 \cdot 10^4$

Table 5.3 : Capacité des stations d'épuration (population et débit moyen m³/jour) et flux calculés (par sec.) pour *E. coli*, les bactériophages et les calicivirus.

La durée de l'épidémie simulée - et de ce fait l'excrétion de virus- est de 20 jours. Après cette date, nous avons considéré que le rejet de virus était terminé et le modèle ne prend alors en compte qu'une décroissance virale. Les T90s testés varient entre 24 heures et 30 jours. En effet, des études précédentes reportent pour *E. coli* des T90 de 1 jour (Pommeypuy *et al.*), pour les bactériophages et les virus (en culture) un T90 voisin de 7 jours (Walt and Sobsey, 2001 ; Girones *et al.*, 1989 ; Bosch *et al.*, 1993) tandis que le signal viral en RT-PCR persiste très longtemps, ce qui nous a conduit à prendre un T90 pour les virus de 30 jours (Le Guyader, données non publiées).

5.1.4 Résultats

Les figures jointes montrent quelques exemples de résultats de simulations. Les concentrations reportées concernent l'eau. Ce sont :

- des moyennes dans l'eau en *E. coli*, phages et calicivirus (moyenne sur la verticale),
- concentrations observées après 20 jours de rejets continus,
- les valeurs prennent en compte les T90.

Les figures rapportent les concentrations calculées dans l'eau en bactérie, phages et virus. Afin de calculer les valeurs correspondantes dans les coquillages nous avons pris un facteur de conversion de 8 : ce facteur a été établi à partir des données statistiques publiées par D. Lees *et al.* (1995)

La directive EC indique, pour une classification en zone A, que 90 % des valeurs doivent être < 230 *E. coli*/100 g et pour les zones B < 4 600 *E. coli*/100 g (dans la chair de coquillages). Ceci correspondrait à des valeurs dans le coquillage respectivement à environ 30 *E. coli*/100 g et 600 *E. coli*/100 g, d'après D. Lees *et al.* (2000).

Sur le tableau 5.4 sont reportées les valeurs obtenues pour chaque paramètre (*E. coli*, phages, virus) aux points 1, 3 et 4 dans l'eau et les coquillages d'après ces calculs.

Point	Classement Remi		<i>E. coli</i>	Phages	Virus
1		eaux	158 - 5 000	10 - 10 000	10 - 100
1	C	coquillages	1200 - 38 000	80 - 80 000	77-770
3		eaux	6 - 32	10 - 100	0.6 - 3
3	A	coquillages	48 - 243	80 - 800	5 - 25
4		eaux	0.1 - 10	0.3 - 10	0.2 - 0.1
4	A	coquillages	0.8 - 80	2 - 80	0.2 - 0.8

Tableau 5.4 : Concentrations calculées (exprimées en UFC/100 ml ou UFP/100 ml dans l'eau, et UFC/100 g ou UFP/100 g dans le coquillage).

Résultats des simulations sur les concentrations d'*E. coli*

Les simulations d'impact de flux d'*E. coli* pour les trois stations d'épuration sont présentées sur les cartes A et B : exemple d'un rejet de 50 jours (A) ou 20 jours (B), T90 = 24 heures, cartes des concentrations maximales sur le dernier cycle de marée.

Les concentrations calculées en *E. coli* dans l'eau varient de 2.5 log UFC/100 ml, directement sous le rejet des stations d'épuration en fond de baie, jusqu'à -1.00/100ml, en entrée de baie. Les résultats de simulation sont en accord avec les résultats de la surveillance REMI dans ce secteur classé en A [huîtres : points 3 (Roguedas) et point 4 (Créizic)].

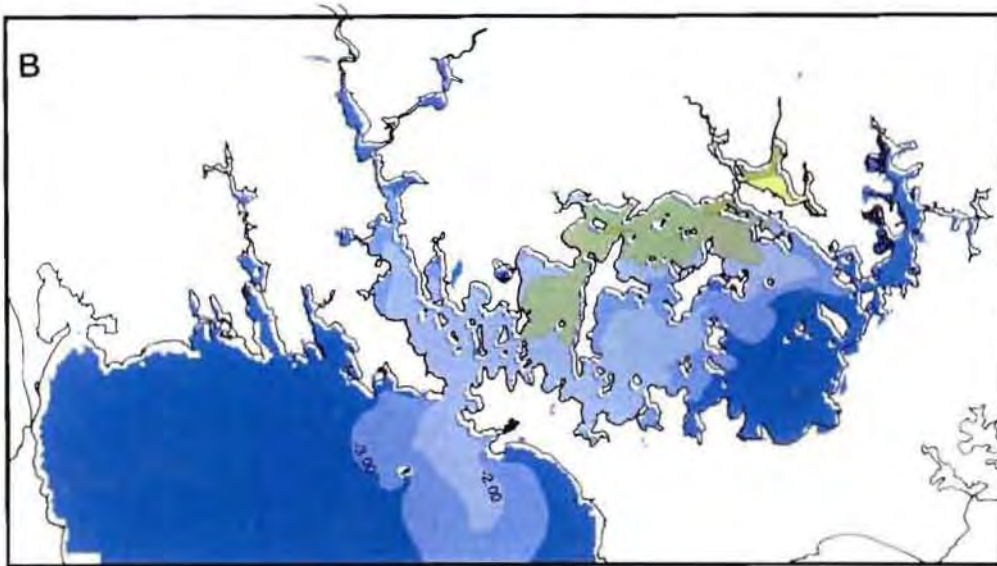
De même sur le point 1, pour les concentrations calculées par le modèle ou mesurées pendant l'étude (point 1 Rosvellec), les résultats sont concordants : cette zone est classée C et D et les palourdes interdites au ramassage et à la consommation. Ces résultats comportent les données précédemment obtenues sur le golfe par modélisation (Marcos *et al.*, 1995).

Résultats des simulations sur les concentrations en bactériophages et virus

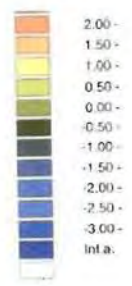
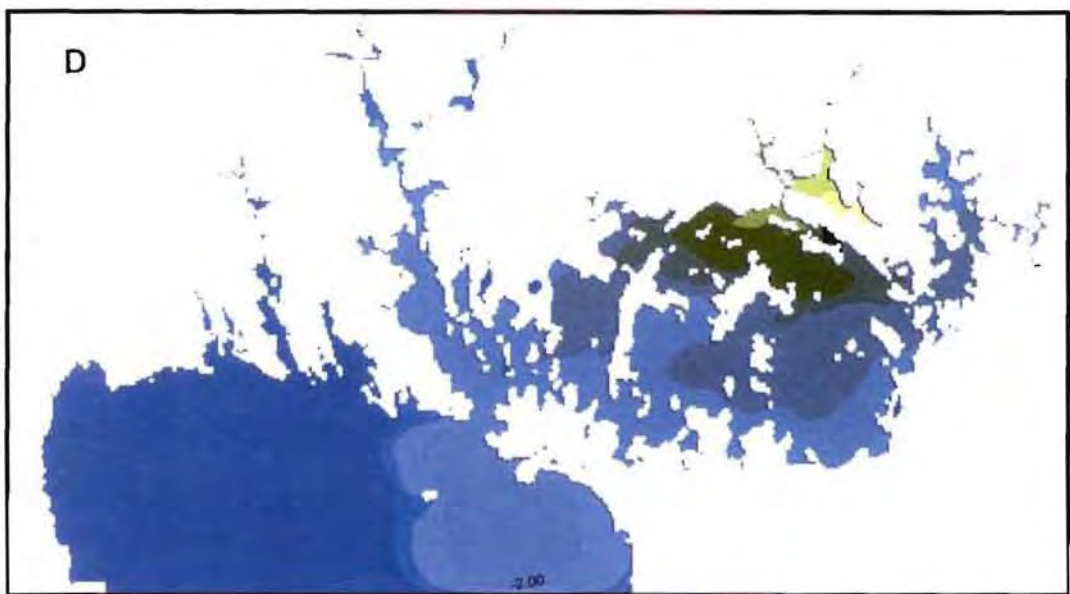
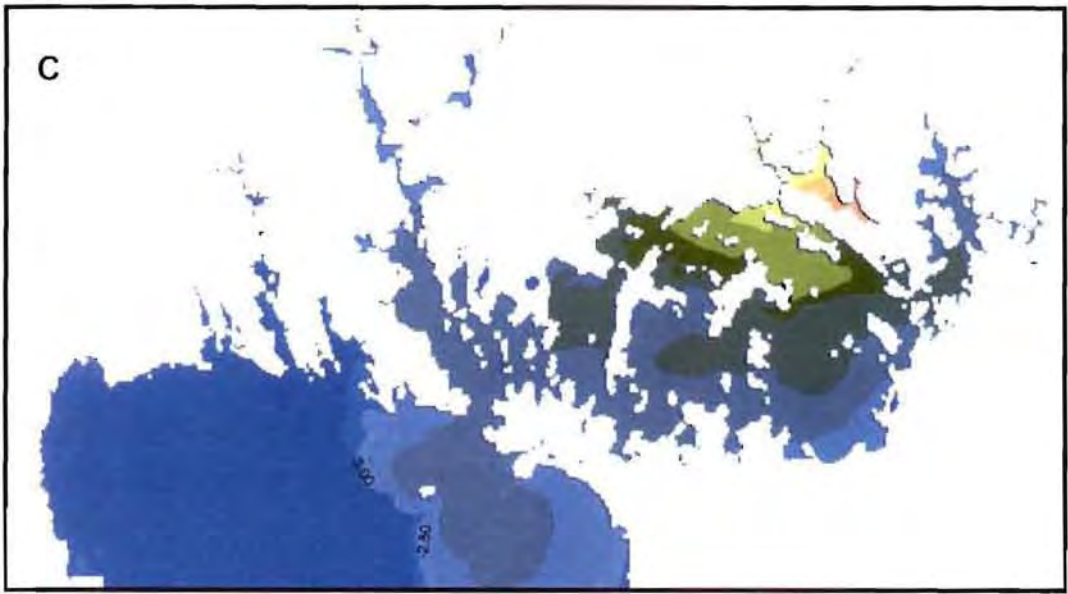
Sur les figures jointes sont reportés, les dispersions des bactériophages et virus.

Simulation de l'impact des stations d'épuration sur les concentrations :

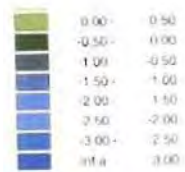
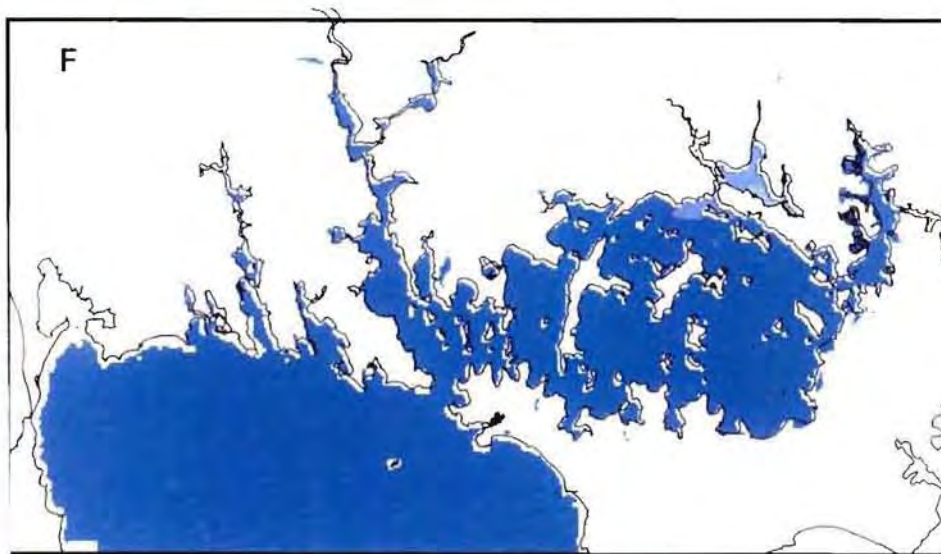
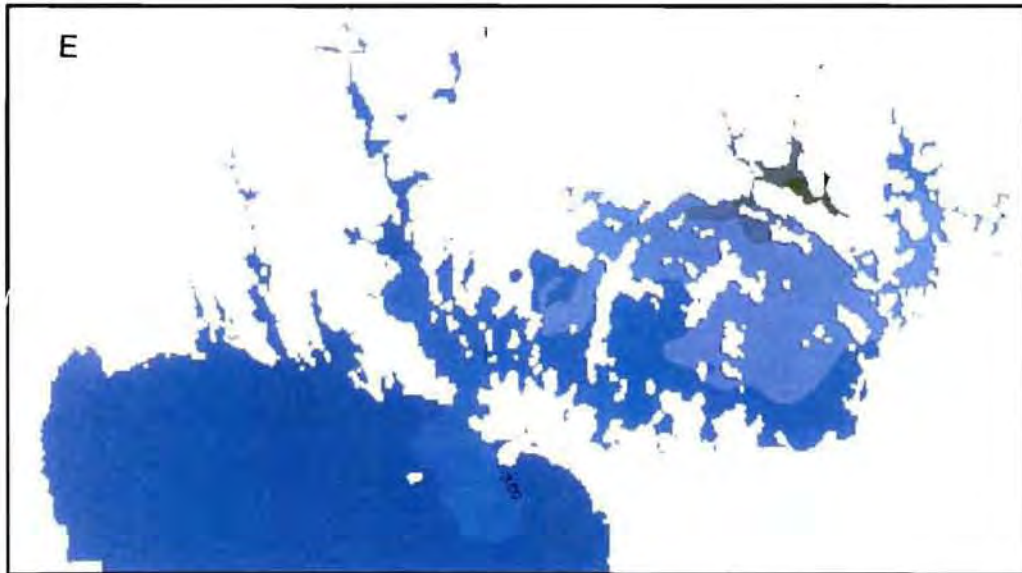
- en bactériophages dans l'eau : rejets de 50 jours (C) et de 20 jours (D), T90 = 7 jours, cartes des concentrations maximales sur le dernier cycle de marée,
- en calicivirus : après 50 jours (E) et 20 jours (F) d'une épidémie de gastro-entérites virales dans la population ; T90 = 30 jours, cartes des concentrations maximales en virus dans l'eau sur le dernier cycle de marée.



Simulations *E. Escherichia coli*



Simulation phages



Simulations virus

Les concentrations en bactériophages au point 1 sont très élevées. Ces mesures sont en concordance avec nos analyses maximum 10^4 UFP/100 ml dans l'eau, ce qui correspondrait à environ $8 \cdot 10^4$ UFP/100 g de coquillages (si l'on admet que le taux de concentration des bactéries et des virus est le même). Ceci est bien évidemment une hypothèse qui semble cependant validée par nos résultats en bactériophages obtenus dans les coquillages au cours de l'étude (tableau 5.5).

Dans l'ensemble de la baie, la dilution des bactériophages et des virus est importante et les niveaux détectables dans les coquillages correspondent soit aux limites de détection des mesures (pour les bactériophages), soit ils sont très en dessous de la limite de détection des virus par PCR.

5.1.5 Discussion des résultats

Sur le tableau 5.5, sont reportées les comparaisons entre les résultats calculés par le modèle et ceux mesurés pendant l'étude (pour *E. coli* et les bactériophages).

Il est intéressant de montrer que, d'une manière générale il y a une bonne concordance des calculs et des mesures :

- **Au point 1**, pour *E. coli* et les bactériophages, 100 % des résultats trouvés sont inférieurs aux valeurs maximales données par le modèle.
- **Au point 3**, 95 % des valeurs pour *E. coli* sont inférieures à 243 UFC/100 g ce qui correspond à une zone A. Pour les bactériophages, 90 % des résultats trouvés sont inférieurs aux valeurs maximales données par le modèle.
- **Au point 4**, 95 % des valeurs pour *E. coli* sont inférieures à 80 UFC/100 g. Les résultats REMI confirment ces résultats. Pour les bactériophages, 95 % des résultats trouvés sont inférieurs à la limite de détection.

Point	<i>E. coli</i> (simulation)	<i>E. coli</i> (mesure)	Phages (simulation)	Phages (mesure)
1	Mini = 1200 Maxi = 38 000	75 % > 1 200 100 % < 38 000	Mini = 80 Maxi = 80 000	100 % > 80 100 % < 80 000
3	Mini = 48 Maxi = 243	60 % > 48 (40 % < 48) 95 % < 243 (5 % > 243)	Mini = 80 Maxi = 800	90 % < 800
4	Mini = 0.8 Maxi = 77	100 % > 0.8 95 % < 80	Mini = 2 Maxi = 80	95 % < LD

Table 5.5 : Comparaison des données du modèle aux concentrations mesurées dans les coquillages (UFC ou UFP /100 g)

Pour conclure, le modèle de simulation donne des résultats très proches de ceux trouvés dans les coquillages durant la période d'étude pour *E. coli* et les bactériophages. La simulation concernant les calicivirus, qui n'est qu'un exercice très approximatif, semble néanmoins confirmer nos résultats, c'est-à-dire la faible contamination virale des coquillages par ce virus.

Ce premier exercice de simulation permet de conclure à l'intérêt d'une telle approche de modélisation comme outil d'aide à la décision sur un secteur conchylicole.

Il est néanmoins évident qu'au vu des approximations actuelles dues au manque de connaissances sur les virus entériques, des mesures complémentaires mériteraient d'être réalisées. Il s'agirait en particulier de posséder :

- des informations quantitatives sur le nombre de virus présent dans les selles de malades,
- des informations sur le portage dans la population
- des données quantitatives sur les virus présents dans les eaux usées et les coquillages
- le taux de concentration des virus dans les coquillages
- les temps de survie évalués pour des détections en RT-PCR qui mettent en évidence la présence de génome viral.

5.2 Conclusions

L'étude réalisée sur le secteur du Golfe du Morbihan avait pour but d'étudier les apports de microorganismes par les stations d'épuration et les conséquences sur les niveaux de contamination des coquillages dans une zone littorale.

Ces résultats ont été associés à une approche épidémiologique basée sur des données d'incidence de différentes souches virales circulant dans la population et dans l'environnement (entérovirus, rotavirus, astrovirus, calicivirus humains, virus de l'hépatite A). Par ailleurs, ces résultats ont par ailleurs été évalués au travers d'informations complémentaires telles que la concentration en indicateurs de contamination fécale (*Escherichia coli* et bactériophages).

L'étude épidémiologique, avait pour but de comparer les souches virales entre population humaine et environnement, et d'établir un profil épidémiologique pour chacun des virus tant en terme de symptômes associés que de facteurs de risque. Les résultats de l'enquête épidémiologique ont montré que pour ce qui est des facteurs de risque, **la consommation de coquillages était plus fréquente chez les cas de diarrhée aiguë mais n'a pas constitué un facteur de risque spécifique aux diarrhées virales**. En revanche, la notion de contagage par un enfant d'âge < 3 ans était significativement associée à une diarrhée virale. Il est cependant important de noter les *biais intervenus* dans l'inclusion des sujets durant l'hiver 99/2000 ainsi que dans la sélection des témoins.

Globalement, il ressort de cette étude et des résultats épidémiologiques, qu'il est nécessaire de réunir l'ensemble des pré-requis à une analyse statistique rigoureuse avant et durant toute la durée de l'étude. Il est en effet indispensable de disposer de données épidémiologiques chez des témoins tant pour assurer des comparaisons fiables et précises entre facteurs de risque, que pour estimer la diffusion et le portage des virus dans la population générale. La notion de risque relatif ou d'Odds-Ratio lié à un agent pathogène est en effet conditionnelle d'une part à la présence d'échantillons de cas et de témoins appariés (en âge en localisation géographique, voir en sexe pour certaines pathologies), et d'autre part à des tailles d'échantillons relativement importantes afin d'avoir une sensibilité de test statistiques optimale.

Les analyses microbiologiques ont été réalisées sur des échantillons de selles : la détection et le typage des principaux virus responsables de gastro-entérites circulant dans la population de la région de Vannes ont été effectués d'octobre 1999 à juin 2001 : rotavirus des groupes A et C, calicivirus humains, astrovirus, adénovirus 40 et 41 ainsi que des souches d'entérovirus et d'hépatite A.

La population concernée par cette étude peut être répartie en deux groupes principaux : d'une part, des patients consultant un médecin généraliste pour gastro-entérite aiguë (cas) ou pour une autre raison (témoins) et d'autre part, des patients consultant au centre hospitalier de Vannes pour gastro-entérite aiguë. Le recueil des prélèvements a reposé exclusivement sur le volontariat des différents partenaires de santé. A ceci il faut ajouter

des patients pour lesquels une analyse des selles a été prescrite et réalisée par les laboratoires d'analyse médicale de ville.

D'une façon générale, cette étude montre l'importance des virus entériques, plus de 35 % des selles prélevées au cours de toute l'étude contenait au moins un virus, les 4 principaux virus de gastro-entérite représentant 30 % et les entérovirus 5 %.

D'une façon globale, les calicivirus et les rotavirus ont été trouvés prédominants (23 et 11 % des cas consultant en médecine générale respectivement et 21 et 24 % des patients consultant au centre hospitalier) tandis que les astrovirus et les adénovirus 40 et 41 ont été rarement détectés (inférieur à 2 % des cas). Le typage des souches de rotavirus et de calicivirus a montré une co-circulation sur cette région de différentes souches tant pour les rotavirus que pour les calicivirus. Le séquençage des souches de calicivirus a souligné l'importance du genre Norwalk-like et tout particulièrement du génogroupe II. De plus, lors de cette étude, il a été observé des souches présentant des particularités moléculaires posant problème pour leur dépistage (difficulté d'amplification du gène codant la polymérase pour les souches proches du virus Norwalk) ou leur classification (variants génogroupe II). Ces nouveaux variants pourraient contribuer à la diversité des calicivirus. Ce résultat tend à montrer que l'étude approfondie de l'épidémiologie moléculaire de virus détectés sur une région donnée peut permettre d'appréhender la circulation de ces virus à plus grande échelle.

Les résultats obtenus sur la contamination des eaux usées mettent en évidence la stabilité de la contamination fécale issue de ce type de rejets : concentrations importantes en indicateur classique de contamination fécale (*E. coli*) et en bactériophages (F-RNA spécifique) quelque soit la saison. Par ailleurs une faible contamination virale des eaux usées de station d'épuration a été observée car, dans l'ensemble, la fréquence en virus est inférieure à 30 % à l'exception des rotavirus dans la station de Arradon (45 %). Il n'y a pas de grande différence d'une station à une autre. Cependant les eaux de rejets de la station d'épuration de Tohannic étaient moins contaminées virologiquement à partir de mai 2000, que celles des autres stations (Arradon et Le Ranquin). Les rotavirus ont été majoritairement détectés dans les trois stations d'épuration (moyenne 38 %), puis dans un ordre décroissant les entérovirus (17 %), le VHA (12 %), les calicivirus (5 %) et les astrovirus (2 %).

D'une manière générale, le nombre de résultats positifs en virus apparaît relativement faible pour des eaux résiduaires épurées. Diverses raisons peuvent être imputables à ce résultat :

- *la quantité d'eau analysée* : chaque analyse a cependant été réalisée à partir d'un échantillon de 30 ml d'eau de station d'épuration, le volume analysé par virus correspond seulement à 1,2 ml de l'échantillon de départ. Cependant des études antérieures ont montré la possibilité de retrouver plusieurs souches virales dans quelques microgrammes d'échantillon.

- *la qualité des eaux analysées* qui peut interférer avec la qualité de la PCR par la présence d'inhibiteurs : il a été déjà reporté que la concentration de l'échantillon, provoque également la concentration en inhibiteurs de la PCR
- *La qualité des filières de traitement* qui actuellement assurent une meilleure décantation des boues que précédemment. La raison principale est la mise aux normes des stations d'épuration en accord avec les nouvelles directives européennes et le renforcement du programme de contrôle par les exploitants et les services publics.

La fréquence de positivité des virus entériques observée dans ces eaux résiduaires épurées constitue néanmoins un élément favorable à une mise en place d'un contrôle des eaux de rejet des stations d'épuration au regard du risque sanitaire encouru, lorsque ce rejet se fait à proximité de parcs conchylicoles et lorsque l'on est en période épidémique (pathologie d'hépatite ou de gastro-entérites dans la population).

Dans les zones conchylicoles, les indicateurs classiques de contamination bactériologique, *E. coli* et pour l'indicateur "viral", le bactériophage F-RNA spécifique, montrent que les zones ostréicoles étudiées sont de bonne qualité. En effet, les concentrations sur les sites de Roguedas et de Crézic sont souvent en limite de détection pour *E. coli* et très faibles ou en limite de détection pour les F-ARN spécifiques bactériophages

En ce qui concerne les gisements de palourdes, on observe des différences importantes selon le site étudié ; le secteur de palourdes de Rosvellec est très contaminé avec une moyenne de 11 142 *E. coli*/100 g et de 17 565 F-RNA/100 g (cette zone est classée C et D). Cependant si l'on se réfère au pourcentage de virus retrouvés sur ce secteur, il est voisin de celui trouvé sur le gisement du Lern (classé en A avec *E. coli* comme indicateur).

Les résultats trouvés sur le secteur étudié, dans les coquillages montre la très faible présence de virus entériques, en particulier des calicivirus, impliqués dans des TIACs liées aux coquillages. Néanmoins les résultats de contamination très faibles en virus sur des palourdes très contaminées en indicateur fécal souligne la nécessité d'améliorer les techniques de détection de ce type de coquillage. La physiologie des coquillages bivalves et leur mode d'alimentation varient d'une espèce à l'autre et l'utilisation de deux espèces différentes (huîtres et palourdes) dans cette étude peut avoir contribué aux difficultés d'analyses de certains résultats.

L'objectif appliqué de ce projet était d'identifier des outils d'aide à la décision pour prévenir le risque microbiologique lié à la consommation des coquillages, en particulier en étudiant la validité des indicateurs actuels (*E. coli*) et potentiels (bactériophages F-RNA spécifiques), par rapport aux pathogènes présents. ***Dans cette étude, il n'a été trouvé aucune relation entre la présence de virus entériques humains dans les coquillages et les indicateurs actuels ou potentiels de contamination virale.***

Par contre, l'utilisation d'un modèle hydrodynamique a été appliquée à des rejets de microorganismes. Le modèle de simulation donne des résultats très proches de ceux trouvés dans les coquillages durant la période d'étude pour *E. coli* et les bactériophages. La simulation concernant les calicivirus, qui n'est qu'un exercice très approximatif, semble néanmoins confirmer nos résultats. En effet, pendant cette période, peu de calicivirus ont été trouvés dans les coquillages. ***Ce premier exercice de simulation permet de conclure à l'intérêt d'une telle approche de modélisation comme outil d'aide à la décision sur un secteur conchylicole.***

Il est néanmoins évident qu'au vu des approximations actuelles dues au manque de connaissances sur les virus entériques, des mesures complémentaires mériteraient d'être réalisées. Il s'agirait en particulier d'avoir :

- des informations quantitatives sur le nombre de virus présent dans les selles de malades,
- des informations sur le portage dans la population
- des données quantitatives sur les virus présents dans les eaux usées et les coquillages
- le taux de concentration des virus dans les coquillages
- les temps de survie évalués pour des détections en RT-PCR qui mettent en évidence la présence de génome viral.
- Des informations concernant les liens entre les virus et certains paramètres physico-chimiques du milieu, telle la turbidité qui peut jouer un rôle dans l'adhésion et la survie de certains virus entériques.

6 Références bibliographiques

- Abbaszadegan, M., Stewart, P. and Le Chevallier, M., 1999. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Applied-and-Environmental-Microbiology*, 65(2) : 444-449.
- Ando, T., Jin, Q., Gentsch, J. R., Monroe, S., Noel, J., Dowell, S. F., Cicirello, H. G., Khon, M. A. and Glass, R. I. 1995. Epidemiologic applications of novel molecular methods to detect and differentiate small round structured viruses (Norwalk-like viruses). *J. Med. Virol.* 47 : 145-152.
- Ando, T., Noel, J.S., Fankhauser, R.L. 2000. Genetic classification of "Norwalk-like viruses". *J. Infect. Dis.* : 181 Suppl 2 : S336-48.
- Armon R., Kott Y. 1996. Bacteriophages as indicators of pollution, *Cr.Rev.Env.Sc.Tech.*, 26 : 299-335.
- Atmar, R.L., Neill, F.H., Romalde, J.L., Le Guyader, F., Woodley, C.M., Metcalf, T.G. and Estes, M.K. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61 : 3014-3018.
- Bon, F., Fascia, P., Dauvergne, M., Tenenbaum, D., Planson, H., Petion, A.M., Pothier, P., et Kholi, E., 1999. Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 and 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.*; 37(9) : 3055-3058.
- Bon, F., Fromantin, C., Aho, S., Pothier, P., Kohli, E. and Azay group., 2000. G and P genotyping of rotavirus strains circulating in France over a three-year period : detection of G9 and P[6] strains at low frequencies. *J. Clin. Microbiol.*, 38(4) : 1681-3.
- Bosch, A. *et al.*, 1993. The survival of human enteric viruses in seawater. Map technical reports series, n° 76 : 1-7.
- Bosch, A. *et al.*, 2001. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water-Science-and-Technology*, 43(12) : 61-65.
- Bosch, A., Gajardo, R., Diez, J.M. and Pinto, R.M., 1996. Non-isotopic automatable molecular procedures for the detection of enteroviruses. *Molecular and Cellular Probes*, 10(2) : 81-89.
- Bosch, A., Lucena, F., Girones, R., Jofre, J. 1998. Occurrence of enteroviruses in marine sediment along the coast of Barcelona, Spain. *Can. J. Microbiol.*, 34 : 921-924.
- Chapman, N.M., Tracy, S., Gauntt, C.J., Fortmueller, U. 1990. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28(5) : 843-50.
- Chikhi-Brachet, R., Bon, F., Toubiana, L., Pothier, P., Nicolas, J.C., Flahault, A., *et al.* Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France. Soumis à publication.
- Chung, H.M., Jaykus, L.A. and Sobsey, M.D., 1996. Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10) : 3772-3778.
- Croci, L. *et al.*, 1999. Detection of hepatitis A virus in shellfish by nested reverse transcription-PCR. *International-Journal-of-Food-Microbiology*, 48(1): 67-71.

- Cromeans, T.L., Nainan, O.V. and Margolis, H.S. 1997. Detection of hepatitis A virus RNA in oyster meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 : 2460-2463.
- Dupont, J. *et al.*, 1996. Rapid estimation of *Escherichia Coli* in live marine bivalve shellfish using automated conductance measurement. *J. Appl. Bacteriol.* 80(1) : 81-90.
- Duràn, A.E., Muniesa, M., Méndez, X., Valero, F., Lucena, F. and Jofre, J., 2001. Removal and inactivation bacteriophages in fresh waters. *J. appl. Microbiol.* 92 : 338-347.
- Gentsch, J.R., Glass, R.I., Woods, P., Gouvea, V., Gorziglia, M., Flores, J. *et al.* 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30(6) : 1365-73.
- Girones R., Joffré J., Bosch A., 1989. Natural inactivation of enteric viruses in seawater. *J. Environ. Qual.* 18 : 34-39.
- Gouvea, V., Allen, J.R., Glass, R.I., Fang, Z.Y., Bremont, M., Cohen, J. *et al.* 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29(3) : 519-23.
- Gouvea, V., Glass, R.I., Woods, P., Taniguchi, K., Clark, H.F., Forrester, B. *et al.* 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28(2) : 276-82.
- Green, D.H. and Lewis, G.D. 1999. Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture. *Wat. Res.* 33 : 1195-1200
- Green, J., Gallimore, C. I., Norcott, J. P., Lewis, D. and Brown, D. W. G. 1995. Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV associated gastroenteritis. *J. Med. Virol.* 47 : 392-398.
- Green, J., Henshilwood, K., Gallimore, C.I., Brown, D.W.G. and 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 (3) 858-863.
- Hafliger, D., Gilgen, M., Luthi, J. and Hubner, P.H. 1997. Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J. Food Microbiol.* 37 : 27-36.
- Janin, J.M., Marcos, F. et Camus, P. 1997. Qualité des eaux du golfe du Morbihan. Utilisation et validation d'un modèle hydrodynamique. Bordomer 27-29/10/97. Actes du colloque T2 pp124-135.
- Jaykus, L.A., Deleon, R. and Sobsey, M.D. 1996. A virion concentration method for detection of human enteric viruses in oysters by PCR and oligoprobe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 2074-2080.
- Jiang, X., Espul, C., Zhong, W.M., Cuello, H., Matson, D.O., 1999. Characterization of a novel human calicivirus that may be a naturally occurring recombinant. *Arch Virol.* 144(12) : 2377-87.
- Jiang, X., Huang, P.W., Zhong, W.M., Farkas, T., Cubitt, D.W., Matson, D.O. 1999. Design and evaluation of a primer pair that detects both Norwalk- and Sapporo-like caliciviruses by RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 83 : 145-154.
- Jofre, J., Araujo, R. and Puig, A., 1997. Bacteriophages of *bacteroides fragilis* as indicators of human faecal pollution. Health related microorganisms in the environment.

- Kholi E., Bon F., Pothier P., 2001. Les principaux virus des gastroentérites chez l'homme. Bulletin SFM, 16 : 97-102.
- Koopmans, M., Vinje, J., de Wit, M., Leenen, I., van Der Poel, W., van Duynhoven, Y., 2000. Molecular epidemiology of human enteric caliciviruses in The Netherlands. J. Infect. Dis. 181, Suppl 2 : S262-9.
- Kopecka, H., Dubrou, S., Prevot, J., Marechal, J., Lopez-Pila, J.M. 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction and hybridization. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1213-1219.
- Lees D., Nickolson M., Tree J.A., 1995. The relationship between levels of *E. coli* in shellfish and in seawater with reference to legislative standarts presented. Int. Conf. on Molluscan Shellfish Safety. Sydney Australia, Nov. 94.
- Le Guyader, F. *et al.*, 1996. Detection and analysis of a small round-structured virus strains in oysters implicated in an outbreak of acute gastroenteritis. Appl. Environ. Microbiol. 62(11) : 4268-4272.
- Le Guyader, F. *et al.*, 1997. Use of RT-PCR internal control to evaluate viral removal. Water Research, 35(11-12) : 461-465.
- 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-nested PCR. Appl. Environ. Microbiol. 60(10), 3665-3671.
- Le Guyader, F., Haugarreau, L., Miossec, L., Dubois, E. and Pommepuy, M., 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. Appl. Environ. Microbiol. 66(8): 3241-3248.
- Lee, T., Yam, W.C., Tam, T.Y., Ho, B.S.W., Ng, M.H., and Broom, M.J. 1999. Occurrence of hepatitis A virus in green-lipped mussels (*perna viridis*). Wat. Res. 33 : 885-889.
- Lees, D.N. 2000. Viruses and bivalve shellfish. Int. J. Food Microbiol, 59 : 81-116.
- Lees, D.N., Henshilwood, K. and Dore, W.J. 1994. Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. Appl. Environ. Microbiol. 60, 2999-3005.
- Lees, D.N., Henshilwood, K., Green, J., Gallimore, C.I. and Brown, D.W.G. 1995. Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription PCR. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 4418-4424.
- Lees D., Nickolson M., Tree J.A., 1995. The relationship between levels of *E. coli* in shellfish and in seawater with reference to legislative standarts presented. Int. Conf. on molluscan shellfish safety. Sydney Australia, Nov. 94.
- Legeay, O., Caudrelier, Y., Cordevant, C., Rigotier-Gois, L., and Lange, M. 2000 . Simplified procedure for detection of enteric pathogenic viruses in shellfish by RT-PCR. J. Virol. Meth. 90 : 1-14.
- Lemaître, J.P., 1990. Recherche des bactériophages de *Bacteroides fragilis* dans les moules : approche méthodologique. Rapport de recherche pour l'obtention du DEA chimie et microbiologie de l'eau.

- Lopez-Sabater, E.I., Deng, M.Y. and Cliver, D.O., 1997. Magnetic immunoseparation PCR assay (MIPA) for detection of hepatitis A virus (HAV) in American oyster (*Crassostrea virginica*). *Lett Appl Microbiol*, 24(2) : 101-4.
- Marcos, F., Janin, J.M. et Le Saux J.M. 1995. Modélisation hydrodynamique du golfe du Morbihan : rapport EDF-LNH pour le conseil général du Morbihan HE 42/95/037/B , 47 p.
- Marx, F.E., Taylor, M.B., Grabow, W.O.K., 1997. A comparison of two sets of primers for the RT-PCR detection of astrovirus in environmental samples. *Water S*, 23 : 25-262.
- Melnick J.L., Gerba C.P., Wallis C., 1979. Virus in water. *Med. Instrumentation*, vol. 13 : 499-508.
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes, M.K., 1995. Environmental virology :from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years, *Annu. Rev. Microbiol.* 49 : 461-487.
- Miossec L., Vaillant V., 2001. Epidémiologie des gastro-entérites virales associées à la consommation des coquillages, 2000. *Bulletin SFM*, 16 : 103-114.
- Miossec, L. *et al.*, 1998. Contamination virale de coquillages responsables d'une épidémie de gastro-entérites à Poitiers mars 1997. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire*, 30 : 12-130.
- Mitchell, D.K. et al., 1995. Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.* 172(6) : 1437-44.
- Muniain Mujika, I., Girones, R. and Lucena, F., 2000. Viral contamination of shellfish: evaluation of methods and analysis of bacteriophages and human viruses. *J. Virol. Methods* 89(1-2): 109-118.
- Noel, J.S., Ando, T., Leite, J.P., Green, K.Y., Dingle, K.E., Estes, M.K., *et al.* 1997. Correlation of patient immune responses with genetically characterized small round-structured viruses involved in outbreaks of nonbacterial acute gastroenteritis in the United States, 1990 to 1995. *J. Med. Virol.* 53(4) : 372-83.
- Noel, J.S., Lee, T.W., Kurtz, J.B., Glass, R.I. and Monroe, S.S., 1995. Typing of human astroviruses from clinical isolates by enzyme immunoassay and nucleotide sequencing. *Journal-of-Clinical-Microbiology*, 33(4) : 797-801.
- Noel, J.S., Liu, B.L., Humphrey, C.D., Rodriguez, E.M., Lambden, P.R., Clarke, I.N., *et al.* 1997. Parkville virus: a novel genetic variant of human calicivirus in the Sapporo virus clade, associated with an outbreak of gastroenteritis in adults. *J. Med. Virol.* 52(2) : 173-8.
- Pang, X.L., Honma, S., Nakata, S., Vesikari, T., 2000. Human caliciviruses in acute gastroenteritis of young children in the community. *J. Infect. Dis.* 181, Suppl 2 : S288-94
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J. and Girones, R., 1998. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses *Appl. Environ. Microbiol.* 64(9) : 3376-82.
- Pompey, M., Guillaud, J.F., Dupray, E., Derrien, A., Le Guyader, F., Cormier, M., 1992. Enteric bacteria survival factors. *Wat. Sci. Tech.* 25 (12), 93-103.
- Pompey, M., Le Guyader, F., 1998. Molecular approaches to measuring microbial marine pollution, *Curr. Op. Biotech.*, 9 : 292-299.

- Pothier, P., Drouet, E. 1987. Development and evaluation of a rapid one-step ELISA for rotavirus detection in stool specimens using monoclonal antibodies. *Ann. Virol. Institut Pasteur*; 13 : 285-95.
- Robertson B.H., B.V.K., Khanna B., 1989. Altered hepatitis A VP1 protein resulting from cell culture propagation of virus. *Vir. Res.*, 13(3) : 207-212.
- Robertson, B.H., Khanna, B., Nainan, O.V., Margolis, H.S., 1991. Epidemiologic pattern of wild-type hepatitis A virus determined by genetic variation. *J. Infect. Dis.* 163 : 286-92.
- Romalde, J.L., Estes, M.K., Szucs, G., Atmar, R.L., Woodley, C.M. and Metcalf, T.G., 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1921-1926.
- Salomon, J.C., Pommepuy, M., 1990. Mathematical model of bacterial contamination of the Morlaix estuary. *Wat. Res.* 24(8), 983-994.
- Schwab, K.J., Neill, F.H., Estes, M.K., Metcalf, T.G. and Atmar, R.L. 1998. Distribution of Norwalk virus within shellfish following bioaccumulation and subsequent depuration by detection using RT-PCR. *J. Food Prot.* 61, 1674-1680.
- Shieh, Y.S.C., Calci, K.R., and Baric, R.S., 1999. A method to detect low levels of enteric viruses in contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 : 4709-4714.
- Sugieda, M., Nakajima, K. and Nakajima, S., 1996. Outbreaks of Norwalk-like virus-associated gastroenteritis traced to shellfish - coexistence of two genotypes in one specimen. *Epidemiol. Infect.* 116, 339-346.
- Sunen, E. and Sobsey, M.D., 1999. Recovery and detection of enterovirus, hepatitis A virus and Norwalk virus in hardshell clams (*Mercenaria mercenaria*) by RT-PCR methods. *J. Virol. Methods*, 77(2) : 179-187.
- Vilagines, P., Suarez, A., Sarrette, B. and Vilagines, R., 1997. Optimisation of the PEG reconcentration procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. *Water Science and Technology*, 35(11-12): 455-459.
- Vinje, J., Green, J., Lewis, D.C., Gallimore, C.I., Brown, D.W., Koopmans, M.P., 2000. Genetic polymorphism across regions of the three open reading frames of Norwalk-like viruses. *Arch. Virol.* 145(2) : 223-41
- Vinje, J., Koopmans, M.P., 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* 174(3) : 610-5.
- Wait, D. A., Sobsey, M.B., 2001. Comparative survival of enteric viruses and bacteria in atlantic ocean seawater. *Wat. scienc. and Techn.*, 43(12) : 139-142.
- Walt D.A. and Sobsey M.D., 2001. Comparative survival of enteric viruses and bacteria in Atlantic Ocean seawater, 43 : 139-142.
- Wang, J., Jiang, X., Madore, H.P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T. *et al.*, 1994. Sequence diversity of small round-structured viruses in the Norwalk virus group. *J. Virol.* 68(9) : 5982-90.
- Yuen, L.K.W., Catton, M.G., Cox, B.J., Wright, P.J., Marshall, J.A., 2001. Heminested multiplex reverse transcription-PCR for detection and differentiation of Norwalk-like virus genogroups 1 and 2 in fecal samples. *J. Clin. Microbiol.* 39(7) : 2690-94.

COMMUNICATIONS

- Emergence de 2 nouveaux variants de virus Norwalk-like en France au cours de l'année 2000. Bon, F., Le Guyader, F., Gallay, A., Vaillant, V., Pothier, P., Kohli, E. 21^e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse. Paris – 6/7 Décembre 2001.
- N.L.V. Molecular Epidemiology in France 1999-2001. Bon, F., Ballay, K., Giraudon, H., Pothier, P., Kohli, E. Journée Calicivirus – Ifremer Issy-les-Moulineaux – 18 décembre 2001.
- Surveillance des virus de gastro-entérite dans la population de la région de Vannes (56) entre octobre 1999 et Juin 2001. Bon, F., Brachet, R., Le Guyader, F., Pommepey, M., Pothier, P., Kohli, E. IV^{èmes} Journées Francophones de Virologie. Paris – 25-26 avril 2002.

7 Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribo-Nucléique
AN	Acide Nucléique
ARN ou RNA	Acide Ribo-Nucléique
AV, CV RV, EV	Astro Virus, Calicivirus, Rota Virus, Entero Virus
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CI	Contrôle interne
CLI	Chair et Liquide Intervalvaire du coquillage
CTAB	Hexadecyltrimethyl ammonium bromide
DA	Diarrhée aiguë
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
DDASS	Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales
DEL	Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral (Ifremer)
DEL/AO	Applications Opérationnelles
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DO	Densité Optique
dNTPs	Deoxyribonucleoside Triphosphates
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i> , hôte intestinal, indicateur de contamination fécale
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetate
Eq./hab ou E/H	Equivalent-Habitant
F+ARN spécifique	bactériophages
GEA	Gastro-entérite aiguë
Hu CV	Calicivirus humains
IFREMER	Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer
INSERM	Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale
ISO	International Organisation for Standardization
KCl	Chlorure de potassium
MES	Matières en suspension
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
NaCl-PEG 6000	Chlorure de sodium polyethylene glycol
NLV	Norwalk Like Virus
NPK	Azote, phosphore, potassium
OMS	Organisation Mondiale de la Santé

ORF	Open reading frame
PBS	Peptone-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylene glycol
REMI	REseau de Surveillance Microbiologique (IFREMER)
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
STEP	Station d'épuration
ds RNA	double strain Ribo Nucleic Acid
ss RNA	single strain Ribo Nucleic Acid
T90	Temps nécessaire pour que 90% des bactéries ou virus ne soient plus cultivables
TIAC	Toxi-Infection Alimentaire Collective
Tris-HCL	Tris Hydroxy Chloride
UH	Unité habitant
UFC	Unité Formant Colonie
UFP	Unité Formant Plage
VHA ou HAV	Virus de l'Hépatite A
VP1	Viral protéine 1