

P. m. neffuy

direction de l'environnement et de l'aménagement littoral
département Phycotoxines et Microbiologie
laboratoire de Microbiologie

ifremer

Contamination virale de l'environnement littoral

Rapport final

Septembre 1999

Contrat INSERM 1996 - n° EN96C11

Ont participé à cette étude :

Ifremer DEL/MP Laboratoire Microbiologie
Nantes - Brest

L. Miossec, Responsable de projet

L. Besseau
M.P. Caprais
L. Haugarreau
F. Le Guyader
D. Ménard
M. Pommepeuy

Ifremer Côtier Sète

E. Abadie
M.A. Comps
J.L. Guillou
C. Le Bec
J.C. Sauvagnargues

Laboratoire de Virologie, Hopital du Bocage
Dijon

F. Bon
B. Jamot
E. Kohli
P. Potier

DDASS Montpellier

G. Daurat
J.P. Guyonnet

Comité de pilotage constitué des participants de l'étude, assistés par :

J.C. Désenclos (IVS - Institut de Veille Sanitaire)
A. Armengaud (CIRE PACA - Cellule Inter-Régionale d'Epidémiologie
d'Intervention du Sud-Est)

et *J. Cohen* (INRA)

SOMMAIRE

Contamination virale de l'environnement littoral

Résumé	4
1. Introduction	6
2. Contexte de l'étude	7
2.1. Rappel des objectifs scientifiques de l'étude	7
2.2. Présentation du site	8
2.2.1. L'étang de Thau	8
2.2.2. L'étang du Prévost	11
2.3. Rappel bibliographique	12
2.3.1. Détection des virus entériques dans l'environnement	12
2.3.2. Les souches circulant dans l'environnement et dans la population	13
2.3.3. Le coquillage en tant que facteur de risque viral	14
3. Matériel et méthodes	16
3.1. Protocoles d'échantillonnage	16
3.1.1. Prélèvements de coquillages	16
3.1.2. Prélèvements des selles de malades dans la population	16
3.2. Méthodes analytiques	17
3.2.1. Recherche de virus entériques	17
3.2.2. Recherche de bactériophages	20
4. Résultats	22
4.1. Contamination virale dans les coquillages	22
4.1.1. Analyses de la contamination virale des coquillages par secteur sur trois années	22
4.1.2. Etudes des variations annuelles	25
4.1.3. Contamination des coquillages par les bactériophages	28
4.1.4. Représentativité des entérovirus comme indicateur viral	30
4.2. Contamination virale observées dans la population	31
4.3. Comparaison entre les épidémies de diarrhées dans la population et la contamination virale des coquillages : analyse des séquences	34
4.3.1. Epidémiologie moléculaire CV	34
4.3.2. Epidémiologie moléculaire VHA	37
5. Discussion	38
6. Conclusions	42
Bibliographie	43
Annexe	50

Contamination virale de l'environnement littoral

Résumé

Les microorganismes, bactéries et virus d'origine entérique, sont abondants dans les rejets urbains. Si la charge bactériologique contenue dans les eaux usées est notablement réduite lors des traitements appliqués dans les stations d'épurations, de nombreux microorganismes persistent et sont rejetés avec les eaux épurées dans le milieu récepteur, en rivière ou directement en mer. Le développement de méthodes analytiques basées sur la biologie moléculaire a permis récemment la détection de virus entériques non cultivables dans les échantillons de l'environnement, tels que les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les calicivirus, les astrovirus et les rotavirus.

En France, les données publiées sur la présence de ces virus entériques, détectés par RT-PCR, dans l'environnement littoral, restent encore limitées. Cette étude présente les résultats de la contamination virale de coquillages dans un ensemble lagunaire méditerranéen, au cours d'un suivi mensuel portant sur trois années consécutives. Cinq virus ont été recherchés dans les coquillages, les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les calicivirus, les astrovirus et les rotavirus ; en parallèle, les bactériophages ont été quantifiés. En périodes épidémiques, des analyses de virus ont été réalisées dans les selles de la population littorale. Une première comparaison des souches virales trouvées dans la population et dans l'environnement marin a été entreprise.

Les résultats obtenus soulignent la présence d'une contamination virale de cet ensemble lagunaire méditerranéen. Ils démontrent l'efficacité des nouvelles techniques de biologie moléculaire pour la mise en évidence de particules virales dans des échantillons environnementaux (Le Guyader *et al.*, 1998). L'analyse de cette série de données permet de dégager quelques tendances et de soulever plusieurs hypothèses :

- La contamination virale de l'environnement littoral est observée aussi bien dans un secteur classé A au regard de la réglementation portant sur l'exploitation et la mise en marché des coquillages que dans les autres secteurs. Elle est, cependant, plus limitée en zone A, qu'en zones C et D (Le Guyader *et al.*, 1998) ;
- Cette contamination semble être sous l'influence de phénomènes saisonniers. Elle est plus importante en hiver qu'en été (Miossec *et al.*, 1998) ;
- Des variations annuelles de cette contamination ont été observées au cours des trois années de suivi. La fréquence de détection des particules virales dans les coquillages était plus importante au cours des deux premiers hivers étudiés ;
- La contamination des coquillages par les bactériophages présente des similitudes avec celle des virus. Elle fluctue saisonnièrement et semble plus marquée dans les zones C et D ;
- Les entérovirus ne semblent pas répondre à l'ensemble des critères définissant un indicateur viral. Leur représentativité reste limitée dans les zones faiblement contaminées par d'autres virus entériques ;

- Dans le cas des calicivirus, on observe simultanément la circulation de ce virus dans la population et sa présence dans les échantillons de l'environnement. Les souches détectées dans ces deux compartiments, bien que différentes, présentent une variété importante. Cette observation, basée sur un petit nombre d'échantillons de selles, mérite d'être approfondie.

Ces résultats sont les premiers en France portant sur la contamination virale en zone littorale sur une aussi longue période de suivi. Leur interprétation reste limitée mais sera complétée par les données obtenues sur la contamination virale des eaux de station d'épuration (Contrat Plan-Etat-Région Languedoc-Roussillon).

Ces données participent à l'évaluation du risque viral associée à la consommation des coquillages en France. Elles fournissent une première estimation des niveaux de contamination des coquillages destinés directement à la consommation (sans traitement secondaire telle la purification) ; le risque de contamination secondaire des coquillages, lors du conditionnement et du transport, reste, en effet, limité. En l'absence de quantification virale dans les coquillages et d'informations précises sur le maintien du pouvoir pathogène de ces particules virales, elles permettent d'identifier des "périodes à risques sanitaires" pendant lesquelles des mesures de prévention supplémentaires peuvent être envisagées pour garantir la salubrité des coquillages distribués sur les marchés, comme des interdictions temporaires de commercialisation. D'autres solutions pourraient être retenues comprenant les traitements de purification intensifs, sous réserve toutefois d'en tester au préalable l'efficacité.

Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Dubois E., Kopeka H., Pommeypuy M., RT-PCR evaluation of viral contamination in 5 shellfish beds over a 21 month period. *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 38, 12: 45-50.

Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L., Comps M.A., Pommeypuy M., Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. *J. Shellfish Res.*, 1998, 17 (5), 1661-1664.

1. Introduction

Les microorganismes, bactéries et virus d'origine entérique, sont abondants dans les rejets urbains. Si la charge bactériologique contenue dans les eaux usées est notablement réduite lors des traitements appliqués dans les stations d'épurations, de nombreux microorganismes persistent et sont rejetés avec les eaux épurées dans le milieu récepteur, en rivière ou directement en mer (Metcalf *et al.*, 1995 ; Pommepey *et al.*, 1996).

Les virus entériques sont des particules inertes, résistantes dans l'environnement, notamment en milieu marin. Peu de données sont encore publiées sur l'importance de cette contamination virale dans l'environnement littoral. Cela tient au fait que la mise en évidence de virus entériques par les méthodes analytiques classiques est délicate sinon impossible car certains d'entre eux ne sont pas cultivables. Le développement de méthodes analytiques performantes basées sur la biologie moléculaire a permis de pallier ce problème. L'application de ces techniques sur des échantillons de coquillages et d'eau de mer a conduit à la mise en évidence de différents virus entériques ; parmi ceux-ci on trouve les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les calicivirus, les astrovirus et les rotavirus (Kopecka *et al.*, 1993 ; Tsai *et al.*, 1993 ; Romalde *et al.*, 1994 ; Atmar *et al.*, 1995).

La présence de ces virus dans les coquillages peut impliquer un risque sanitaire potentiel. Les pathologies, les plus souvent citées à la suite de consommation de coquillages, sont, depuis plusieurs années maintenant, les gastro-entérites d'étiologie virale et les hépatites virales (Rippey, 1994). Afin de réduire ces risques, des contrôles de la qualité microbiologique sont effectués régulièrement sur les coquillages en élevage. Cette surveillance est basée sur la teneur en coliformes thermotolérants. Cependant, ces bactéries fécales sont de mauvais indicateurs de contamination virale, car leur comportement en milieu marin diffère significativement du devenir en mer des virus. Plus sensibles que ces derniers aux conditions physico-chimiques et à la prédation, elles disparaissent en quelques jours alors que les virus peuvent persister plusieurs semaines voire plusieurs mois. Pour pallier ces limites, d'autres microorganismes comme les entérovirus et les bactériophages sont actuellement testés comme indicateurs viraux (Metcalf *et al.*, 1995 ; Lee *et al.* 1997).

En France, les résultats publiés sur la présence de virus entériques, détectés par RT-PCR, dans l'environnement littoral sont encore limités. Le Guyader *et al.*, ont mis en évidence en 1994 la présence d'entérovirus et de virus de l'hépatite A dans des coquillages prélevés en Loire Atlantique et dans le Morbihan. Ces auteurs, en 1995, ont détecté ces virus dans les eaux des rivières martiniquaises se jetant en milieu marin. Crance *et al.* (1995) ont montré la présence de particules virales de VHA dans des moules et des coques pêchées en zone intertidale au cours d'un suivi hebdomadaire de quatre mois. Apaire-Marchais *et al.* (1995) ont comparé des souches de VHA trouvées dans l'environnement et dans la population lors d'une épidémie. Dubois *et al.* (1997) ont mis en évidence à plusieurs reprises du rotavirus dans les effluents d'une station d'eaux usées située en bordure de littoral.

Cette étude présente les résultats de la contamination virale de coquillages présents dans un ensemble lagunaire méditerranéen, au cours d'un suivi mensuel portant sur trois années consécutives. Cinq types de virus ont été recherchés dans ces coquillages, les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les calicivirus, les astrovirus et les rotavirus ; en parallèle, les bactériophages ont été quantifiés. En périodes épidémiques, des analyses de virus ont été réalisées dans les selles de la population littorale. Une première comparaison des souches virales trouvées dans la population et dans l'environnement marin a été entreprise.

2. Contexte de l'étude

2.1. Rappel des objectifs scientifiques de l'étude

L'objectif principal est d'étudier la distribution des souches virales (entérovirus, virus de l'hépatite A, rotavirus, astrovirus et calicivirus humains) dans la population humaine et l'environnement littoral et de comparer les souches trouvées dans les selles de malades et dans les coquillages, contaminés *via* les eaux de station d'épuration.

Plus spécifiquement, il s'agit :

- d'évaluer la contamination virale des coquillages : les virus recherchés sont les entérovirus (EV), le virus de l'hépatite A (VHA), les calicivirus humains (CV), les rotavirus (RV) et les astrovirus (AV). Les analyses sont réalisées dans les coquillages pris comme intégrateur de la pollution des eaux littorales. Les sites d'étude sont l'étang de Thau et son bassin versant, incluant la ville de Sète et ses canaux, et l'étang du Prévost et les alentours de Montpellier (fig. 1) ;



Figure 1 : carte générale de la zone d'étude

- d'étudier la persistance des virus en milieu marin c'est à dire la variabilité temporelle de la présence des différentes souches virales dans les coquillages ;
- d'analyser la relation entérovirus avec les autres virus (CV, VHA, RV et AV) c'est à dire la concomitance des différentes souches virales dans les coquillages ;
- de développer des études d'épidémiologie moléculaire des CV et du VHA sur la zone littorale étudiée : caractérisation des souches, comparaison entre les souches trouvées dans les coquillages et celles circulant dans la population.

La recherche et la quantification des bactériophages dans les coquillages a été développée dans le cadre de cette étude à l'initiative du laboratoire de Microbiologie de l'IFREMER, dans le but de juger de la fiabilité des phages comme indicateur de contamination virale. Nous présentons ici les premiers résultats obtenus dans les coquillages.

Remarque : contexte contractuel

Une pré-étude de 18 mois, d'août 1995 à fin 1996, a été financée par IFREMER.

A partir de 1997, deux autres financements sont intervenus :

- Financement Santé-Environnement à hauteur de 50 % du coût global de l'étude, soit la somme de 268 000 F : signature du contrat avec l'INSERM en avril 1997, n° EN96C11, INSERM 1996.
- Financement à hauteur de 50 % du coût global de l'étude, soit la somme de 268 000 F par le Plan Etat Région Languedoc-Roussillon ; le projet a été présenté en septembre 1996, retenu en juin 1997 et le financement voté en février 1998.

Compte tenu des conditions de financement bipartite, la partie "coquillages et population", dont les résultats sont présentés dans ce rapport, est financée par le contrat INSERM, la partie "eaux de station d'épuration - indicateurs de contamination virale" par le contrat Plan-Etat-Région. Celle-ci fera l'objet prochainement d'un rapport de fin d'étude.

2.2. Présentation du site

Le site d'étude comprend 3 secteurs, le secteur conchylicole de l'étang de Thau, le secteur des canaux de Sète, parties intégrantes de l'étang de Thau, et le secteur de l'étang du Prévost.

2.2.1. L'étang de Thau

L'étang de Thau (fig. 2) est l'une des plus grandes lagunes méditerranéennes. Il est orienté sud-ouest / nord-est, avec une longueur de 19,5 km et une largeur maximum de 4,5 km correspondant à une superficie de 7 500 hectares. Sa profondeur moyenne est de 4,5 m mais peut atteindre localement 10 m. Son volume global fluctue entre 250 et 300 millions de m³. L'étang communique avec la mer par deux canaux. L'un se trouve à l'extrémité sud-ouest, il s'agit du Grau de Pisse-Saumes, l'autre au nord-est constitué par le réseau des canaux de Sète. Les échanges avec la mer se font pour 80 à 90 % par les canaux de Sète.

On peut diviser l'étang de Thau en deux parties, un bassin occidental, appelé Grand Etang, qui communique indirectement avec la rivière Hérault par le canal du Midi et un bassin oriental, plus restreint (200 ha), ou étang des Eaux Blanches, à proximité de la ville de Sète.

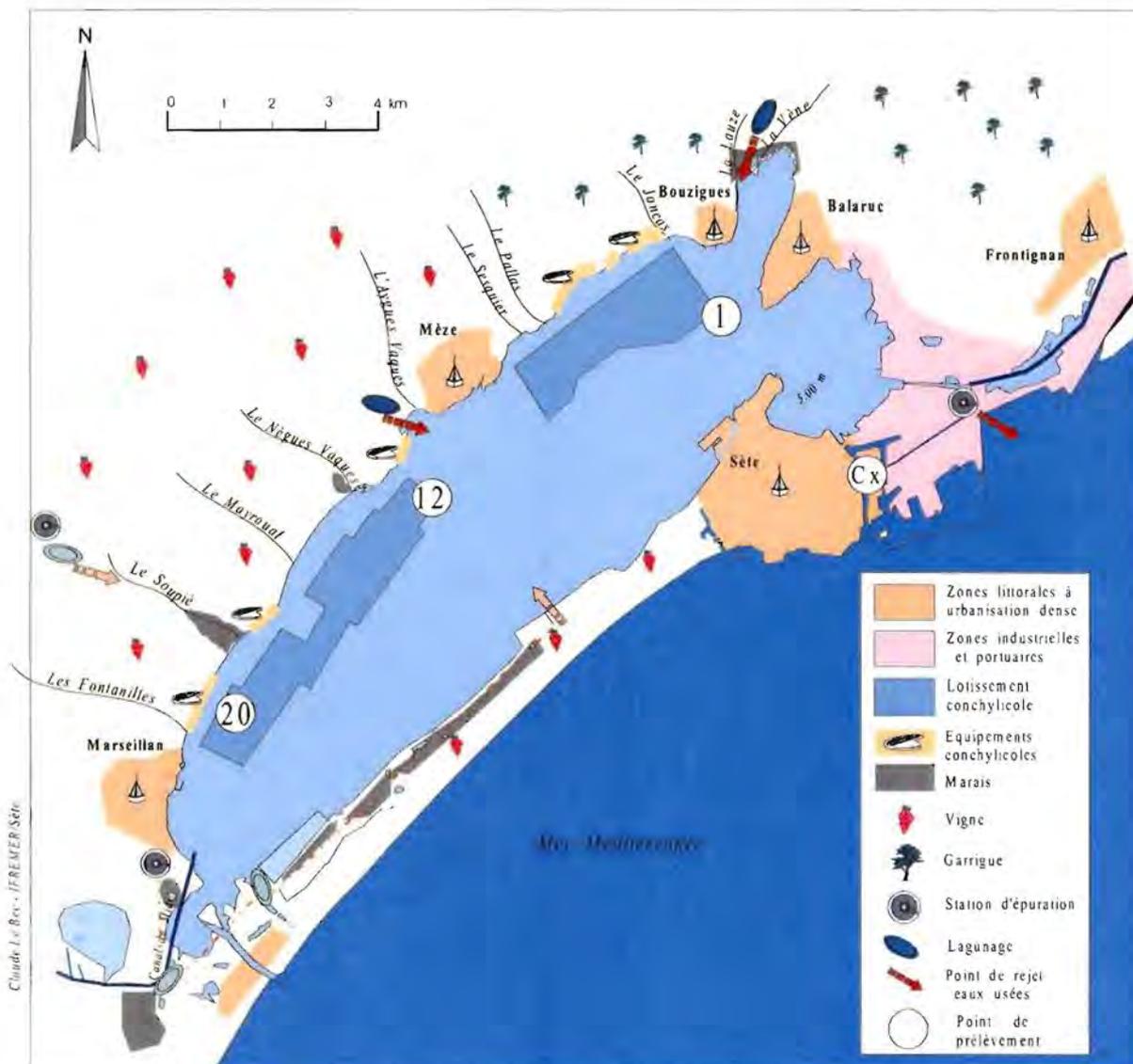


Figure 2 : Carte du secteur de l'étang de Thau, incluant Sète et les Canaux.

Le climat est de type méditerranéen, caractérisé par un été sec, un hiver humide et deux saisons intermédiaires présentant des pluies violentes de type orageux.

Le bassin versant de l'étang a une superficie d'environ 300 km². Il est drainé par deux principaux cours d'eau, la Vène et le Pallas ; leurs bassins versants ont respectivement 70 km² et 50 km². Sur les 14 communes du bassin versant, correspondant à une population sédentaire d'environ 89 000 habitants, six sont riveraines de l'étang. Ces communes disposent toutes de systèmes d'assainissement. Les réseaux d'eaux usées sont majoritairement de type séparatifs, sauf dans le cas de Sète et de Marseillan. Cependant, quel que soit le type de réseaux, ils sont sujets à des débordements lors d'épisodes pluvieux. Les effluents de trois stations d'épuration sont rejetés directement dans l'étang de Thau. Il s'agit de la station d'épuration de Marseillan, dont les eaux sont rejetées dans l'étang, après transit par les canaux des Salins du Midi sur le Lido, et des lagunages de Mèze-Loupian et de Bouzigues-Poussan (Mahé, 1996).

La station d'épuration de Mèze (6 500 habitants, INSEE 1990) été mise en service en 1980. En 1984, le village de Loupian (1 300 habitants, INSEE 1990) a été raccordé à l'installation. Cette station possédait, jusqu'en 1998, trois bassins de traitement sur une superficie de 7,9 ha ; elle était dimensionnée alors pour traiter 8 000 équivalents-habitants (eq/h) en hiver et 15 000 en été. A sa mise en exploitation, le temps de séjour était estimé à 40 jours en été et 70 jours en hiver (Anon, 1996). En 1998, deux bassins supplémentaires ont été ajoutés portant les capacités nominales de traitement à 14 000 eq/h en hiver et 21 000 eq/h en été. La station reçoit en moyenne entre 1 500 et 2 000 m³ par jour (Mr Crabos, comm. pers.). Le fonctionnement de la station d'épuration peut être perturbé lors d'épisodes pluvieux importants, supérieurs à 25 mm par jour. Des précipitations supérieurs à 50 mm par jour entraînent une saturation dans le canal de sortie de station provoquant un dysfonctionnement du système dont les répercussions sont sensibles pendant une vingtaine de jour (Anon., 1996).

La station d'épuration de Bouzigue-Poussan a été mise en service en 1984. Elle traite les eaux usées de Bouzigues (900 habitants, INSEE 1990) et Poussan (3500 habitants, INSEE 1990). Elle est dimensionnée pour traiter 6 700 eq/h (capacité nominale). Les autres stations d'épuration du bassin versant de l'étang de Thau évacuent leurs eaux épurées dans les rivières, La Vène, Le Pallas et Le Soupié, qui se jettent dans l'étang.

La station d'épuration de Sète est de type boues activées avec pré-traitement physico-chimique. Les eaux épurées sont rejetées en mer (sortie-est de la ville). Cette station traite les eaux usées des communes de Sète, Balaruc et Frontignan (environ 64 000 habitants, INSEE 1990) pour une capacité nominale de 150 000 eq/h. Les eaux usées domestiques de plusieurs vieux quartiers de Sète, non encore raccordés à la station d'épuration de la ville, sont rejetées sans traitement dans les canaux de Sète qui reçoivent également des eaux usées des industries adjacentes.

L'économie se développe autour de quatre grands axes, la viticulture, le tourisme, la conchyliculture et les activités portuaires. Ces trois derniers points sont discutés :

- Le tourisme conduit au doublement de la population du bassin versant (hors Sète) pendant la période estivale.
- Le port de Sète est le quatrième port français de débarquement de poissons (13 000 tonnes, Anon., 1995). C'est aussi un port de commerce important (bois, céréales, bovins pour un tonnage de l'ordre de 10 000 tonnes par an, Mr Le Bec comm. pers.).
- La conchyliculture représente environ 10 % de la production française d'huîtres et de moules. Concernant les huîtres, 15 000 tonnes sont commercialisées chaque année pour une biomasse en élevage de l'ordre de 25 000 tonnes. Les tables conchylicoles occupent 1/5^e de la superficie de l'étang et sont réparties en trois zones le long de la bordure nord de l'étang. La principale période de vente se situe autour de Noël. Pour les moules, la biomasse en élevage est d'environ 3 000 tonnes en permanence, avec un "turn over" rapide suivant la vente et la commercialisation. La période de commercialisation des moules est étalée dans le temps avec un pic en septembre-octobre (Elzière *et al.*, 1993 ; Pichot *et al.*, 1994). La qualité microbiologique générale, enregistrée au travers du réseau de surveillance IFREMER (REMI) est variable (classement de la zone en A provisoire, cf directive 91/492/CEE, décret 94-340, arrêté ministériel du 21 juillet 1995, arrêté préfectoral du 12 juillet 1996) ; on peut observer une contamination microbiologique sporadique du secteur en relation avec les périodes de fortes pluies (Miossec, 1992 ; Anon, 1995).

2.2.2. L'étang du Prévost

L'étang du Prévost fait partie d'un ensemble lagunaire constitué par quatre étangs, Arnel, Méjean, Grec et Prévost appelés étangs palavasiens (fig. 3.) (Hydratec, Aquascop, 1989 ; Ximenes *et al.*, 1991 ; Lieutaud et Burtin, 1995). Les points de communication majeurs sont avec la mer le grau du Prévost, avec le Lez, principal cours d'eau du bassin versant, le canalette ouest et avec l'étang d'Arnel une passe au niveau du canal ouest (Canal du Rhône à Sète). Sa superficie moyenne est de 296 ha pour une profondeur moyenne de 75 cm et un volume de 1,5 millions de m³. Il est allongé en direction sud-ouest / nord-est. Les variations de volumes sont influencées par les marées, du fait de la proximité de la mer : 90 % des échanges viennent de la mer contre 10 % du canal ouest ; suivant l'orientation du vent (Tramontane et brise de mer), le Lez peut intervenir pour 1 % dans le volume d'eau. Le temps de renouvellement des eaux de cet étang varie entre un jour et demi (avec vent, notamment la Tramontane) et deux jours (sans vent).

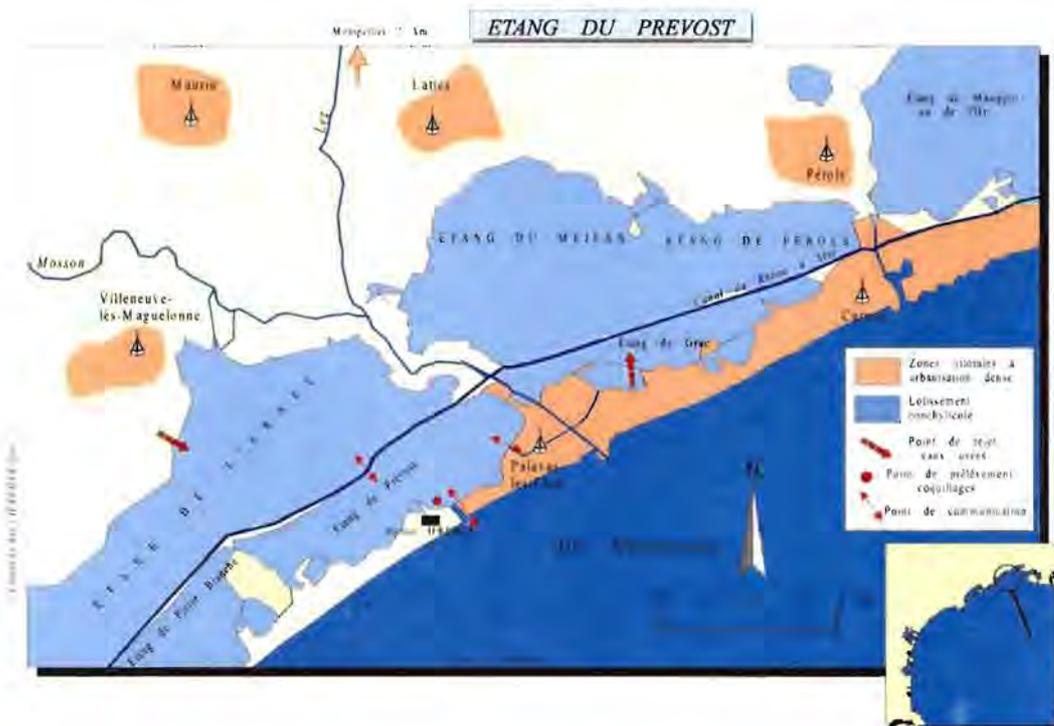


Figure 3 : Carte du secteur de l'étang du Prévost.

Le Prévost, comme les autres étangs palavasiens, subit l'impact d'un bassin versant très urbanisé, l'activité agricole est très réduite sur le secteur. Les rejets urbains représentent 85 à 90 % des apports en azote et en phosphore dans cet ensemble lagunaire. La station d'épuration de Montpellier contribue pour environ 85 % des apports totaux. Concernant le Prévost, le Lez intervient pour 30 à 35 % dans les apports en nutriments (N et P), le canal ouest pour 60 à 70 % et la station d'épuration de Villeneuve-les-Maguelonne pour 4 à 6 %.

Deux stations d'épuration parmi les cinq stations du secteur peuvent avoir une influence sur la qualité des eaux de l'étang du Prévost. Il s'agit de la station d'épuration de Montpellier qui rejette ses effluents dans le Lez, et de celle de Villeneuve-les-Maguelonne qui évacue ses eaux usées épurées dans un cours d'eau temporaire qui se jette dans l'étang d'Arnel.

- La station d'épuration de Montpellier (La Céreirède - environ 250 000 habitants) est dimensionnée pour traiter 260 000 eq/h. Le taux de raccordement au réseau est estimé à 99 % sur l'agglomération de Montpellier. Par contre, en période de fortes pluies, les effluents sont rejetés directement dans le milieu naturel par des by-pass ou des déversoirs d'orage.
- La station d'épuration de Villeneuve-les-Maguelonne utilise une filière biologique (boues activées) ; elle est largement sous-dimensionnée.

Le bassin versant du Lez a une superficie totale de 574 km² ; son affluent principal est la Mosson. Il traverse la ville de Montpellier et se jette en mer à Palavas-les-Flots. Les régimes hydrologiques du Lez et de la Mosson sont de type méditerranéen avec des débits très faibles en été et des crues parfois violentes à la suite d'orages.

Le Lez présente quatre zones homogènes :

- le Lez amont, de la source à Montpellier avec des rejets polluants peu importants. La contamination bactériologique est de l'ordre de 10³ CF/100 ml (coliformes fécaux) et de 10² SF/100 ml (streptocoques fécaux) ;
- le Lez moyen traversant Montpellier, sous l'influence de déversoirs d'orage ;
- le Lez médian, de la station d'épuration de Montpellier à la Mosson, dont le débit d'étiage correspond à celui de l'effluent épuré de la station d'épuration (1m³/s environ) ;
- le Lez aval, de la Mosson à la mer, influencé par la marée et les échanges avec les étangs. Dans cette partie du cours d'eau, la contamination bactériologique diminue de 3 log pour les CF et de 2 log pour les SF. Sur ce trajet, le Lez coupe un canal de navigation qui contribue à la dispersion des eaux polluées. Pour sa part, la Mosson, bien que de mauvaise qualité bactériologique, ne participe que faiblement à la contamination microbienne de l'ensemble.

La production conchylicole dans l'étang du Prévost reste anecdotique, principalement axée sur la mytiliculture. Un seul producteur exploite quelques tables conchylicoles et produit en moyenne 22 tonnes de moules par an pour 16 tonnes d'huîtres (C. Vercelli, comm. pers.). Les coquillages sont purifiés (purification à l'ozone) avant commercialisation. La surveillance microbiologique des coquillages (REMI) souligne de mauvais résultats bactériologiques des coquillages avant purification, avec une contamination fécale plus marquée en octobre-novembre (Anon, 1995). Ce secteur conchylicole est classé C.

2.3. Rappel bibliographique

2.3.1. Détection des virus entériques dans l'environnement

Le développement de la biologie moléculaire a permis d'améliorer les connaissances sur les microorganismes présents dans l'environnement littoral. Ces techniques, la plupart dérivées de la PCR (Polymerase Chain Reaction), permettent de détecter rapidement et directement dans les échantillons naturels, les virus peu ou difficilement cultivables (virus de l'hépatite A, calicivirus humains).

Des publications récentes rapportent des études où les auteurs appliquent ces techniques sur des échantillons naturellement contaminés. Une dizaine de publications, dont six sur les eaux usées et les eaux de rivière, mettent en évidence la présence d'entérovirus, de rotavirus et de calicivirus (Dubois *et al.* 1997 ; Gantzer *et al.* 1997 ; Gilgen *et al.* 1997 ; Murrin *et al.* 1997). Dans les eaux de mer, Marlowe *et al.*, (1997) et Pallin *et al.*, (1997) ont

recherché respectivement *E. coli* et les entérovirus. Petit *et al.* (1996) ont appliqué la PCR à la recherche de *Salmonella* et d'entérovirus dans des eaux d'estuaire. Enfin dans les coquillages, les rotavirus, le VHA, les entérovirus et les calicivirus humains ont été recherchés sur des échantillons naturels par Hafliker *et al.* (1997).

Plus récemment encore, plusieurs auteurs ont cherché d'une part à établir des relations entre présence de virus dans les eaux usées et impact sur le milieu récepteur, et d'autre part à observer d'éventuels phénomènes saisonniers. Green et Lewis (1999) ont détecté la présence d'entérovirus, de rotavirus et de virus de l'hépatite A dans des effluents urbains et dans l'environnement marin sous l'influence de ces rejets. Lee *et al.* (1999) ont mis en évidence la présence de virus de l'hépatite A dans des coquillages élevés en baie de Hong Kong, pendant l'hiver.

Sur le plan méthodologique, l'optimisation de la PCR a donné lieu à différents travaux. Par exemple, Le Guyader *et al.* (1997) introduisent un témoin interne permettant de quantifier la PCR et de détecter les inhibitions de l'amplification.

Le principal problème de l'analyse PCR est la présence d'inhibiteurs qui rend nécessaire la purification de l'échantillon avant l'analyse (Wilson, 1997). Une autre question également soulevée par les résultats de PCR concerne la détection de particules infectieuses ou non infectieuses. Limsawat et Ohgaki (1997) ont montré que l'ARN viral disparaissait en quelques minutes dans les eaux usées, ce qui implique pour eux, qu'une PCR positive refléterait la présence de virus potentiellement pathogènes. Cependant, aucune étude ne permet actuellement de conclure à la persistance de l'intégrité structurale des particules virales détectées dans l'environnement et au maintien de leur pouvoir pathogène.

2.3.2. Les souches circulant dans l'environnement et dans la population

Pratiquement aucune donnée n'existe sur la relation entre les souches circulant dans l'environnement et celles présentes dans la population. Les principaux pathogènes impliqués dans les épidémies de gastro-entérites d'étiologie microbienne sont d'une part des virus d'origine entérique (majoritairement calicivirus humains - parmi lesquels on trouve le virus de Norwalk -, astrovirus, adénovirus et rotavirus, Desselberger, 1998) et d'autre part des bactéries, principalement *Salmonella*, *Vibrio* et *Shigella*. En France, chaque année, deux phénomènes épidémiques de gastro-entérites sont reportés dans la population : l'un en hiver dont l'origine serait plutôt virale, l'autre en été de moindre amplitude et probablement d'étiologie bactérienne (Letrillart *et al.*, 1997, Flahault 1997, Maison *et al.*, 1997). Les agents responsables de l'épidémie hivernale seraient principalement les rotavirus, les astrovirus, les calicivirus humains et les entérovirus. Cependant, la part respective de chacun de ces virus reste inconnue. Le croisement de plusieurs systèmes de surveillance en France, comprenant des médecins généralistes, des hôpitaux et des laboratoires d'analyses médicales, laisse supposer l'importance des rotavirus dans les gastro-entérites hivernales des enfants de moins de 15 ans (Désenclos *et al.*, 1999).

Concernant la part des calicivirus dans ce phénomène épidémique hivernal, peu d'informations sont encore disponibles et publiées en France. Des travaux présentés récemment montrent qu'en population générale les calicivirus interviennent dans 20% des diarrhées aiguës hivernales et les rotavirus dans 17 % (Kohli *et al.*, 1999 ; Brachet *et al.*, 1999). Par contre, la diversité des souches circulant dans la population n'est pas connue. Aux Pays-Bas et aux USA, les calicivirus interviennent respectivement dans 91 % et 96 % des épidémies sporadiques (cas groupés) de gastro-entérites enregistrées au cours de l'année, avec une prédominance du génogroupe II (souches virales type SMA et Hawaii) (Vinjé et Koopmans, 1996 ; Fankhauser *et al.*, 1998). Ces virus sont présents toute l'année avec, cependant, une saisonnalité plus marquée en fin d'hiver et début de printemps.

Les astrovirus représentent la seconde cause d'hospitalisation à la suite de gastro-entérites d'étiologie virale chez les enfants après les rotavirus (Glass *et al.*, 1996).

Les diarrhées aiguës ne constituent pas un symptôme principal des infections à entérovirus, mais plusieurs cas de gastro-entérites à échovirus ont été enregistrés (Desselberger, 1998).

2.3.3. Le coquillage en tant que facteur de risque viral

Les épidémies de gastro-entérites d'origine virale observées après consommation de fruits de mer sont fréquemment décrites dans la littérature ; elles sont dues essentiellement aux calicivirus (Murphy *et al.*, 1979 ; Morse *et al.*, 1986 ; Pontefract *et al.*, 1993). De même, de nombreuses études font état d'épidémies d'hépatite A qui seraient liées à la consommation de coquillages (Mackowiak *et al.*, 1976 ; Ohara *et al.*, 1983 ; O'Mahony *et al.*, 1983 ; Goh *et al.*, 1984 ; Mele *et al.*, 1989 ; Wang *et al.*, 1990 ; Leoni *et al.*, 1998). Ces études épidémiologiques mettent en évidence statistiquement la relation entre consommation de coquillages et pathologie observée. Elles peuvent être accompagnées d'analyses microbiologiques dans les selles de malades. Par contre, les recherches de virus dans les coquillages suspectés sont rares (Desenclos *et al.*, 1991 ; Kohn *et al.*, 1995 ; Le Guyader *et al.*, 1996). Cependant, l'opportunité de disposer d'un échantillon de coquillages restant du lot consommé est souvent improbable, surtout dans le cas d'une épidémie d'hépatite A, car, du fait de la période d'incubation, le repas remonte à plusieurs semaines. Par contre, lors d'épidémies de gastro-entérites à durée d'incubation courte, cela reste possible.

En France, les produits de la mer, poissons et fruits de mer, interviennent dans 11 % des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) pour lesquels l'aliment vecteur a été identifié ou fortement suspecté (Haeghebaert *et al.*, 1998) (tabl. 1). Ces données agrégées ne permettent pas de connaître la part réelle des coquillages. L'agent étiologique reste inconnu dans 76 % des recherches réalisées, en surveillance de routine.

Par contre, des études plus ciblées ont permis de soupçonner les coquillages comme vecteur d'épidémies de gastro-entérites à calicivirus (Charlet *et al.*, 1994 ; Daurat, 1994) ou d'hépatites A (Niaouet *et al.*, 1993). Lorsque cela était possible, des études épidémiologiques de type cas-témoin ont souligné la relation entre la maladie et les coquillages consommés. Récemment, une enquête épidémiologique, également de type cas-témoin, a suspecté l'implication de coquillages dans une épidémie de gastro-entérite (Miossec *et al.*, 1998). Les analyses réalisées dans les prélèvements de coquillages et dans les selles de malades ont permis de mettre en évidence par biologie moléculaire (RT-PCR) la présence d'une souche de calicivirus. Le séquençage a montré l'homologie des souches humaines et environnementales.

En conclusion, les coquillages ne semblent pas constituer un facteur de risque prédominant ou majeur des épidémies hivernales de gastro-entérites enregistrées chaque hiver sur le territoire français (Letrilliart *et al.*, 1997 ; Maison *et al.*, 1997). Mais ils sont régulièrement impliqués dans des épidémies sporadiques de gastro-entérites ou d'hépatites A (Delarocque *et al.*, 1998 ; Miossec *et al.*, 1998).

	Salmonelles				<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	Autres Agents	Agents indéterminés	Total des agents identifiés
	<i>Enteritidis</i>	<i>Typhimurium</i>	Autres sérotypes	Non sérotypées					
Poissons et Fruits de mer	2 (1,7%)	3 (7,3%)	0	1 (2,3%)	2 (4,7%)	5 (6,4%)	33 (56%)	8 (10%)	54 (11,3%)
Total (aliments analysés)	118	41	16	43	43	78	59	80	478

Autres agents : *Campylobacter*, *Coli*, Dinoflagellés, Norwalk, *Shigella*, Toxique, *Vibrio parahaemolyticus*

Tableau 1 : Part de la catégorie Poissons et Fruits de mer dans les agents identifiés (TIAC déclarées aux DDASS ou DSV, France 1997).

3. Matériel et méthodes

3.1. Protocoles d'échantillonnage

3.1.1. Prélèvements de coquillages (figure 3)

- Dans l'étang de Thau, 3 points d'huîtres (*Crassostrea gigas*) ont été échantillonnés : la station 1, devant le rejet de Bouzigues-Poussan, la station 12, devant le rejet de Mèze-Loupian, la station 20, devant la ville de Marseillan.
- Dans l'étang du Prévost, l'échantillonnage a été réalisé sur un point de moules (*Mytilus galloprovincialis*), situé sous influence du rejet de Montpellier.
- Dans les canaux de Sète, le point d'échantillonnage de moules (*Mytilus galloprovincialis*) était situé près des quais.

La fréquence d'échantillonnage, mensuelle, a couvert la période août 95 - septembre 98. Les prélèvements de coquillages ont été réalisés par l'équipe IFREMER de Sète et expédiés pour analyse au laboratoire Microbiologie de l'IFREMER à Nantes et à Brest.

3.1.2. Prélèvements des selles de malades dans la population

La collecte des selles de malades diarrhéiques a eu lieu sur deux périodes annuelles lors des phénomènes épidémiques de gastro-entérites observés en hiver (de la période de Noël à la mi-janvier) et en été (de la mi-juillet à la mi-août). La collecte de selles de malades diarrhéiques, a permis d'obtenir les échantillons suivants :

- ◆ Eté 96 (pré-étude): 3 selles provenant de Sète (échantillonnage en juillet).
- ◆ Hiver 96-97 : 20 selles, 14 provenant de Montpellier, 6 du secteur de Sète (période d'échantillonnage : 24/12/96 au 2/01/97).
- ◆ Eté 97 : 6 selles, 5 échantillonnées sur Montpellier, 1 sur Sète (échantillonnage en juillet).
- ◆ Hiver 97-98 : 22 selles, provenant de Montpellier, Sète et de communes proches de ces villes (période d'échantillonnage : Noël 97 - début janvier 98).
- ◆ Eté 98 : 36 selles, provenant toutes de Sète (échantillonnage en septembre).

Tous ces prélèvements de selles ont été assurés par la DDASS de l'Hérault, puis transmis pour analyses virales au laboratoire de Virologie de l'Hôpital du Bocage de Dijon.

Un échantillonnage spécifique portant sur 10 selles d'enfants hospitalisés pour gastro-entérites a été réalisé au cours de l'hiver 97-98 au CHU Lapeyronie de Montpellier.

En cas de phénomène épidémique d'hépatite A, il était envisagé de recueillir des selles de malades après identification des cas auprès des médecins signalés par les laboratoires d'analyses médicales du département. Un phénomène épidémique d'hépatite A a été enregistré sur le secteur au début de l'année 1998. Seule une selle de malade a pu être récoltée au CHU Lapeyronie de Montpellier.

Les prélèvements effectués au CHU Lapeyronie de Montpellier ont été transmis pour analyses au laboratoire de Virologie de l'Hôpital du Bocage de Dijon.

3.2. Méthodes analytiques

3.2.1. Recherche de virus entériques

3.2.1.1. Préparation de l'échantillon pour la recherche de virus

* dans les coquillages

Dès réception au laboratoire, les coquillages sont ouverts et, après dissection, les hépatopancreas sont congelés sous aliquots de 1,5 g.

* dans les selles de malades

Les prélèvements de selles sont expédiés en glacière réfrigérée au laboratoire de Virologie de l'Hôpital du Bocage de Dijon. Ils sont, alors, aliquotés dans des tubes de 2 ml, puis congelés à -40°C.

3.2.1.2. Analyses virales des échantillons

Une homogénéisation des techniques utilisées pour détecter les virus par biologie moléculaire, dans les coquillages et dans les selles de malades a été faite dès le début de l'étude. Ainsi les résultats ont-ils pu être comparés. Seule la phase d'extraction des virus présente des différences méthodologiques suivant les compartiments étudiés, c'est pourquoi elle est détaillée pour chacun d'entre eux. La suite de l'analyse est commune à tous les compartiments.

3.2.1.2.1 Extraction des acides nucléiques

→ dans les coquillages

Les tissus sont broyés dans un tampon PBS/NaCl, puis les virus sont élués par un mélange chloroforme/butanol. Après centrifugation, les capsides virales sont cassées par digestion enzymatique par la protéinase K en présence d'un milieu détergent au bain marie à 56° C pendant 30 mn. Les acides nucléiques sont purifiés par extraction au phénol-chloroforme, précipitation au cethyltriméthylammonium bromide (CTAB) puis reconcentrés par précipitation éthanolique (Atmar *et al.*, 1995).

→ dans les selles de malades

L'ARN viral est extrait grâce à la méthode QIAmp Viral RNA (Qiagen) adaptée aux prélèvements de selles.

Remarque : Certains virus ont fait l'objet d'un examen préalable par une méthode ELISA : les rotavirus, selon la technique décrite par Pothier *et al.* (1987), et les astrovirus (IDEIA™ DAKO). Lorsque les résultats sont positifs, la recherche par RT-PCR est réalisée selon les techniques décrites.

Des recherches d'adénovirus ont également été effectuées dans les selles de malades, par méthode ELISA (Adénoclone[®] 40/41, Meridan diagnostic).

3.2.1.2.2. Amplification des ARN viraux

Les virus recherchés étant des virus à ARN, une première étape de transcription en ADN est nécessaire avant l'amplification. Celle-ci est réalisée par une reverse transcriptase - 50 U/réaction (MuLV-RT Perkin-Elmer) en présence d'un mélange de nucléotides - 0,5mM

(dATP, dCTP, dGTP, dTTP - Pharmacia) et de l'amorce de transcription - 2,5 µM (Genset) dans un volume de 20 µl pour 2 µl d'extrait, pendant 15 mn à 42° C. Pour les Rotavirus, virus à ARN double brin, il est nécessaire de dénaturer l'ARN à l'aide d'hydroxyméthylmercure - 10 mM (Serva) pendant 5 mn à température ambiante afin que la transcription ait lieu.

Puis 30 µl de réactif de PCR contenant la deuxième amorce sont ajoutés. Après une dénaturation initiale de 1 mn à 94° C, 40 cycles d'amplification sont réalisés (Thermocycleur Perkin-Elmer 9600 ou 2400), à l'aide d'une DNA polymérase - 5 U/réaction (Amplitaq DNA Polymerase - Perkin-Elmer), avec pour chaque cycle une étape de dénaturation de 30 s à 94° C, une hybridation de 30 s à une température spécifique à chaque couple d'amorces, et une élongation de 30 s à 72° C. Une élongation finale de 3 mn à 72° C est ensuite effectuée.

La liste des amorces utilisées suivant les virus est détaillée par la suite. Il s'agit :

- pour les entérovirus, d'amorces spécifiques du groupe situées dans la région 5'NC (Kopecka et al. 1993 ; Le Guyader *et al.*, 1994) ;
- pour le virus de l'Hépatite A, d'amorces situées dans la région codant pour la protéine de capsid VP1 (Le Guyader *et al.*, 1994) ;
- pour les rotavirus, d'amorces spécifiques du groupe A situées sur le gène 9 dans la région codant pour la protéine de capsid VP7 (Dubois *et al.*, 1997) ;
- pour les calicivirus, de six amorces, dont une amorce dégénérée pour la RT, situées dans la région codant pour la 3D polymérase (Le Guyader *et al.*, 1996) ;
- pour les astrovirus, d'amorces situées dans la région 3'NC (Mitchell *et al.*, 1995).

La révélation est effectuée par électrophorèse des produits d'amplification en gel de polyacrylamide à 9 %, suivie d'une coloration au bromure d'éthidium. La lecture est effectuée sous UV à l'aide d'un analyseur d'images (Fluor-S Multilmager - Biorad - fig. 4).

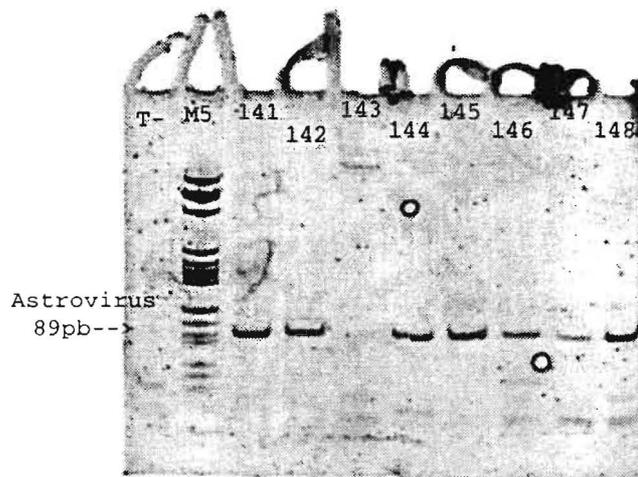


Figure 4 : Produits d'amplification des Astrovirus

T- : témoin négatif
M5 : Marqueur V Boerhinger
141-148 : échantillons

3.2.1.2.3. Hybridation des produits d'amplification

Afin d'augmenter la sensibilité et la spécificité de la réaction, une étape d'hybridation des produits de PCR avec des oligosondes spécifiques marquées est réalisée. Différentes sondes sont utilisées pour mettre en évidence la totalité des virus recherchés (5 sondes pour rotavirus et calicivirus, 1 sonde pour entérovirus, virus de l'hépatite A et astrovirus). Ces sondes sont au préalable marquées à froid par la digoxigénine, pour permettre une révélation par chemiluminescence (kit de marquage 3' End Labelling Kit Boehringer).

Les produits d'amplification sont dilués dans un tampon TrisHCl 10mM/EDTA 1mM dénaturés par chauffage à 95° C pendant 5 mn puis brusquement refroidis. Ils sont ensuite déposés sur une membrane de nylon (Boehringer), chargée positivement, et fixés à celle-ci par aspiration sous vide (technique du dot-blot). L'adhésion est renforcée par les UV.

Après une préhybridation de 30 mn, la membrane est mise en contact avec la sonde marquée pendant 2 heures à la température d'hybridation correspondante (50° C pour entérovirus, calicivirus et astrovirus, 45° C pour virus de l'hépatite A, 42° C et 38° C pour Rotavirus). Une série de lavages est ensuite effectuée.

La révélation est réalisée par fixation à la sonde d'un anticorps marqué à l'aide d'une phosphatase couplée à une molécule de digoxigénine (AntiDig-AP - Boehringer), puis par action de cette enzyme sur un composé chemiluminescent (CSPD - Boehringer) provoquant l'émission de lumière. La membrane est ensuite mise en contact avec un film photographique pendant 40 mn à 37° C, puis le film est révélé (fig. 5).

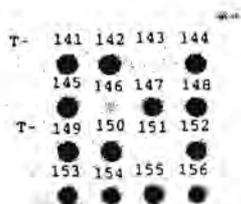


Figure 5 : Hybridation des produits amplifiés pour Astrovirus

T- : témoin négatif

141-156 : échantillons

3.2.1.2.4. Contrôle de l'inhibition

Les chairs de coquillages sont fortement chargés en substances pouvant inhiber les réactions enzymatiques utilisées ici pour la recherche des virus (détergents, acides humiques, polysaccharides, ions,...). Afin de vérifier l'efficacité de l'étape de purification, une réaction d'amplification d'un Contrôle Interne exogène a été mise au point par le laboratoire (Le Guyader *et al.*, 1997). Ce contrôle interne consiste en un fragment de génome de Poliovirus type 1 dont une petite partie de 121 pb a été délétée afin de permettre sa mise en évidence distinctive sur gel de polyacrylamide.

Un nombre connu de copies du contrôle interne est introduit avec l'extrait dans une réaction de transcription et soumis à l'amplification. La révélation par électrophorèse permet de vérifier si ce fragment a été amplifié ou non, mettant ainsi en évidence l'efficacité de cette amplification et l'effet d'éventuels inhibiteurs. En cas de présence d'inhibiteurs des étapes supplémentaires de purification sont effectuées (colonne de séphadex, cellulose granulaire) ou une nouvelle extraction est réalisée.

3.2.1.2.5. Séquençage des amplicons

Afin de typer les souches au plan moléculaire et de pouvoir comparer celles trouvées dans l'environnement et dans la population, les PCR positives en VHA ou CV détectés dans les échantillons de coquillages et de selles ont été séquençés. Ce séquençage est réalisé sur les produits d'amplification de la RT-PCR.

Le séquençage a été réalisé sur séquenceur automatique ABIprism 373 (Perkin Elmer) à l'aide des réactifs ABIPrism AmpliTaq FS Dyedeoxyterminator (Perkin Elmer). Les fragments amplifiés inférieurs à 200 paires de base ou en quantité faible ont été clonés dans *E. coli* (TA cloning kit, Invitrogen). Après culture sur milieu solide les clones positifs ont été sélectionnés par minipréparation (Sambrook *et al.*, 1989). Pour chaque fragment au moins deux clones ont été séquençés.

Le génotypage des rotavirus a porté sur les groupes G et P (Gouvea *et al.*, 1990 ; Gentsch *et al.*, 1992).

Le séquençage des échantillons de coquillages a été effectué par la société ESGS , celui des échantillons de selles par le laboratoire de Virologie de l'Hôpital du Bocage de Dijon.

La phylogénie des séquences a été réalisée par création d'un arbre à l'aide du programme Phylip après alignement sous clustawl (GCG, version 10, Wisconsin package).

3.2.2. Recherche de bactériophages

Le bactériophage choisi est le F+ARN spécifique appartenant à la famille des Léviridae (MS2), il infecte des bactéries telles que *E. Coli* ou *Salmonella spp* par l'intermédiaire de pili sexuels de fertilité (F). Ce groupe est assez homogène. Il a une structure et une taille comparable aux entérovirus (20 à 27 nm). D'autre part il a un ARN monobrin comme la plupart des virus entériques humains résistant dans l'environnement ce qui l'a fait choisir comme indicateur viral

3.2.2.1. *Préparation de l'échantillon pour la recherche des bactériophages dans les coquillages*

La recherche des bactériophages a été réalisée par le laboratoire de Microbiologie de Brest (IFREMER). Les analyses pour la recherche des bactériophages ont commencé sur des séries d'échantillons congelés à partir d'août 95 pour le point 12 de l'étang de Thau, en janvier 1996 pour le Prévost et février 1997 pour les prélèvements de Sète, puis sur des échantillons frais à partir d'août 97 pour l'ensemble des points de l'étude.

La préparation de l'échantillon se fait de la même manière que pour la recherche de virus de façon à ce que les résultats soient comparables. Dès réception au laboratoire, les coquillages sont ouverts et, après dissection, les hépatopancréas sont analysés directement ou congelés. Pour l'analyse, ces tissus sont broyés en présence de PBS/NaCl et de chloroforme/butanol. Les particules phagiques et virales sont précipitées par ajout de cat-floc, après 15 min de décantation à 20° C, l'échantillon est centrifugé 15 min à 4° C et à

13 500 g. Le surnageant est repris dans 3 ml de PEG/NaCl puis agité 1 h à 4° C. Une dernière centrifugation (20 min, 11 000 g à 4° C) permet de récupérer un culot qui est dilué dans de l'EPS pour analyse (Atmar *et al.*, 1995).

3.2.2.2. Analyse des bactériophages

La méthode de détection est basée sur la norme ISO 10705-1 (1995) qui concerne la détection et le dénombrement des F+ARN spécifiques dans les eaux.

Le principe de la méthode est simple (fig. 6). Il consiste à mélanger un volume connu de l'échantillon avec une culture de la bactérie hôte, à incorporer le tout à de la gélose molle (semi-solide maintenue en surfusion à 50°C) et à couler le mélange dans une boîte de Pétri.

Après une incubation de 18 h à 37° C, chaque phage présent dans l'inoculum est multiplié au dépens du tapis de bactéries hôtes, ce qui se traduit par la formation de halos clairs correspondant aux plages de lyses. La quantification est réalisée en comptant les plages de lyses et en les rapportant à 100 ml d'eau ou au poids de coquillage analysé. Les résultats sont exprimés en Plage Formant Unité - PFU/100 ml.

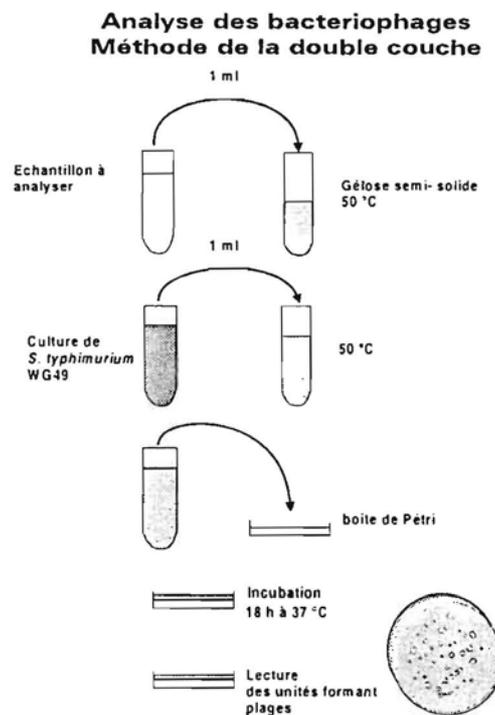


Figure 6 : Analyse des phages

La souche hôte utilisée pour cette méthode est *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*.

Un contrôle de qualité de cette bactérie est effectué avant l'analyse. Par ailleurs un témoin constitué d'une solution de phages de titre connu permet de vérifier le bon état de la bactérie hôte.

4. Résultats

4.1. Contamination virale dans les coquillages :

4.1.1. Analyses de la contamination virale des coquillages par secteur sur trois années

L'analyse des résultats porte sur la période août 95 - juillet 98 et sur 176 échantillons de coquillages (105 dans l'étang de Thau, 35 dans l'étang du Prévost et 36 dans les canaux de Sète). Rappelons que ces analyses virales permettent de mettre en évidence l'ARN viral.

Le tableau 2 présente le pourcentage de résultats positifs pour chacun des virus recherchés dans les trois secteurs d'étude sur la période considérée. Le secteur de l'étang de Thau, classé A, ne présente pas de contamination par le virus de l'hépatite A. Tous les autres virus recherchés sont détectés dans des proportions proches de 20 % sauf pour le rotavirus présent dans plus de 28 % des échantillons. Par contre, dans les deux autres secteurs d'étude classés respectivement C et D tous les virus recherchés sont trouvés. Le pourcentage de résultats positifs en virus de l'hépatite A est comparable d'un secteur à l'autre, inférieur à 20 %. Concernant les autres virus, les pourcentages varient entre 26 et 49 % dans l'étang du Prévost où l'astrovirus est le virus le plus souvent détecté et entre 41 et 61 % dans les canaux de Sète. Dans ce cas, c'est de nouveau les rotavirus qui prédominent. De ces deux secteurs, ce sont les canaux de Sète qui apparaissent les plus contaminés.

	Thau (A)	Prévost (C)	Canaux de Sète (D)
N	105	35	36
EV Total	21	14	19
EV %	20,0	40,0	52,8
VHA Total	0	6	4
VHA %	0,0	17,1	11,1
CV Total	24	9	17
CV %	22,9	25,7	47,2
AV Total	18	17	20
AV %	17,1	48,6	55,6
RV Total	30	16	22
RV %	28,6	45,7	61,1

Tableau 2 : Importance de la contamination virale dans les coquillages au cours de la période d'étude.

Les figures suivantes (fig. 7 et fig. 8) présentent la répartition mensuelle de cette série de données (août 1995 à juillet 1998) pour chacun des virus étudiés. A cette étape, l'analyse des résultats est présentée de façon globale, sans tenir compte des années, afin de souligner la saisonnalité des phénomènes de contamination virale de l'environnement littoral, enregistrés dans les coquillages. Nous présenterons par la suite les variations annuelles observées. Nous avons regroupé les résultats obtenus dans l'étang du Prévost et dans les canaux de Sète dans la figure 8, car les données, correspondant pour chaque secteur à un

seul point échantillonné mensuellement, sont quantitativement insuffisantes pour permettre une analyse pertinente comme le montrent les tableaux 3 et 4.

Prévoist	VHA	CV	AV	EV	RV
N ^o	3	3	3	3	3
octobre	0	0,0	33,3	66,7	33,3
novembre	33,3	33,3	66,7	66,7	33,3
décembre	100,0	66,7	100,0	100,0	66,7
janvier	33,3	100,0	66,7	66,7	100,0
février	33,3	33,3	66,7	33,3	66,7
mars	0,0	33,3	66,7	33,3	33,3
avril	0,0	0,0	66,7	33,3	66,7
mai	0	0,0	0,0	0	0,0
juin	0	0,0	66,7	33,3	66,7
juillet	0	0,0	0	0,0	0,0
Août	0	0,0	0,0	33,3	66,7
septembre	0,0	0,0	33,3	0,0	0,0

Tableau 3 : Détection de particules virales dans les coquillages de l'étang du Prévoist suivant les virus recherchés au cours de la période d'étude (résultats exprimés en %).

Canaux	VHA	CV	AV	EV	RV
N ^o	3	3	3	3	3
octobre	0	33,3	66,7	33,3	66,7
novembre	0,0	66,7	100,0	66,7	33,3
décembre	0,0	100,0	100,0	100,0	66,7
janvier	33,3	66,7	66,7	100,0	66,7
février	0,0	33,3	33,3	33,3	66,7
mars	33,3	66,7	100,0	100,0	66,7
avril	33,3	33,3	33,3	66,7	100,0
mai	0	0,0	66,7	0	66,7
juin	0	33,3	0,0	0,0	66,7
juillet	0	0,0	0	0,0	0,0
Août	0	66,7	66,7	66,7	33,3
septembre	33,3	33,3	33,3	66,7	100,0

Tableau 4 : Détection de particules virales dans les coquillages de les canaux de Sète suivant les virus recherchés au cours de la période d'étude (résultats exprimés en %).

Dans l'étang de Thau (fig. 7), la contamination par les calicivirus est sporadique avec une absence de résultat positif en février, avril et août. Par contre, elle est forte en novembre où près de 90 % des échantillons sont positifs. Les rotavirus, les astrovirus et les entérovirus présentent une saisonnalité hivernale, avec un maximum en décembre pour le premier (près de 90 % des échantillons sont positifs) et en janvier pour les derniers (respectivement 78 et 56 % des analyses positives). De plus pour les entérovirus, on observe un second pic de contamination en août, de moindre amplitude toutefois (38 % de recherches positives).

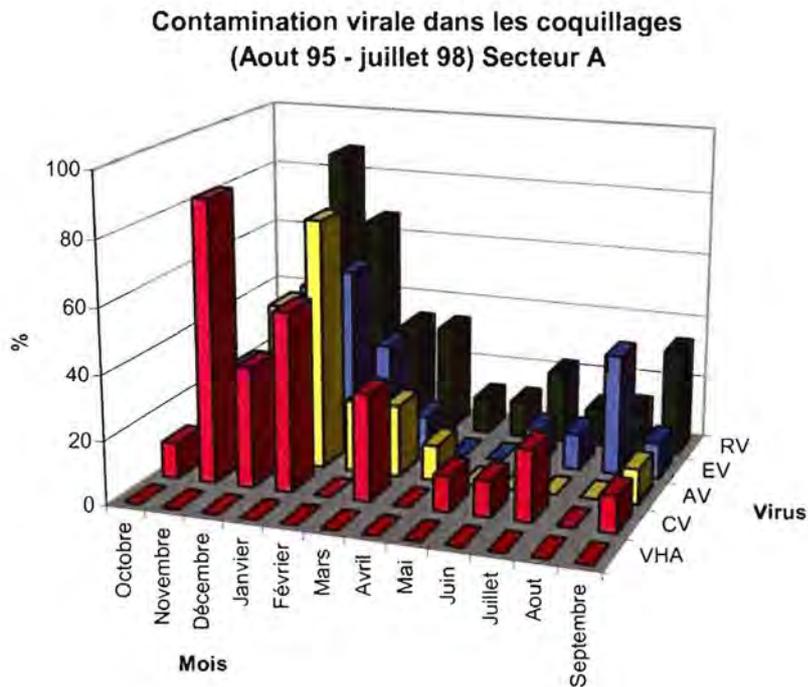


Figure 7 : Contamination virale dans les coquillages dans l'étang de Thau (secteur A).

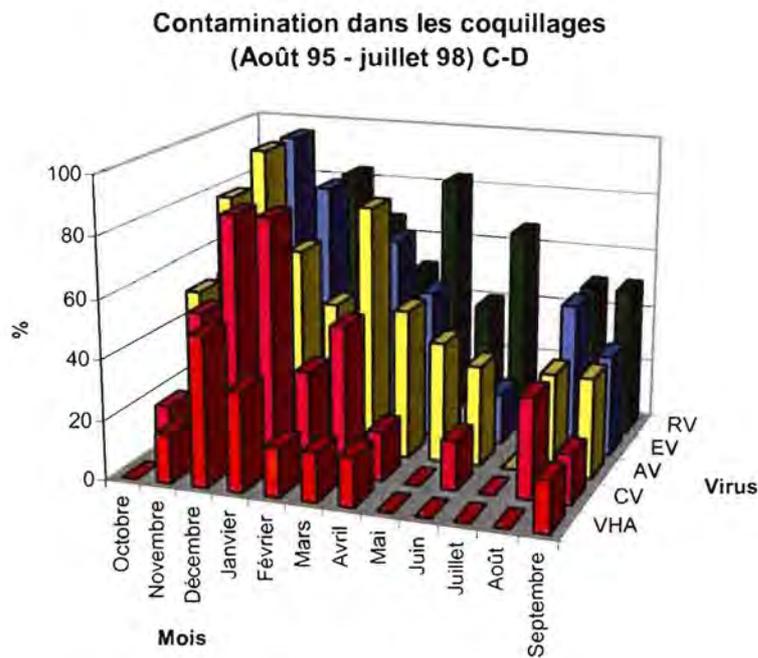


Figure 8 : Contamination virale dans l'étang du Prévost et dans les Canaux de Sète, classés respectivement C et D.

Le contraste entre la figure 7 et la figure 8 souligne la forte contamination virale des secteurs classés en C et D avec une saisonnalité hivernale marquée couvrant également la fin de l'automne et le début du printemps. Un maximum est observé en décembre, pour le virus de l'hépatite A (50 % des échantillons sont positifs) et pour les calicivirus (83 % des analyses sont positives). De même, les coquillages prélevés en décembre sont fortement contaminés en astrovirus et en entérovirus puisque 100 % des échantillons sont positifs pour ces virus. Les maxima sont observés en janvier et en avril pour les rotavirus avec plus de 80 % des échantillons contaminés ; ce groupe de virus reste largement présent dans les coquillages tout le long de l'année, la plupart du temps dans plus de 40 % des échantillons. Aucun des virus recherchés n'a été détecté en juillet.

4.1.2. Etudes des variations annuelles

Pour chaque virus, les résultats sont présentés chronologiquement de 1995 à 1998. La série de données est limitée dans le temps et basée sur un petit nombre de points d'observation. C'est pourquoi les résultats ont été regroupés par saison. L'été correspond à juillet, août et septembre, l'automne à octobre, novembre et décembre, l'hiver à janvier, février et mars et le printemps à avril, mai, juin. Les résultats correspondant à l'été 95 et l'été 98 sont peu représentatifs car ils ne reposent que sur deux mois de prélèvements pour le premier et sur un mois seulement pour le second. Comme précédemment et pour les raisons évoquées plus haut, nous avons regroupé les résultats observés dans les deux zones très contaminées, l'étang du Prévost et les canaux de Sète.

Le virus de l'hépatite A est présent uniquement dans les secteurs C et D, principalement à l'automne et en hiver et plus sporadiquement au cours des autres saisons. Les fréquences de détection de ce virus ne diffèrent pas d'une année à l'autre (fig. 9).

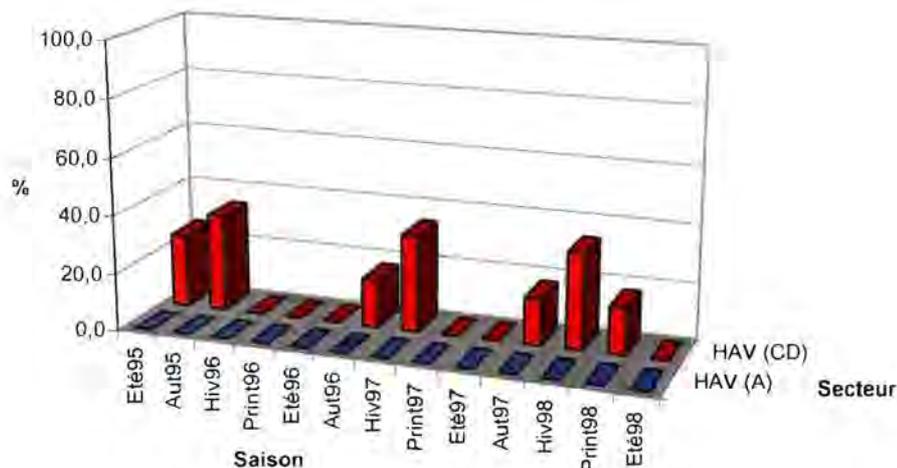


Figure 9 : Présence de virus de l'hépatite A dans les coquillages des deux secteurs contaminés (l'étang du Prévost - C, et canaux de Sète - D) au cours de la période d'étude.

Concernant les autres virus, ils sont présents à la fois dans l'étang de Thau et dans les deux autres secteurs étudiés. Par contre pour chacun des autres virus recherchés, la contamination des coquillages est plus importante dans l'ensemble Prévost-Canaux de Sète. De plus, et ceci pour l'ensemble des secteurs étudiés, elle semble plus marquée au cours des deux premières années de l'étude.

Les entérovirus (fig. 10) ont été régulièrement retrouvés dans les échantillons jusqu'au début 1997 (maxima observés en été 96 dans l'étang de Thau - 56 % de résultats positifs - et en automne 95 et 96 puis en hiver 97 dans l'ensemble Prévost-Canaux de Sète - 83 % de résultats positifs).

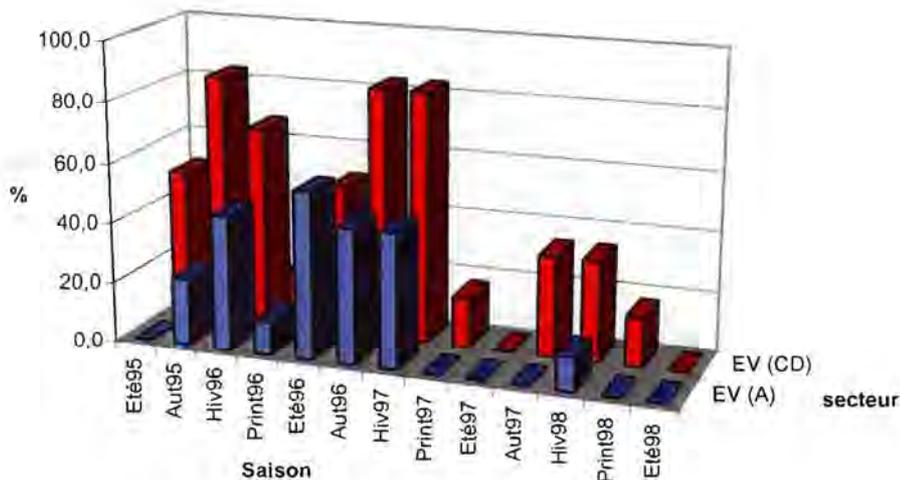


Figure 10 : Contamination des coquillages par les entérovirus de 1995 à 1998 respectivement dans l'étang de Thau (secteur A) et dans les deux autres secteurs (étang de Prévost - C, et canaux de Sète - D).

La contamination par les calcivirus (fig. 11) a été plus importante au cours de la deuxième année d'étude (67 % de résultats positifs en automne 96 contre 33 % en automne 95 et automne 97 en valeur maximale observée dans l'étang de Thau et 100 % en hiver 97 contre 50 % et 33 % en automne 95 et 97 dans l'ensemble Prévost-Canaux de Sète).

Concernant les astrovirus et les rotavirus (fig. 12 et fig. 13), les variations annuelles sont plus délicates à observer et ne sont pas reproductibles d'un secteur à l'autre. Le pourcentage de détection des astrovirus dans les coquillages de l'étang de Thau est légèrement plus marqué au cours de l'hiver 96 (56 %) par rapport aux deux autres années (hiver 97 et 98, 33 %). Par contre dans l'ensemble Prévost-Canaux de Sète, c'est en automne 96 que les détections sont les plus importantes (100 %). Pour les rotavirus, le maximum de contamination a été observée en hiver 96 pour l'étang de Thau (100 % de résultats positifs), par la suite les pourcentages de détection n'ont jamais dépassé 50 %. Dans l'ensemble Prévost-Canaux de Sète, les maxima ont été enregistrés au printemps 96 et à l'automne 96 (100 % de détections positives) ; mais la fréquence observée en hiver 98 est peu différente (0,83).

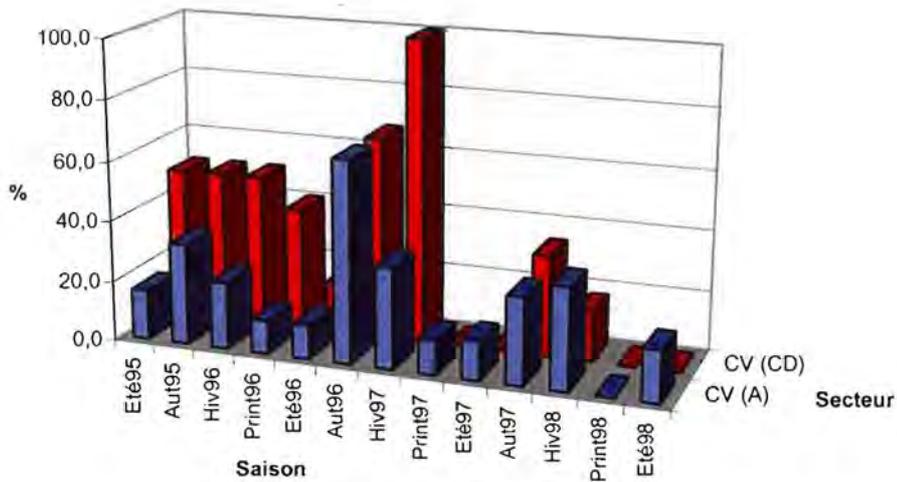


Figure 11 : Contamination des coquillages par les calicivirus de 1995 à 1998 respectivement dans l'étang de Thau (secteur A) et dans les deux autres secteurs (étang de Prévost - C, et canaux de Sète - D).

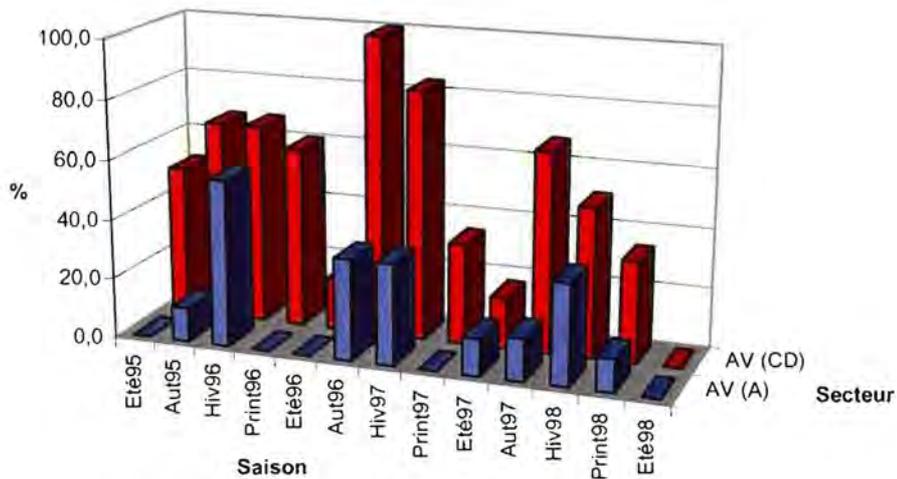


Figure 12 : Contamination des coquillages par les astrovirus de 1995 à 1998 respectivement dans l'étang de Thau (secteur A) et dans les deux autres secteurs (étang de Prévost - C, et canaux de Sète - D).

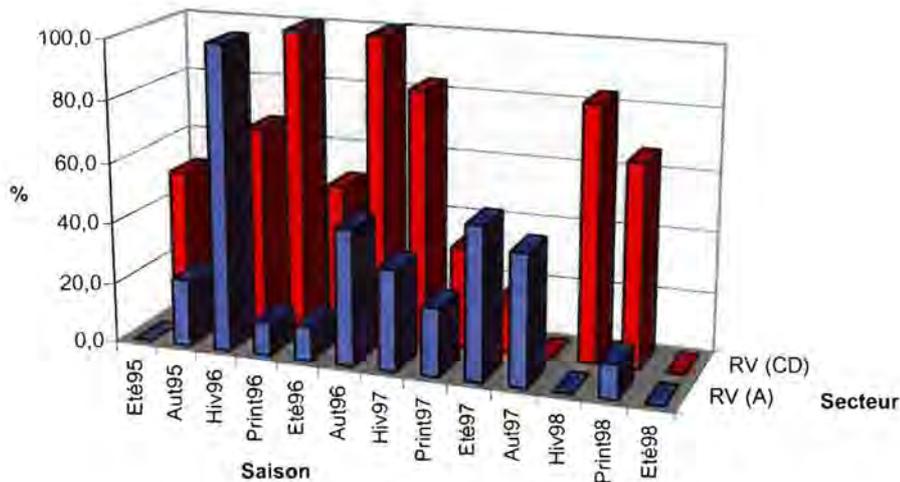


Figure 13 : Contamination des coquillages par les rotavirus de 1995 à 1998 respectivement dans l'étang de Thau (secteur A) et dans les deux autres secteurs (étang de Prévost - C, et canaux de Sète - D).

4.1.3. Contamination des coquillages par les bactériophages

La contamination des coquillages par les F+RNA spécifiques peut s'observer surtout dans les zones conchylicoles de faible qualité (fig. 14) . Pour ce dernier, des valeurs élevées se retrouvent systématiquement pendant l'hiver en début d'année 1996, 1997 et 1998, mais au cours de ces trois années, elles décroissent globalement. On observe également une décroissance de ces valeurs au cours des trois années étudiées. En ce qui concerne les canaux de Sète, les concentrations en F+RNA spécifiques sont toujours élevées au cours de la période étudiée avec une moyenne de 125 UFP pour 1,5 g de glande digestive analysée et il n'y pas vraiment de phénomène de saisonnalité bien marqué.

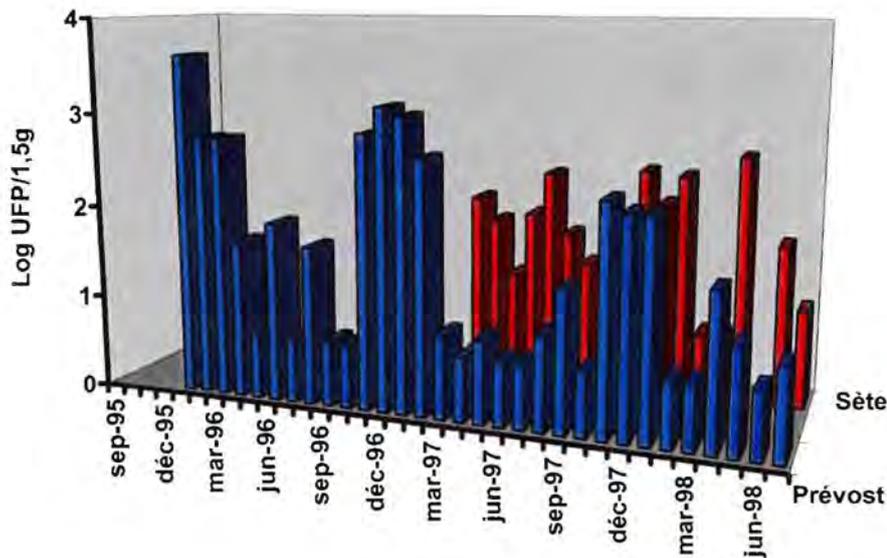


Figure 14 : Contamination des coquillages par les F+RNA spécifiques dans les secteurs du Prévost et des canaux de Sète.

Pour le secteur de l'étang de Thau, zone classée A (fig. 15), on note une grande similitude des résultats obtenus pour ces trois points en ce qui concerne la présence de bactériophages. Les résultats se situent en grande majorité en dessous de la limite de détection c'est-à-dire inférieurs à 2,5 UFP pour 1,5 g de glande digestive analysée. On note cependant une forte contamination du point 12 en mars 1998, contamination identique à celle observée au même point à la même période en 1996.

Dans la zone A, seulement 29 % des résultats sont positifs en phages, contre 66 % pour les échantillons issus de l'étang du Prévost et 86 % pour ceux des canaux de Sète.

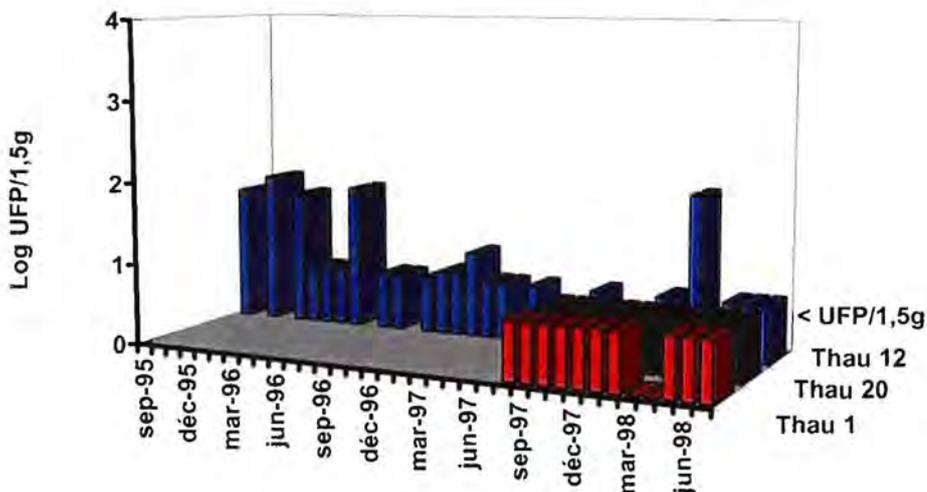


Figure 15 : Contamination des coquillages par les F+RNA spécifiques dans l'étang de Thau.

4.1.4. Représentativité des entérovirus comme indicateur viral

Nous avons testé la validité des entérovirus comme indicateur de la présence des autres virus, en séparant les résultats obtenus dans chacun des secteurs A, C et D (tabl. 5, 6 et 7). Les rapports de simultanéité suivants ont été calculés (résultats exprimés en pourcentage) :

- présence simultanée d'entérovirus et de virus de l'hépatite A,
- présence simultanée d'entérovirus et de calicivirus,
- présence simultanée d'entérovirus et d'astrovirus,
- présence simultanée d'entérovirus et de rotavirus,
- présence simultanée d'entérovirus et d'au moins un des virus suivants (VHA, CV, AV ou RV = Autr.vir.),
- présence simultanée d'entérovirus et d'au moins un des virus responsables de gastro-entérites (CV, AV ou RV = Vir gastr.).

Dans l'étang de Thau (tabl. 5), les entérovirus ont été retrouvés 21 fois sur 105 échantillons analysés. Les rapports de simultanéité des entérovirus avec les autres virus sont inférieurs ou égaux à 50 % pour chacun des autres virus testés (rappelons que le virus de l'hépatite A n'a jamais été détecté dans les échantillons de l'étang de Thau). Ce rapport reste limité (57 %) lorsqu'on compare la présence simultanée des entérovirus avec l'un au moins des autres virus recherchés (Aut. Vir = Vir. Gast., dans ce cas de figure en l'absence de virus de l'hépatite A). Les entérovirus n'apparaissent pas comme de bons indicateurs viraux dans les zones faiblement contaminées.

Secteur A	n	%
EV total	21	
EV / VHA	-	
EV / CV	7	33,3
EV / AV	9	42,9
EV / RV	11	52,4
EV / Autr.Vir	12	57,1
EV / Vir.Gast.	12	57,1

Tableau 5 : Rapport de simultanéité entre les entérovirus et les autres virus recherchés dans le secteur A (étang de Thau).

Dans l'étang du Prévost (tabl. 6), plus fréquemment contaminé, les entérovirus ont été détectés dans 14 des 35 échantillons testés. Les rapports de simultanéité observés sont plus importants que dans le cas de l'étang de Thau, ils sont compris entre 43 % pour le virus de l'hépatite A et 86 % pour les astrovirus. En revanche, les entérovirus sont présents simultanément avec au moins un des virus recherchés dans 93 % des cas.

Secteur C	n	%
EV total	14	
EV / VHA	6	42,9
EV / CV	7	50
EV / AV	12	85,7
EV / RV	10	71,4
EV / Autr.Vir	13	92,9
EV / Vir.Gast.	13	92,9

Tableau 6 : Rapport de simultanéité entre les entérovirus et les autres virus recherchés dans le secteur C (étang du Prévost).

Dans les canaux de Sète (tabl. 7), les entérovirus ont été retrouvés dans plus de la moitié des échantillons (19 sur 36). Les résultats pour chaque virus pris individuellement sont comparables à ceux enregistrés dans l'étang du Prévost, soulignant également l'importance de la contamination virale dans ce secteur. Par contre, seule la relation EV/CV, proche de 58 % est plus forte ici. Plus globalement, lorsque l'un des virus suivants - VHA, CV, AV ou RV - est détecté, il est accompagné à chaque fois d'un entérovirus. Après élimination du virus de l'hépatite A, il est présent avec l'un des virus responsables de gastro-entérite dans 95 % des cas.

Dans les secteurs contaminés, les entérovirus laissent apparaître des dispositions en tant qu'indicateur viral. Cependant, ces premiers résultats restent limités car ils portent sur un petit nombre d'échantillons.

Secteur D	n	%
EV total	19	
EV / VHA	4	21,1
EV / CV	11	57,9
EV / AV	15	78,9
EV / RV	13	68,4
EV / Autr.Vir	19	100
EV / Vir.Gast.	18	94,7

Tableau 7 : Rapport de simultanéité entre les entérovirus et les autres virus recherchés dans le secteur D (canaux de Sète).

4.2 - Contamination virale observées dans la population

Le tableau 8 présente le nombre de selles récoltées dans la population générale au cours de chaque période d'échantillonnage ainsi que les informations recueillies simultanément sur cette population échantillonnée. L'échantillonnage est très faible, essentiellement centré sur Sète et Montpellier. La population échantillonnée est constituée principalement d'adultes. Compte tenu de ces éléments, l'interprétation des résultats reste très limitée.

	Caractéristique de la population				Origine			
	N ^{bre} selle	Enfant	Adulte	Inconnu	Montpellier	Sète	Autre	Inconnu
Eté 1996	3	1	2	-	-	3	-	-
Hiver 1996-1997	20	-	18	2	14	5	1	-
Eté 1997	6	-	3	3	5	1	-	-
Hiver 1997-1998	22	-	22	-	14	1	2	5
Eté 1998	36	18	15	3	-	36	-	-

Tableau 8 : Caractéristiques de la population échantillonnée (selles de malades) pendant la période d'étude

A ce tableau s'ajoutent l'échantillon obtenu au CHU Lapeyronie de Montpellier sur des enfants hospitalisés pour gastro-entérites au cours de l'hiver 97-98. Il s'agit de 10 selles d'enfants toutes positives en rotavirus. Des souches classiques ont été retrouvées : G1P[8] (n=5) ; G4P[8] (n=4) ; G2P[4] (n=1).

Les échantillons de selles de malades diarrhéiques, récoltés en hiver dans la population générale, présentent une contamination virale à dominante calicivirus, 65 % au cours de l'hiver 1996-1997, 45 % au cours de l'hiver 1997-1998. Parmi les autres virus, seul l'astrovirus a été détecté une fois. Ces résultats sont obtenus sur des adultes (tableau 9).

En été 1996, astrovirus et adénovirus ont été parfois détectés (tabl. 9) mais sur un échantillonnage non représentatif. Aucun virus n'a été mis en évidence dans les six selles récoltées au cours de l'été 1997. Huit pour cent de l'échantillon récolté en septembre 1998 présente une contamination virale (entérovirus et adénovirus). Ce dernier échantillon a été prélevé lors d'une épidémie survenue brusquement à Sète au début septembre 98, probablement associée à la consommation d'eau de distribution. Une étiologie parasitaire à *Cryptosporidium parvum* a été suspectée.

Périodes	Entérovirus	Rotavirus	Astrovirus	Adénovirus 40/41	Calicivirus
Eté 96	0/3	0/3	2/3 adultes	1/3 adultes	0/3
Hiver 96-97	2/20	0/20	1/20 adulte origine : Sète	0/20	13/20 (65 %) dont 12 adultes origine : 3 Sète 10 Montpellier
Eté 97	1/6	0/6	0/6	0/6	0/6
Hiver 97-98	2/22	0/22	0/22	0/22	10/22 (45 %) tous adultes origine : 8 Montpellier 1 Juvignac 1 indéterminé
Septembre 98	2/36 enfants	0/36	0/36	1/36 suspecté	0/36

Tableau 9 : Résultats analytiques obtenus dans les selles de malades échantillonnées pendant la période d'étude.

Le tableau 10 donne par comparaison les caractéristiques cliniques des gastro-entérites dans l'ensemble de la population échantillonnée au cours de l'hiver 1997-1998 et celles concernant les individus dont les selles sont positives en calicivirus. Les gastro-entérites à calicivirus touchent un groupe d'individus à peine plus âgés (médiane 49 ans contre 42 ans). Par contre, les symptômes ne sont pas différents ; seule leur durée est légèrement plus réduite pour les cas de gastro-entérites à calicivirus.

La selle, obtenue auprès d'un patient hospitalisé pour une hépatite A lors de l'épidémie observée au début de l'année 1998, était positive en VHA. Il s'agissait d'un adulte né en 1950 mais ne résidant pas dans l'Hérault.

	Age			Durée			Symptôme				
	N ^{re}	Médiane	Min-Max	N	1 jour	2 jours	N	Vomissement	Diarrhée	Nausée	Fièvre
Echantillon global	22	42	19 - 86	15	13 (87 %)	2 (13 %)	16	12 (75 %)	16 (100 %)	13 (81 %)	5 (31 %)
Gastro entérites à calicivirus	10	49	31 - 86	9	9 (100 %)	-	9	7 (78 %)	9 (100 %)	7 (78 %)	2 (20 %)

Tableau 10 : Caractéristiques cliniques des gastro-entérites dans la population échantillonnée au cours de l'hiver 1997-1998



4.3. Comparaison entre les épidémies de diarrhées dans la population et la contamination virale des coquillages : analyse des séquences.

4.3.1. Epidémiologie moléculaire CV

Diversité des amorces utilisées pour détecter les CV :

Des études précédentes ont montré l'importance de l'utilisation de plusieurs couples d'amorces pour détecter toutes les souches de CV. En effet la diversité génomique des CV n'a pas permis pour le moment de définir une seule paire d'amorces consensus pouvant amplifier toutes les souches comme c'est le cas pour les EV ou VHA par exemple. Les résultats obtenus ici démontrent l'intérêt d'utiliser plusieurs couples (tabl. 11).

	Méthode	P110/P36	P110/P112	P110/P69	P110/SR
Coquillages (n=51)	hybridation	34 (67%)	40 (78%)	1 (2%)	15 (29%)
Coquillages (n=14)	directe	7 (50%)	2 (14%)	0	5 (36%)
Selles (n=20)	directe	11 (55%)	6 (30%)	7 (35%)	15 (75%)

Tableau 11 : Pourcentage de détection des calicivirus en fonction des amorces utilisées.

Ainsi les échantillons de coquillages positifs ont été détectés en majeure partie avec deux couples d'amorces (P110/P36 et P110/P112). Le couple d'amorce P110/SR a également permis d'amplifier un certain nombre de séquences tandis qu'un seul échantillon a été détecté avec P110/P69. Certains échantillons ont donné des résultats positifs avec au moins deux couples d'amorces : cela peut s'expliquer soit par des communautés de séquences (deux couples d'amorces pouvant amplifier la même souche avec des sensibilités différentes) soit par un mélange d'au moins deux souches dans un même échantillon. La majorité des résultats présentés ici correspondent à des contaminations très faibles et donc les signaux, obtenus avec les amorces, ne sont détectés qu'après hybridation.

Les pourcentages de détection des calicivirus sont sensiblement comparables pour chaque couple d'amorces en méthode directe (sur gel) ou après hybridation, sauf dans le cas du couple P110/P112. Car en détection directe, le couple P110/SR présente une plus grande efficacité que le couple P110/P112.

Concernant l'analyse des selles, la concentration en virus est beaucoup plus importante et les résultats peuvent être obtenus directement sur gel sans nécessité d'augmenter la sensibilité par l'hybridation. Le couple P110/P36 a sensiblement la même efficacité d'amplification pour la mise en évidence des CV dans les selles que pour leur détection dans les coquillages. Par contre ces proportions sont inversées dans le cas des couples P110/P112 et P110/SR ; le premier est plus efficace pour la mise en évidence des CV dans les coquillages, le second dans les selles. Le couple P110/P69 amplifie 35 % des selles positives ; parmi celles-ci, une seule selle a été amplifiée uniquement par ce couple, alors que les autres l'ont été également par d'autres couples d'amorces.

Analyse des séquences :

La contamination virale des coquillages étant très faible, seule une partie des résultats positifs en calicivirus après hybridation a pu être séquencée. Parmi ces 23 séquences, 10 ont été obtenues à partir des amorces P110/P36, 6 avec P110/P112, 1 avec P110/P69 et 6 avec P110/SR.

L'analyse phylogénétique des séquences montre une relative diversité des souches détectées (fig. 16). En effet des souches proches des différents prototypes tels que virus de Norwalk, de Southampton mais aussi de Snow Mountain Agent, Hawaii ou Mexico ont été détectées. La distribution des souches dans l'arbre ne paraît pas corrélée à une distribution selon la période ou selon le lieu de prélèvement : des souches proches du virus de Norwalk ont été détectées en 1995, 1996 et 1997 et aussi bien à partir des échantillons des canaux de Sète que de l'étang de Thau. De même, des souches ayant une séquence très proche ont été détectées de 1995 à 1997 dans l'étang de Thau, du Prévost et les canaux de Sète. Une séquence identique a été détectée au point 12 de l'étang de Thau en novembre 1995 et mars 1996 et au point 20 en novembre 1995. De façon similaire une même séquence a été trouvée en novembre 1996 dans un échantillon prélevé dans l'étang de Thau et dans un échantillon prélevé dans les canaux de Sète. Deux échantillons prélevés dans les canaux de Sète en novembre 1995 et en décembre 1996 contenaient deux séquences différentes.

La diversité de séquences, observée dans les coquillages, se retrouve dans les échantillons de selle. En effet quatre échantillons sont proches du virus prototype Norwalk tandis que les autres séquences sont plus proches des virus de type SMA et Hawaii.

On enregistre une prédominance des souches proches du prototype Norwalk au cours du premier hiver (96-97), des souches proches de type SMA et Hawaii au cours du second hiver (97-98).

Aucune séquence n'a été trouvée identique à celle détectée dans les coquillages. Certaines homologues sont cependant retrouvées entre par exemple la selle 3M (adulte résidant à Montpellier) détectée en décembre 1996 et l'échantillon de coquillage du point 12 de l'étang de Thau prélevé en janvier 1997.

Par contre, quatre séquences obtenues à partir des selles sont relativement divergentes des séquences détectées dans les coquillages. Il s'agit de S4M détectée en décembre 1996 chez un adulte résidant à Montpellier, et de S38M, S34M et 31M trouvées entre la fin décembre 1997 et le début janvier 1998, chez des adultes résidant pour les deux premiers respectivement à Montpellier et Juvignac (pour le dernier, le lieu de résidence n'était pas précisé).

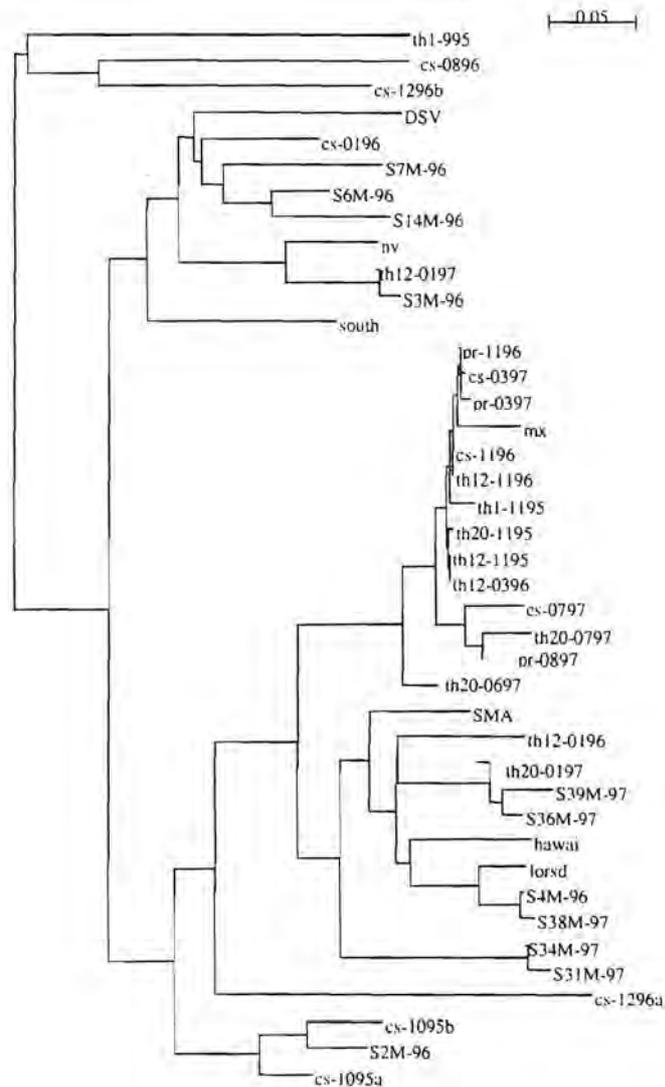


Figure 16 : Analyse phylogénique des souches de calicivirus détectées dans les prélèvements de coquillages en utilisant le programme 'phylip' (GCG, Infobiogen).

Légende : Abréviation et n° d'accèsion dans GeneBank :

sap : virus Sapporo , U65427 ; park : virus Parkville, U73124; lod : virus London, U95645 ; south : virus Southampton, L07418 ; DSV : virus Desert Shield, U04469 ; nv : virus Norwalk, M87661 ; SMA : virus Snow Mountain, L23831; lorsd : virus Lorsdale, X866557 ; hawaii : virus Hawai, U07611 ; mx : virus Mexico, U22498.
 pr : étang du Prévost ; cs : canaux de Sète ; th1 : étang de Thau point 1 ; th12 : étang de Thau point 12 ; th20 : étang de Thau point 20.

4.3.2. Épidémiologie moléculaire VHA.

Les amorces utilisées pour détecter les virus de l'hépatite A sont situées dans la région de jonction codant pour les protéines de capsid VP3-VP1. Cette région a été sélectionnée par de nombreux auteurs car c'est une des régions variables qui permet la comparaison des souches. Les mêmes amorces ont été utilisées pour amplifier les virus détectés dans les coquillages et dans les selles de malades.

Parmi les dix échantillons de coquillages positifs (six échantillons dans l'étang du Prévost et quatre dans les canaux de Sète), sept séquences ont été obtenues (quatre à partir des échantillons du Prévost et trois à partir des canaux de Sète). La diversité entre les différentes séquences est assez importante et laisse supposer des sources de contamination diverses (fig. 17). Cependant, il est surprenant de constater que les souches sont plutôt reliées par site que par date de prélèvement. Les échantillons sont différents des deux souches de référence (HM175, et CF53).

La séquence de la selle, prélevée chez un patient hospitalisé pour une hépatite A à Montpellier au début de l'année 1998, présente la plus forte homologie observée avec une séquence détectée en décembre 1995 dans l'étang du Prévost. Mais les pourcentages de similitudes ne sont pas suffisamment importants pour conclure à une ressemblance entre ces souches ; donc, ces deux souches virales sont différentes.

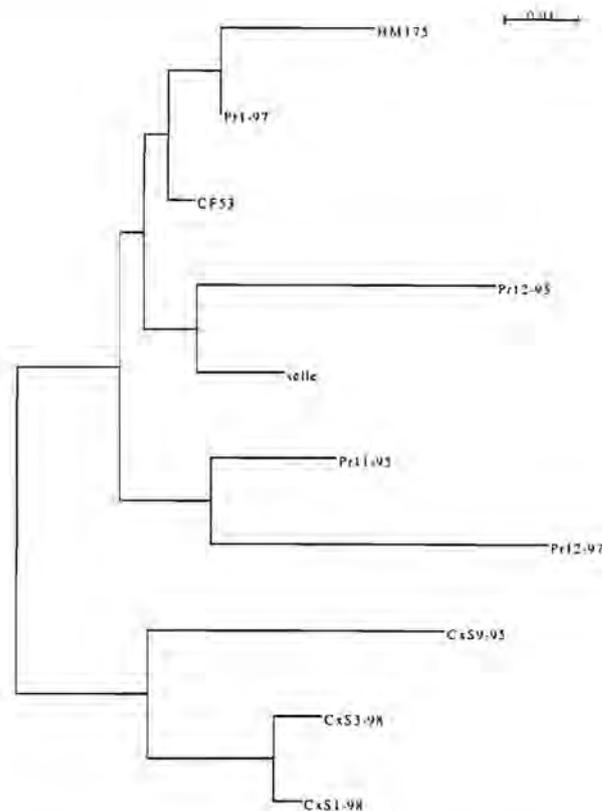


Figure 17 : Analyse phylogénétique des souches de virus d'hépatite A détectées dans les prélèvements de coquillages en utilisant le programme 'phylip' (GCG, Infobiogen).

Légende : pr : étang du Prévost ; cs : canaux de Sète ; selle : souche de malade ; CF53 et HM175 : souches de référence, M16632.

5. Discussion

Cette étude présente la contamination virale enregistrée dans des coquillages provenant de trois secteurs géographiquement distincts au cours d'une période de suivi de trois ans. **Les résultats obtenus démontrent l'efficacité des nouvelles techniques de biologie moléculaire pour la mise en évidence de particules virales dans des échantillons environnementaux.** Quatre des cinq virus recherchés ont été trouvés dans les coquillages de l'étang de Thau, secteur conchylicole classé A. Il s'agit des entérovirus, des calicivirus, des rotavirus et des astrovirus. Par contre, le virus de l'hépatite A n'a jamais été mis en évidence dans les huîtres de ce secteur A. Les cinq virus ont été détectés dans les deux autres secteurs, classés C et D. Ces derniers sont apparus qualitativement et quantitativement plus contaminés que le secteur A, confirmant ainsi le gradient de contamination bactériologique enregistré par le REMI.

Plusieurs auteurs ont souligné l'intérêt des méthodes de biologie moléculaire pour la mise en évidence de virus entériques dans les échantillons de l'environnement. Celles-ci permettent la détection rapide et spécifique de virus peu ou non cultivables, comme le virus de l'hépatite A et les calicivirus (Metcalf *et al.*, 1995 ; Pompepuy et Le Guyader, 1998 ; Sellwood *et al.*, 1998). Cependant, l'utilisation de cette technique pose le problème des faux positifs (liés aux risques de contamination lors de la manipulation en laboratoire) et des faux négatifs (persistance d'inhibiteurs). Le développement de contrôles internes permet de pallier en partie ces problèmes en évitant l'utilisation de souches virales de contrôle (présentant des risques de contamination secondaire des échantillons). Leur emploi autorise également l'évaluation de l'efficacité d'amplification dans chaque échantillon. De plus, à terme, ces contrôles internes permettront de fournir une estimation semi-quantitative de la contamination virale (Le Guyader *et al.*, 1997).

La question de l'intégrité structurale et de l'infectiosité du virus détecté par PCR reste toutefois posée. Elle est largement débattue dans la littérature (Metcalf *et al.*, 1995 ; Chung *et al.*, 1996 ; Slomka et Appleton, 1998). La persistance du génome viral nu dans l'eau de mer est peu probable car il est sensible aux conditions physico-chimiques du milieu environnant et à la présence d'enzymes (RNases, DNases) d'origines bactériennes notamment. De ce fait, il est détruit rapidement. Par conséquent, l'ARN détecté par PCR est très probablement contenu dans la capsid virale. Cependant, l'état de cette dernière après un séjour dans les eaux usées puis en milieu marin n'est pas connu et rien ne permet pour l'instant d'affirmer que la détection de particules virales dans des coquillages, indépendamment d'un contexte de toxi-infection alimentaire, implique un risque de pathologies pour le consommateur. Néanmoins, dans l'état actuel des connaissances, les résultats de la PCR soulignent la présence de virus entériques dans des échantillons environnementaux. Cette technique devrait passer en routine à court ou moyen terme, ouvrant ainsi des perspectives intéressantes comme indicateur potentiel du risque viral.

De nombreuses études publiées depuis plus de 30 ans ont démontré la présence de virus entériques dans les coquillages. Parmi celles-ci, Goyal *et al.* (1979) ont mis en évidence, par culture, la présence d'entérovirus dans des échantillons de coquillages naturellement contaminés, provenant de zones autorisées à l'exploitation comme de zones prohibées. Depuis, d'autres auteurs ont confirmé, en appliquant cette fois des techniques de PCR, que des zones répondant aux normes bactériologiques pouvaient être contaminées par des particules virales d'origine entérique tels que les entérovirus, le virus de l'hépatite A, les rotavirus et les calicivirus (Le Guyader *et al.*, 1994 ; Abad *et al.*, 1997 ; Henshilwood *et al.*, 1998 ; Green et Lewis, 1999 ; Lee *et al.*, 1999). En général, ces études soulignent que **le niveau de contamination virale est plus élevé en zone insalubre.** C'est également ce que nous avons observé dans notre secteur d'étude. Signalons toutefois que dans l'étang de Thau, les analyses ont porté sur des huîtres, et, dans l'étang du Prévost et les canaux de

Sète, sur des moules. Or les moules filtrent de plus grandes quantités d'eau que les huîtres. Cependant, à l'équilibre, on peut supposer que les niveaux de contamination sont comparables car si les moules sont susceptibles de concentrer davantage de particules virales que les huîtres, elles ont également la faculté de s'épurer plus rapidement.

La contamination virale observée dans les coquillages pendant l'étude s'est caractérisée par une composante saisonnière. Dans l'étang de Thau, les quatre virus détectés ont majoritairement été retrouvés pendant la mauvaise saison, en automne et en hiver. Cependant, pour les entérovirus, on a enregistré un second pic de contamination en été. Cette saisonnalité hivernale a été également observée dans les deux autres secteurs d'étude, pour quatre des cinq virus recherchés (EV, VHA, CV et AV) ; en revanche, les rotavirus ont été détectés toute l'année.

L'hypothèse d'une saisonnalité de la contamination virale des coquillages est peu développée dans la littérature. En effet, des résultats portant sur une période aussi longue (trois ans) n'ont, à notre connaissance, encore jamais été publiés. Henshilwood *et al.* (1998) ont observé, cependant, une contamination des coquillages par les calicivirus plus importante pendant la période hivernale. De même, des particules virales d'hépatite A ont été détectées, dans les moules, uniquement pendant l'automne et l'hiver au cours d'un suivi d'un an (Lee *et al.*, 1999). *A contrario*, aucune particule virale d'astrovirus n'a été trouvée dans les échantillons d'eau de mer et de sédiment au cours d'un suivi limité à la période estivale (Egglestone *et al.*, 1999).

Cette saisonnalité de la contamination virale observée dans les coquillages résulte probablement de phénomènes épidémiques enregistrés dans la population. En effet, les virus éliminés dans les selles de malades se retrouvent dans les eaux usées. Or les capacités épuratoires des stations d'épuration sont limitées pour les virus et les eaux épurées, rejetées dans les eaux superficielles ou directement en milieu marin, contiennent encore des particules virales.

Les infections à étiologie virale (virus entériques) présentent, en effet, des conditions épidémiologiques saisonnières. Les gastro-entérites causées par les rotavirus et les astrovirus sont observées pendant l'hiver (Desselberger, 1998). Les infections à calicivirus, bien que présentes toute l'année, semblent plus fréquentes à l'automne et pendant l'hiver ainsi qu'au printemps (Kapikian et Chanock, 1990 ; Vinjé *et al.*, 1997 ; Evans *et al.*, 1998 ; Otsu, 1999). En France un système de surveillance centrée sur la communauté urbaine de Lyon a mis en évidence deux périodes épidémiques pour l'hépatite A, l'une en automne, l'autre en hiver (Sepetjan, 1992). La distribution des infections à entérovirus dans la population présente un pic épidémique pendant l'été et le début de l'automne dans les pays tempérés (Melnick, 1996). En France, on observe chaque année une recrudescence des cas de méningites à entérovirus au cours des mois d'été (Bulletins du Groupe Français des entérovirus, responsable B. Lina). Cependant, compte tenu du polymorphisme des pathologies dues aux entérovirus, on peut supposer que ceux-ci sont rejetés dans l'environnement tout au long de l'année, avec néanmoins un pic plus marqué en été. Cette analyse bibliographique conforte notre hypothèse d'un lien étroit entre phénomènes épidémiques dans la population et contamination microbiologique de l'environnement littoral et des coquillages : **la saisonnalité de la pollution virale du milieu marin reflète le cycle épidémique des virus entériques dans la population générale.**

Des fluctuations annuelles de la contamination virale ont été enregistrées pendant la période étudiée. La contamination des coquillages par les entérovirus, les calicivirus et les astrovirus a été plus marquée au cours de l'hiver 96-97, alors que pour les rotavirus, elle était comparable à celle de l'hiver précédent. Cependant, l'importance de cette contamination virale, tous virus confondus, a été notablement réduite à partir du printemps 97 jusqu'à la fin

de l'étude. Nous reviendrons dans le rapport de fin d'étude traitant la partie "eaux de station d'épuration - indicateurs de contamination virale" (financement Plan Etat Région) sur les fluctuations annuelles de la contamination virale des coquillages observées sur les trois années d'étude, probablement associées à des dysfonctionnements observés dans les stations d'épuration sous l'effet de conditions météorologiques défavorables.

La série de résultats concernant la contamination des coquillages par les **bactériophages** est plus limitée que celle se rapportant aux autres virus, du fait des conditions de mise en place de cette recherche. Cependant, comme dans le cas des virus entériques, on observe une contamination plus faible dans le secteur A que dans les deux autres secteurs, avec des résultats inférieurs à la limite de détection. Dans les secteurs contaminés, cette contamination est plus marquée pendant les mois d'hiver. Sur les échantillons de moules du Prévost, correspondant au secteur suivi le plus longtemps, la contamination par les bactériophages a diminué au cours des trois années étudiées. Ces observations sont concordantes avec celles faites sur l'occurrence des virus entériques, soulignant un comportement similaire de ces virus en milieu marin. Ces premiers résultats complètent les données de la littérature scientifique sur une possible utilisation des bactériophages F+RNA comme indicateurs de la contamination virale des coquillages. Ce sujet fait l'objet actuellement d'un large débat dans la communauté scientifique car les études publiées présentent des résultats contradictoires (Havelaar, 1993 ; Armon et Kott, 1996 ; Legnani *et al.*, 1998 ; Chung *et al.*, 1998). Nous reviendrons sur cette hypothèse dans le rapport de fin d'étude concernant la partie "eaux de station d'épuration - indicateurs de contamination virale". Cependant, un point mérite d'être souligné. Les techniques de mise en évidence des bactériophages et des virus entériques sont différentes : les bactériophages sont mis en évidence par culture alors que les virus entériques sont détectés par RT-PCR.

L'étude de la représentativité des **entérovirus comme indicateur viral** repose sur un petit nombre d'observations sur lesquelles il est difficile de discuter. Ces premiers résultats soulignent une différence de représentativité suivant l'importance de la contamination microbiologique des secteurs : les entérovirus pourraient être de bons indicateurs de contamination virale - tous autres virus confondus - dans les secteurs fortement contaminés ; leur représentativité semble notablement plus limitée dans des zones où la contamination virale est sporadique. Par contre, une analyse des résultats, virus par virus, ne met pas en évidence l'efficacité des entérovirus comme indicateur de contamination virale. Ces relations spécifiques et limitées ont déjà été observées par le passé et discutées par Metcalf *et al.* (1995). Elles résultent probablement de conditions épidémiologiques différentes suivant les virus étudiés, comme cela a déjà été développé au début de cette discussion. Les infections à entérovirus présentent de multiples formes : infections du système nerveux, infections respiratoires, cutanéomuqueuses, musculaires et cardiaques, pour ne citer que celles-ci. Les entérovirus ne constituent pas une étiologie majeure de diarrhées virales mais ils sont souvent retrouvés dans les selles, à des concentrations plus ou moins limitées suivant les manifestations cliniques, car le tractus digestif est le site primaire de la réplication du virus (Pozetto, 1998). Cette diversité des manifestations cliniques, situation à laquelle s'ajoute la vaccination obligatoire contre la poliomyélite, explique une circulation importante des entérovirus dans la population avec cependant une fréquence plus importante en été. Ces conditions s'opposent à la présence plus limitée dans l'année, au cours de l'hiver principalement, des autres virus étudiés.

La recherche des **virus dans la population atteinte de gastro-entérites** a porté sur 87 analyses de selles. Cet échantillonnage est extrêmement réduit et seuls les quelques résultats obtenus sur les gastro-entérites à calicivirus peuvent permettre la discussion. Ces virus ont été retrouvés uniquement dans les échantillons récoltés en hiver, dans 65 % des selles au cours de l'hiver 96-97 et dans 45 % au cours de l'hiver 97-98. Une étude réalisée l'hiver suivant sur l'ensemble du territoire français, en population générale, a montré que les

calicivirus étaient présents chez 20 % des cas atteints de diarrhées aiguës (32 sur 159 selles testées par RT-PCR) toutes classes d'âge confondues. Limitée aux adultes, personnes âgées comprises, la fréquence était de 13 % (Brachet *et al.*, 1999). La comparaison de ces chiffres avec ceux obtenus au cours de notre étude soulignerait une circulation des calicivirus plus importante dans notre secteur d'étude que dans la population adulte française. Mais nos observations reposent sur un petit nombre d'échantillons et des travaux complémentaires, basés sur un échantillonnage représentatif, sont nécessaires pour vérifier cette hypothèse.

La plupart des études publiées font ressortir l'importance des calicivirus dans l'étiologie des phénomènes épidémiques de gastro-entérites concernant les cas groupés (Vinjé *et al.*, 1997 ; Fankhauser *et al.*, 1998 ; Evans *et al.*, 1998 ; Otsu, 1999). Par contre, l'incidence des gastro-entérites à calicivirus est mal connue en population générale (cas sporadiques). Pang *et al.* (1999) ont montré que les calicivirus humains intervenaient dans 20 % des gastro-entérites infantiles chez des enfants finlandais de moins de trois ans, au cours d'un suivi portant sur la période 93-95. Ce résultat est proche de celui de Bon *et al.* (1999) observé également chez des enfants hospitalisés pour une gastro-entérite à Dijon (France) entre 1995 et 1998 (14 %), de même Brachet *et al.* (1999) ont détecté la présence de calicivirus humains dans 28 % gastro-entérites chez les enfants français de moins de trois ans au cours de l'hiver 98-99.

Le petit nombre de souches de calicivirus humains détectées dans la population et dans les coquillages ne permet pas une interprétation poussée. Aucune souche détectée dans la population n'a été retrouvée dans les coquillages et réciproquement. Cependant, **la diversité des souches observées dans les selles de malades est retrouvée dans l'environnement. Ces souches appartiennent aux génogroupes I et II de la famille des calicivirus.** La souche du virus de l'hépatite A détectée dans un contexte épidémique local ne correspond à aucune des souches trouvées dans les coquillages. Mais, nous n'avons pas été informé en temps réel du phénomène épidémique survenu début 1998 sur l'ensemble du département de l'Hérault et n'avons pu, de ce fait, renforcer dans le temps et dans l'espace, notre stratégie d'échantillonnage sur ce secteur littoral.

Cependant les premiers résultats obtenus sont prometteurs car ils montrent la faisabilité de cette approche en épidémiologie moléculaire. La comparaison des souches virales circulant dans la population et de celles détectées dans l'environnement peut permettre, en effet, de comprendre les relations entre ces deux compartiments, et, de là, de mieux appréhender les risques liés à la consommation des coquillages.

6. Conclusions

Les résultats obtenus dans le cadre de ce travail soulignent une contamination virale de cet ensemble lagunaire méditerranéen. L'analyse de cette série de données, portant sur trois années seulement, est unique mais reste limitée ; elle permet, cependant, de dégager quelques tendances et de soulever un certain nombre d'hypothèses :

- La contamination virale de l'environnement littoral est observée aussi bien dans un secteur classé A au regard de la réglementation portant sur l'exploitation et la mise en marché des coquillages que dans les autres secteurs. Elle est, cependant, plus limitée en zone A, qu'en zones C et D ;
- Cette contamination semble être sous l'influence de phénomènes saisonniers. Elle est plus importante en hiver qu'en été ;
- Des variations annuelles de cette contamination ont été observées au cours des trois années de suivi. La fréquence de détection des particules virales dans les coquillages était plus importante au cours des deux premiers hivers étudiés ;
- La contamination des coquillages par les bactériophages présente des similitudes avec celle des virus. Elle fluctue saisonnièrement et semble plus marquée dans les zones C et D ;
- Les entérovirus ne semblent pas répondre à l'ensemble des critères définissant un indicateur viral. Leur représentativité reste limitée dans les zones faiblement contaminées par d'autres virus entériques ;
- Dans le cas des calicivirus, on observe simultanément la circulation de ce virus dans la population et sa présence dans les échantillons de l'environnement. Les souches détectées dans ces deux compartiments, bien que différentes, présentent une variété importante. Cette observation, basée sur un petit nombre d'échantillons de selles, mérite d'être approfondie.

Ces résultats sont les premiers en France portant sur la contamination virale en zone littorale sur une aussi longue période de suivi. Leur interprétation reste limitée mais sera complétée par les données obtenues sur la contamination virale des eaux de station d'épuration (Contrat Plan-Etat-Région Languedoc-Roussillon). Par la suite, le développement d'études, présentant un protocole similaire associant les spécialistes de domaines différents (virologie médicale, épidémiologie, microbiologie et environnement littoral) sur un autre secteur géographique (secteur littoral soumis à des phénomènes de marées, par exemple) permettra des comparaisons et la validation des hypothèses avancées ici.

Ces données participent à l'évaluation du risque viral associée à la consommation des coquillages en France. Elles fournissent une première estimation des niveaux de contamination des coquillages destinés, sans traitement secondaire (purification), à la consommation car le risque de contamination secondaire des coquillages, lors du conditionnement et du transport, reste limité. En l'absence de quantification virale dans les coquillages et d'informations précises sur le maintien du pouvoir pathogène de ces particules virales, elles permettent d'identifier des "périodes à risques sanitaires" pendant lesquelles des mesures de prévention supplémentaires peuvent être envisagées pour garantir la salubrité des coquillages distribués sur les marchés, comme des interdictions temporaires de commercialisation. D'autres solutions pourraient être retenues comprenant les traitements de purification intensifs, sous réserve toutefois d'en tester au préalable l'efficacité.

Bibliographie

- Abad F.X., Pinto R.M., Gajaardo R., Bosch A, Viruses in mussels : public health implications and depuration, *J Food Prot.*, 1997, 60 (6), 677-681.
- Anonyme, Qualité des eaux littorales en Languedoc-Roussillon, bilan des réseaux de surveillance, document CEPALMAR - IFREMER, 151 pages, 1995.
- Anonyme, Lagunage de Mèze-Loupian : curage, déshydratation et épandage des boues, document CEREMHER - IFREMER - Agence de l'Eau RMC - Conseil Général Département de l'Hérault, 55 pages + annexes, 1996.
- Apaire-Marchais V., Robertson B.H., Aubineau-Ferre V., Le Roux M.G., Levêque F., Schwartzbrod L., Billaudel S., Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61 (11), 3977-3980.
- Armon R., Kott Y., Bacteriophages as indicators of pollution, *Cr. Rev. Env. Sc. Tech.*, 1996, 26: 299-335.
- Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.L., Le Guyader F., Woodley C.M. , Metcalf T.G., Estes M.K., Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61, 3014-3018.
- Bon F., Fascia P., Dauvergne M., Tenenbaum D., Planson H., Petion A.M., Pothier P., Kohli E., Prevalence of group A rotavirus, human calicivirus, astrovirus, and adenovirus type 40 et 41 infections among children with acute gastroenteritis in Dijon, France. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, 37 (9), 3055-3058.
- Brachet R., Kohli E., Bon F., Toubiana L., Retel O., Pothier P., Nicolas J.C., Flahault A., Viral origin of acute diarrhea in winter in France, poster présenté au colloque « Foodborne illness », Porto mai 1999.
- Charlet F., Ferchaud R., Epidémie de gastro-entérites virales liée à la consommation de palourdes en Charente-Maritime. *B.E.H.*, 1994, n° 37, pp. 169-170.
- Chung H., Jaykus L.A., Lovelace G., Sobsey M.D., Detection of human enteric viruses in oysters by in vivo and in vitro amplification of nucleic acids, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62 (10), 3772-3778.
- Chung H., Jaykus L.A., Lovelace G., Sobsey M.D., Bacteriophages and bacteria as indicators of enteric viruses in oysters and their harvest waters, *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 38, 12: 37-44.
- Crance J.M., Apaire-Marchais V., Leveque F., Beril C., Le Guyader F., Jouan A., Scharzbrod L., Billaudel S., Detection of hepatitis A virus in wild shellfish, *Mar. Poll. Bull.* 30 (6), 372-375.
- Daurat G., Une épidémie de gastro-entérite aiguë à virus SRSV liée à la consommation d'huîtres dans l'Hérault, décembre 1992. *B.E.H.*, 1994, n° 37, pp.170-171.
- Delarocque-Astagneau E., Désenclos J-C., Epidémie d'hépatite A et coquillages : bilan de l'investigation de quatre épidémies récentes. Colloque Société Française de Microbiologie, "Epidémiologie, Virologie, Coquillages", 20 mars 1998, Paris.

- Désenclos J-C., Klontz K.C., Wilder M.H., Nainan O.V., Margolis H.S., Gunn R.A., A multivariate outbreak of hepatitis A caused by the consumption of raw oysters, *Am. J. Public Health*, 1991, vol. 81, n° 10, pp. 1268-1272.
- Désenclos J-C., Ribière I., Letrillard L., Flahault A., Hubert B., Diarrhoea-related morbidity and rotavirus infection in France. *Acta Paediatr. Suppl.*, 1999, 426: 42-47.
- Desselberger U., Viral gastroenteritis. *Curr. Op. Inf. Dis.*, 1998, 11: 565-575.
- Dubois E., Le Guyader F., Haugarreau L., Kopecka H., Cormier M., Pommepuy M., Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Env. Microbiol.*, 1997, 63: 1794-1800.
- Egglestone S.I., Caul E.O., Vipond I.B., Darville J.M., Absence of human astrovirus RNA in sewage and environmental samples, *J Appl. Microbiol.*, 1999, 86: 709-714.
- Elzière-Papayanni P., Angeli J-P., Le Goas R., Les salmonelles dans l'étang de Thau en 1989 : un exemple de situation critique en conchyliculture, pp. 463- 476, in *Coquillages*, coord. Elzière-Papayanni P. Ed. ITSVF, 522 pages, 1993.
- Evans H.S., Madden P., Douglas C., Adak G.K., O'Brien S.J., Djuretic T., Wall P.G., Stanwell-Smith R., General outbreaks of infectious intestinal disease in England and Wales: 1995 and 1996, *Commun. Dis. Publ. Health*, 1998, 1,3: 165-171.
- Flahault A., Diarrhées aiguës, un problème de santé publique, *Le Réseau Sentinelles*, 1997, 16: p 1.
- Frankhauser R.L., Noel J.S., Monroe S.S., Ando T. Glass R.I., Molecular epidemiology of "Norwalk-like viruses" in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J. Inf. Dis.*, 1998, 178: 1571-1578.
- Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y., Schwartzbrod L., Enterovirus genomes in wastewater: concentration on glass wool and glass powder and detection by RT-PCR. *J. Vir. Methods*, 1997, 65: 265-271.
- Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B.K., Bhan M.K., Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction, 1992, *J. Clin. Microbiol.*, 30 (6), 1365-1373.
- Gilgen M., Germann D., Lüthy J., Hübner Ph., Three step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* 1997, 37: 189-199.
- Glass R. I., Noël J., Mitchell D., Herrmann J. E., Blacklow N. R., Pickering L. K., Dennehy P., Ruiz-Palacios G., de Guerrero M. L., Monroe S. S., The changing epidemiology of astrovirus-associated gastroenteritis : a review. *Arch. Virol.*, 1996, [suppl] 12 : 287-300.
- Goh K.T., Chan L., Ding J.L., Oon C.J., An epidemic of cockles-associated hepatitis A in Singapore, *Bull. World Health Organ.*, 1984, 62 (6), pp. 893-897.
- Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B., Fang Z., Polymerase chain reaction amplification and typing rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, 28 : 276-282.

- Goyal S.M., Gerba C.P., Melnick J.L., Human enterovirus in oysters and their overlying waters, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1979, 37, 3: 572-581.
- Green D.H., Lewis G.D., Comparative detection of enteric viruses in wastewaters, sediments and oysters by reverse transcription-PCR and cell culture, *Wat. Res.*, 1999, 33, 5: 1195-1200.
- Haeghebaert S., Le Querrec F., Vaillant V., Delarocque Astagneau E., Bouvet P., Les toxi-infections alimentaires collectives en France en 1997, *B.E.H.*, 1998, n° 41, 12 pages.
- Hafliger D., Gilgen M., Luthy J., Hubner P., Seminested RT-PCR systems for small round structured viruses and detection of enteric viruses in seafood. *Int. J Food Microbiol.*, 1997, 37: 27-36.
- Havelaar A.H., Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. *A.S.M. News*, 1993, JR, 59: 614-619.
- Henshilwood K., Green J., Lees D.N., Monitoring the marine environment for small round structured viruses (SRSV): a new approach to combating the transmission of these viruses by molluscan shellfish, *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 38, 12: 51-56.
- Hydratec, Aquascop : Etude du fleuve Lez, milieu prioritaire. Analyse de la situation actuelle - Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse, 99 pages, 1989.
- Kapikian A.Z., Chanock R.M., Norwalk group of viruses, in *Virology*, 2nd ed., ed. by B.N. Fields, D.M. Knipe et al., Raven Press Ltd, New-York, 1990.
- Kohn M. A., Farley T. A., Ando T., Wilson S. A., Jin Q., Monroe S. S., Baron R. C., McFarland L. M., Glass R. I., An outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with eating raw oysters, implications for maintaining safe oyster beds. *JAMA*, 1995, vol. 273, n° 6, pp. 466-471.
- Kohli E., Bon F., Brachet R., Flahault A., Pothier P., Investigation virologique du pic épidémique de gastro-entérites de l'hiver 98-99. 1ères Journées Francophones de Virologie. Paris, 22-23 Avril 1999.
- Kopecka H., Dubrou S., Prévot J., Maréchal J., Lopez-Pila J.M, Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization - *Appl. Environ. Microbiol.*, 1993, 59 (4), 1213-1219.
- Le Guyader F., Dubois E., Ménard D., Pommepuy M., Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-seminested PCR - *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994, 60 (10), 3665-3671.
- Le Guyader F., Ménard D., Pommepuy M., Kopecka H., Use of RT seminested PCR to assess viral contamination in Caribbean rivers (Martinique), *Wat. Sci. Tech.* 1995, 31: 391-394.
- Le Guyader F., Estes M.K., Hardy M.E., Neill F.H., Green J., Brown D.W.G., Atmar R.L., Evaluation of a degenerate primer for the PCR detection of human caliciviruses - *Arch. Virol.*, 1996, 141, 2225-2235.

- Le Guyader F., Neill F.H., Estes M.K., Monroe S.S., Ando T., Atmar R.L., Detection and analysis of a SRSV strain in oysters implicated in an outbreak, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, vol. 62, n°11, p. 4268-4272.
- Le Guyader F., Ménard D., Dubois E., Haugarreau L., Kopecka H., Pommepuy M., Use of an RT-PCR internal control to evaluate viral removal. *Wat. Sci. Tech.* 1997, 35: 461-465.
- Lee J.V., Dawson S.R., Ward S., Surman S.B., Neal K.R., Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by lowland river, *Wat. Sci. Tech.* 1997, 35: 165-170.
- Lee T., Yam W.C., Tam T.Y., Ho B.S.W., Ng M.H. and Broom M.J., Occurrence of hepatitis A virus in green lipped mussels (*Perna viridis*). *Wat. Res.*, 1999, 33, 3: 885-889.
- Legnani P., Leoni E., Lev D., Rossi R., Villa G.C., Bisbini P., Distribution of indicator bacteria and bacteriophages in shellfish and shellfish-growing waters, *J. Appl. Microbiol.*, 1998, 85, 790-798.
- Leoni E., Bevini C., Degli Esposti S., Graziano A., An outbreak of intrafamilial hepatitis A associated with clam consumption: epidemic transmission to a school community. *Eur. J. Epidemiol.*, 1998, 14:187-192.
- Letrillart L., Désenclos J-C., Flahault A., Risk factors for winter outbreak of acute diarrhoea in France: case-control study, *B.M.J.*, 1997, 315: 1645-1649.
- Lieutaud A., Burtin C., Apports en azote et phosphore d'un bassin versant méditerranéen - Impact sur le complexe lagunaire récepteur. CEMAGREF - Région Languedoc-Roussillon, 90 pages + annexes, 1995.
- Limsawat S., Ohgaki S., Fate of liberated viral RNA in wastewater determined by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1997, 63: 2932-2933.
- Mackowiak P. A., Caraway C. T., Portnoy B. L., Oyster-associated hepatitis : lessons from the Louisiana experience, *Am. J. Epidem.*, 1976, vol. 103, n° 2, pp. 181-191.
- Mahé Z., Etang de Thau (Hérault), amélioration de la qualité sanitaire de la conchyliculture, rapport de stage ENSP, 51 pages, 1996.
- Maison P., Letrillart L., Farran N., Flahault A., Epidémie de diarrhées aiguës de l'hiver 1996/1997 en France, *B.E.H.*, 1997, 13: 57.
- Marlowe E.M., Josephson K.L., Miller R.M., Pepper I.L., A method for the detection and quantitation of PCR template in environmental samples by high performance liquid chromatography. *J. Microbiol. Methods*, 1997, 28: 45-53.
- Mele A., Rastelli M. G., Gill O. N., Bisceglie Di D., Rosmini F., Pardelli G., Valtriani C., Patriarchi P., Recurrent epidemic hepatitis A associated with consumption of raw shellfish, probably controlled through public health measures, *Am. J. Epidem.*, 1989, vol. 130, n° 3, pp. 540-546.
- Melnick J.L., Enteroviruses : polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, in *Fields Virology*, third edition, ed.B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley et al., Lippincott - Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K., 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.*, 1995, 49: 461-487.
- Miossec L., Le REMI, réseau de surveillance de la qualité bactériologique des coquillages du littoral français : premiers résultats, *Hydroécol. Appl.*, tome 4 vol. 2, pp. 203-213, 1992.
- Miossec L., Le Guyader F., Haeghebaert S., Gasnier Ph., Bellier J-Y., Vaillant V., Camus P., Pompepuy M., Abou-Saleh M-J., Clavelin Ph., Bobo J-P., Masson D., Désenclos J-C., Contamination virale de coquillages responsables d'une épidémie de gastro-entérites à Poitiers en mars 1997, *B.E.H.*, 1998, n° 30, pp. 129-130.
- Mitchell D. K., Monroe S. S., Jiang X., Matson D. O., Glass R. I., Pickering L. K., Virologic features of an astrovirus diarrhea outbreak in a day care center revealed by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Infect. Dis.*, 1995, 172: 1437-44.
- Morse D. L., Guzewich J. J., Hanrahan J. P., Stricof R., Shayegani M., Deibel R., Grabau J. C., Nowak N. A., Herrmann J. E., Cukor G., Blacklow N. R., Widespread outbreaks of clam- and oyster- associated gastroenteritis : role of Norwalk virus. *New Eng. J. of Med.*, 1986, vol. 314, n° 11, pp. 678-681.
- Murphy A. M., Grohmann G. S., Christopher P. J., Lopez W. A., Davey G. R., Millsom R. H., An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Med. J. Aust.*, 1979, 2, pp. 329-333.
- Murrin K., Slade J., Rapid detection of viable enteroviruses in water by tissue culture and seminested polymerase chain reaction, 1997, *Wat. Sci. Tech.* 35: 429-432.
- Niaouet C., Ponge A., Chambaud L., Raimondeau J., La surveillance et l'investigation : à propos de deux épidémies d'hépatite virale dans les départements littoraux, *B.E.H.*, 1993, n° 29, pp. 129-130.
- Ohara H., Naruto H., Watanabe W., Ebisawa I., An outbreak of hepatitis A caused by consumption of raw oysters, *J. Hyg. Camb.*, 1983, 91, pp. 163-165.
- O'Mahony M.C., Gooch C.D., Smyth D.A., Thrussel A.J., Bartlett C.L.R., Noah N.D., Epidemic hepatitis A from cockles, *Lancet*, 1983, 5, pp. 518-520.
- Otsu R., Outbreaks of gastroenteritis caused by SRSVs from 1987 to 1992 in Kyushu, Japan: four outbreaks associated with oyster consumption, *Europ. J. Epidemiol.*, 1999, 15: 175-180.
- Pallin R., Wyn-Jones A.P., Place B.M., Lightfoot N.F., The detection of enteroviruses in large volume concentrates of recreational waters by the polymerase chain reaction. *J. Vir. Methods*, 1997, 67: 57-67.
- Pang X.L., Joensuu J., Vesikari T., Human calicivirus-associated sporadic gastroenteritis in Finnish children less than two years of age followed prospectively during a rotavirus vaccine trial, *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 1999, 18, 5: 420-426.
- Petit F., Mendel I., Garnier J., Ficht A., Buffet-Janvresse C., Détection moléculaire des virus et des bactéries présents dans les eaux estuariennes de la Seine. *Bull. Soc. Fr. Microb.*, 1996, 11, 17-24.

- Pichot P., Ximenes M.C., Deslous-Paoli J-M., Juge C., Bilan de l'azote et du phosphore dans le système lagune-bassin versant de Thau, rapport interne IFREMER R. Int. DEL/94.11/Sète, 83 pages, 1994.
- Pommeputy M., Derrien A., Gourmelon M., Ménard D., Dubois E., Dupray E., Caprais M.P., Miossec L. and Le Guyader F., 1996. Fecal microorganisms and contamination in coastal areas. The international congress on environmental climate, Rome, March 4-8, 1996.
- Pommeputy M., Le Guyader F., Molecular approaches to measuring microbial marine pollution, *Curr. Op. Biotech.*, 1998, 9: 292-299.
- Pontefract R. D., Bishaf F. R., Hockin J., Bergeron G., Parent R., Norwalk- like viruses associated with a gastroenteritis outbreak following oyster consumption. *J. of Food Protect.*, 1993, vol. 56, n° 7, pp. 604-607.
- Pozetto B., Situation actuelle des infections à enterovirus, *Viral*, 1998, 18: 17-23.
- Pothier P., Limone F., Kohli E., Guim S., Bour J.B., Development and preliminary evaluation of a latex agglutination test using a monoclonal antibody for rotavirus detection in stool specimens. *Ann. Virol. Inst. Pasteur*, 1987, 138 : 523-523.
- Rippey S.C., Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1994, 7 (4), 419-425.
- Romalde J.L., Estes M.K., Szucs G., Atmar R.L., Woodley C.M., Metcalf T.G., 1994. In situ detection of hepatitis A virus in cell cultures and shellfish tissues. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60 : 1921-1926.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed., Cold Spring Harbor laboratory, Cold Spring Harbor N.Y., 1989, pp1.26-1.28
- Sellwood J., Shore J., Read S., Wyn-Jones P., The use of reverse transcriptase-polymerase chain reaction to investigate environmental samples for the presence of enterovirus, *Comm. Dis. Publ. Health*, 1998, 1 (1), 58-60.
- Sepetjan M., 1992. Hépatites virales année1992, rapport du laboratoire de Médecine Préventive, Santé Publique et Hygiène, Lyon.
- Slomka M.J. et Appleton H., Feline calicivirus as a model system for heat inactivation studies of small round structured viruses in shellfish, *Epidemiol. Infect.*, 1998, 121, 401-407.
- Tsai Y.L., Sobsey M.D., Sangermano L.R. & Palmer C.J., 1993. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59, 10, 3488-3491.
- Vinje J., Koopmans PG., Molecular detection and epidemiology of Small Round-Structured Viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J. Inf. Dis.*, 1996, 174: 610-615.
- Vinje J., Altena S.A., Koopmans P.G., The incidence and genetic variability of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in The Netherlands, *J. Inf. Dis.*, 1997, 176: 1374-1378.

Wang J.Y., Hu S.L., Liu H.Y., Hong Y.L., Cao S.Z., Wu L.F., Risk factor analysis of an epidemic of hepatitis A in a factory in Shanghai, *Int. J. Epidemiol.*, 1990, vol. 19, n°2, pp. 435-438.

Wilson I.G., Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl. Env. Microbiol.*, 1997, 63: 3741-3751.

Ximenes M.C., Lleutaud A., Albiges C., Pierre D., Saggiocco M., Raoul S., Picot B., Moutin T., Mesnage V., Baccou J-C., Patey V., Lecomte O., Gal JY., Golterman H., Efficacité de la réduction de la masse de nutriments dans la prévention des malaïgues - application aux étangs palavasiens - Document de synthèse - Etude en 7 volets libelés sous formes d'annexes groupées par thèmes réalisées pour le compte de la Région Languedoc-Roussillon et l'Agence de l'Eau RMC. Collaboration CEMAGREF, USTL, Faculté de Pharmacie de Montpellier - 28 pages, 1991.

ANNEXE

Travaux présentés et publiés dans le cadre du contrat Santé Environnement

Colloques

- Kohli E., Bon F., Jamot B., Fascia P., Aho S., Le Guyader F., Pothier P., Gastro-entérites en pathologie humaine. Colloque "Epidémiologie, virologie, coquillages", Société Française de Microbiologie (SFM). Paris, Institut Pasteur, 20 mars 1998.
- Kohli E., Bon F., Jamot B., Fascia P., Aho S., Le Guyader F., Pothier P., Gastro-entérites virales. 5^{ème} Congrès de la Société Française de Microbiologie. Lille, 27-29 Avril 1998.
- Kohli E., Bon F., Jamot B., Fascia P., Le Guyader F., Pothier P., Gastro-entérites virales. 18e Réunion Interdisciplinaire de Chimiothérapie Anti-Infectieuse, Paris, 3-4 Décembre 1998.
- Le Guyader F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Kopecka H. & Pommepuy M. Les virus entériques humains dans les coquillages. Colloque "Epidémiologie, virologie, coquillages", SFM, Paris, 20 mars 1998.
- Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Ménard D., Dubois E., Kopecka H., Pommepuy M. Coquillages et virus entériques humains. 5^{ème} Congrès Société Française de Microbiologie, Lille, 27-29 avril 1998.
- Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Dubois E., Kopecka H., Pommepuy M., RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21 month period. IAWQ 19th Biennial International Conference, Vancouver Canada, 21-26 juin 1998.
- Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Pommepuy M., Detection of human calicivirus in shellfish beds during a 3 year period. International Workshop on Human Caliciviruses, CDC, Atlanta, 29-31 mars 1999.
- Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L., Comps M.A., Pommepuy M., Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. Second International Conference on Molluscan Shellfish safety, Philippines, 17-21.

Poster

- Miossec L., Cornen Y., Le Guyader F., Pommepuy M., A first approach of viral risk assessment linked to shellfish consumption in France. Congrès Society for Applied Microbiology, "Risk assessment and management of Microbial hazards associated with food and water", Sheffield, UK, 11-12 January 1999.

Publications

- Le Guyader F., Miossec L., Haugarreau L., Dubois E., Kopeka H., Pommepuy M., RT-PCR evaluation of viral contamination in 5 shellfish beds over a 21 month period. *Wat. Sci. Tech.*, 1998, 38, 12: 45-50.
- Miossec L., Le Guyader F., Haugarreau L., Comps M.A., Pommepuy M., Possible relation between a winter epidemic of acute gastroenteritis in France and viral contamination of shellfish. *J. Shellfish Res.*, 1998, 17 (5), 1661-1664.



RT-PCR EVALUATION OF VIRAL CONTAMINATION IN FIVE SHELLFISH BEDS OVER A 21-MONTH PERIOD

F. Le Guyader*, L. Miossec*, L. Haugarreau*, E. Dubois*, H. Kopecka** and M. Pommeputy*

* *Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, BP 21105, 44311 Nantes cedex 03, France*

** *Unité de Virologie Moléculaire, Institut Pasteur, 28 rue du Dr Roux, 75124 Paris cedex 15, France*

ABSTRACT

Five shellfish beds were sampled for 21 months and evaluated for microbial contamination. Viral extraction was performed on dissected tissues and the clinically most important enteric viruses (hepatitis A virus, small round structured virus, rotavirus and enterovirus) were searched for by RT-PCR and hybridization. Among the 104 samples analysed, 66% were contaminated by at least one virus and 34% were negative for any virus. The two sites regularly contaminated by faecal coliforms had the highest percentage of viral contamination and HAV was detected only in these sites. However, sampling sites meeting the criteria for commercialisation showed occasional viral contamination and viruses were detected in samples with no faecal coliform contamination. © 1998 IAWQ Published by Elsevier Science Ltd. All rights reserved

KEYWORDS

Enterovirus; faecal coliforms; hepatitis A virus; rotavirus; shellfish; small round structured virus.

INTRODUCTION

Shellfish are known to concentrate microorganisms such as bacteria or viruses in association with human waste or bacterial pathogens indigenous to coastal marine environments (Rippey, 1994). It is known that standards based on faecal coliforms (FC) and established to protect shellfish consumers are not correlated with the presence of viruses. In recent years, different methods have been developed to detect viral contamination in shellfish (Atmar *et al.*, 1995; Lees *et al.*, 1995; Cromeans *et al.*, 1997). The latest developments in shellfish viral bio-accumulation and current knowledge about viruses at the molecular level have led to the elaboration of a specific, sensitive method which was evaluated in a collaborative study with artificially contaminated shellfish (Atmar *et al.*, 1995, 1996), and used to analyse shellfish implicated in an outbreak (Le Guyader *et al.*, 1996b). This paper describes the use of this method in assessing the viral contamination of five different shellfish beds over a 21-month period. The clinically most important viruses likely to be accumulated by shellfish were evaluated by RT-PCR and hybridization: hepatitis A virus (HAV), small round structured virus (SRSV), rotaviruses (RV) and enteroviruses (EV).

POSSIBLE RELATION BETWEEN A WINTER EPIDEMIC OF ACUTE GASTROENTERITIS IN FRANCE AND VIRAL CONTAMINATION OF SHELLFISH

LAURENCE MIOSSEC,¹ FRANÇOISE LE GUYADER,¹
LARISSA HAUGARREAU,¹ MARIE-ANNICK COMPS,² AND
MONIQUE POMMEPUY¹

¹IFREMER, Laboratoire de Microbiologie,
44311 Nantes,
Cedex 3, France

²IFREMER, Laboratoire DEL côtier
34200 Sète, France

ABSTRACT Several outbreaks of gastroenteritis related to the consumption of shellfish (frequently eaten raw) have been reported in different parts of the world. In Europe, human calicivirus infections may have been involved in winter outbreaks in recent years, although there is little evidence confirming such viral contamination in shellfish. This study presents the first results of a field survey on viral contamination in two shellfish harvesting areas along the French Mediterranean coast. The first, consisting mainly of oyster beds, was classified in category A, as determined by fecal coliform counts in shellfish (European Community Directive 91/492), and the second, a mussel bed, was classified in category C. Shellfish samples were collected monthly between August, 1995 and April, 1997, and RT-PCR was used to detect viruses known to be involved in outbreaks of gastroenteritis: enterovirus, human calicivirus, rotavirus, and astrovirus. Contamination by fecal coliforms was evaluated in the same samples. Virological results in shellfish were correlated with data on the incidence of epidemics of gastroenteritis in the coastal population obtained from a French survey. A relationship was observed between virological results and epidemiological data. For the 2 years when the incidence rate of gastroenteritis was maximal in winter, the mussel bed was always contaminated by the four types of viruses screened. Similar results were observed for oyster beds during the second winter; whereas, two samples were highly contaminated during the first winter, and a third showed low contamination (only rotavirus). These results suggest that an epidemic of gastroenteritis in the human population contributed to viral contamination of the marine environment through discharge of waste water.

KEY WORDS: shellfish, viral contamination, enterovirus, human calicivirus, rotavirus, astrovirus, fecal coliforms, gastroenteritis

INTRODUCTION

Enteric viruses are dangerous pathogens able to persist in the environment. They are introduced into marine and estuarine waters because current sewage-treatment practices are inadequate to eliminate them from wastewater effluents. Once in the environment, they can be accumulated by shellfish and lead to outbreaks among human consumers. Shellfish-borne diseases include hepatitis A, the most serious infection, which can prove fatal, and gastroenteritis, probably the most frequent pathology. Consequently, viral contamination of shellfish and shellfish farming areas has become a matter of increasing public health concern (Gerba and Goyal 1978, Metcalf et al. 1995).

In the 1980s, cell culture methods were used to detect enteroviruses (EV) in the tissues of clams and oysters in the United States (Vaughn et al. 1980, Wait et al. 1983). However, until recently, viral pathogens have rarely been identified in shellfish-associated outbreaks because of the lack of a sensitive method for detecting viruses not amplified in cell cultures. New analytical methods based on molecular biology now allow the detection of such enteric viruses as hepatitis A virus (HAV), human calicivirus (Hu CV), and rotavirus (RV) in environmental samples and shellfish implicated in food-borne outbreaks (Le Guyader et al. 1994, 1996a, Lees et al. 1995, Chung et al. 1996, Häfliger et al. 1997).

Some viruses detected in the coastal environment have been associated with gastroenteritis. Diarrhea is commonly reported among associated symptoms in infections by a number of enteroviruses (Melnick 1996). Hu CV, including Norwalk virus, has been responsible for gastroenteritis in children and adults, astroviruses (AV) are common causes of diarrhea in children, and RVs are the most important etiologic agents of severe diarrheal illness in in-

fants and young children (Kapikian 1996). This study investigated the occurrence of these viruses in shellfish collected over a 21-month period from Mediterranean beds. Virological results were correlated with data for the incidence of epidemics of gastroenteritis among the coastal French population and are considered in terms of their implications for public health.

MATERIALS AND METHODS

Environmental Sampling

Shellfish samples were collected monthly between August 1995 and April 1997 in two harvesting areas along the French Mediterranean coast. Site 1 was an oyster (*Crassostrea gigas*—Thunberg, 1793) bed producing 10,000 tons per year. Oysters were collected from three sampling points of this shellfish area classified as category A on the basis of fecal coliform counts (European Community Directive 91/492). Site 2, about 30 km from site 1, had a low mussel (*Mytilus galloprovincialis*—Lamarck, 1819) production of 50 tons per year. Mussels from this category C shellfish area were collected at a single sampling point.

Microbiological Analysis

Quantitative estimations of fecal indicators (*Escherichia coli*) in shellfish were performed by conductance measurement (Dupont et al. 1996). For viral analysis, shellfish were shucked and dissected. Viruses were eluted from digestive tissues and concentrated by precipitation. After proteinase K treatment, nucleic acids were purified and RT-PCR performed (Aimar et al. 1995). Amplification products were detected by electrophoresis and confirmed with specific probes. For EV, the region amplified by RT-