

ISN
48691

N600-SCH-E

F

DÉPARTEMENT ENVIRONNEMENT
LITTORAL ET GESTION DU MILIEU
MARIN

**Etude de la Contamination Virale des Huîtres
et de leur E.puration Virale.**

• • •

**Etude de la Contamination Virale des
Sédiments Marins en zone de Mytiliculture.**

**Rapport de fin de contrats
N° 88.2.430.443. et 90.2.430.428**

S. BOHER, M. ALBERT, L. SCHWARTZBROD

IFREMER-DERO/EL



0EL04558

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Laboratoire de Virologie
B.P. 403 - 5 rue A. Lebrun
54001 NANCY Cédex

Janvier 1993

**Etude de la Contamination Virale des Huîtres
et de leur Epuration Virale.**

• • •

**Etude de la Contamination Virale des
Sédiments Marins en zone de Mytiliculture.**

**Rapport de fin de contrats
N° 88.2.430.443. et 90.2.430.428**

S. BOHER, M. ALBERT, L. SCHWARTZBROD

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Laboratoire de Virologie
B.P. 403 - 5 rue A. Lebrun
54001 NANCY Cédex

Janvier 1993

**ETUDE DE LA CONTAMINATION
VIRALE DES HUITRES
ET DE LEUR EPURATION**

INTRODUCTION

- Le milieu marin côtier est constamment soumis à des apports polluants continentaux. Des agents pathogènes, parmi lesquels des virus entériques humains, présents dans ces rejets, contribuent à la contamination microbiologique du littoral.

La survie des virus dans l'eau de mer est prolongée grâce à leur association aux matières organiques, aux particules en suspension et aux sédiments qui constituent un véritable réservoir de virus.

Les fruits de mer, de par leur activité de nutrition par filtration, se comportent comme de véritables filtres à micro-organismes : en même temps qu'ils absorbent les éléments nécessaires à leur alimentation, ils retiennent et accumulent activement les virus libres ou associés à des supports particulières.

Ces données conduisent à admettre que les fruits de mer ont une forte probabilité d'être des agents privilégiés de propagation d'infections virales. Parmi celles-ci, les hépatites et les gastro-entérites sont celles pour lesquelles les évidences épidémiologiques sont les plus nombreuses.

Cependant, si les phénomènes de bioaccumulation sont à l'origine de la contamination virale, le processus de relargage des particules virales permet une épuration naturelle des fruits de mer lorsqu'ils sont placés en eaux non polluées.

Dans ces conditions, il s'avère nécessaire de pouvoir déterminer la qualité sanitaire sur le plan virologique des mollusques livrés à la consommation humaine.

Pour ce faire, il est indispensable de disposer de méthodologies d'analyses adaptées.

Par ailleurs et compte tenu des risques de pollution en zone maritime conchylicole, il est hautement souhaitable de disposer de dispositifs d'épuration qui permettent de débarrasser les mollusques d'éventuels contaminants viraux.

Un certain nombre de travaux sont réalisés à propos de ces deux points et leur contenu est analysé et résumé dans la première partie de notre travail consacrée à l'étude bibliographique. -

BUT DU TRAVAIL

L'analyse bibliographique a montré qu'au niveau de la méthodologie de recherche des virus à partir des coquillages, beaucoup de protocoles ont été proposés. Cependant, la grande majorité d'entre eux ont été mis au point et évalués à partir de coquillages contaminés *in vitro* dans des conditions extrêmement artificielles.

Le premier objectif de notre travail est donc méthodologique et consiste à tenter de définir une méthodologie de mise en évidence des virus à partir de coquillages contaminés *in vivo* dans des conditions très proches de celles rencontrées dans l'environnement. Pour ce faire, nous avons travaillé avec un modèle constitué d'une part par des huîtres, d'autre part par des rotavirus. Dans ce cadre nous avons étudié et adapté différentes méthodologies de façon à déterminer les conditions optimales de récupération des virus et à pouvoir proposer un protocole applicable à l'évaluation de la qualité de coquillages provenant de zones conchylicoles.

Le deuxième objectif consiste, dans le cadre de l'analyse d'huîtres placées en milieu naturel, à évaluer l'efficacité du protocole proposé et à le confronter avec d'autres méthodologies.

Le troisième objectif est axé sur la détermination de la cinétique d'épuration d'huîtres contaminées par des rotavirus dans deux types de dispositifs, l'un en circuit fermé avec de l'eau de mer recyclée en permanence et désinfectée par les rayons U.V., l'autre en circuit semi-ouvert avec de l'eau de mer renouvelée toutes les 24 heures.

Ce travail, qui doit permettre l'évaluation de l'efficacité épuratrice de ces deux procédés pour les huîtres contaminées par des rotavirus, a été réalisé, d'une part expérimentalement en laboratoire, d'autre part sur le terrain dans une installation d'épuration pilote.

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - CONTAMINATION VIRALE DU MILIEU MARIN

La partie littorale du milieu marin est la plus riche du point de vue biologique mais également la plus sensible, donc la plus vulnérable. Elle subit un grand nombre d'agressions, résultant des activités humaines, parmi lesquelles l'exploitation des richesses naturelles biologiques et les pollutions accidentelles.

Cette zone littorale est un milieu particulier, du fait des courants de marées et de l'apport d'eau douce. En effet, les eaux littorales et les eaux marines se mélangent avec difficulté. Ainsi, les flux de pollution résultant des apports fluviaux et des rejets d'eaux usées domestiques traitées ou non, ont tendance à se maintenir dans la zone littorale pendant un temps relativement long. Or, ces flux contiennent des quantités non négligeables de micro-organismes, dont les virus entériques.

I - 1 : VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE

Les virus susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique sont essentiellement des virus entériques, excrétés par l'homme ou l'animal dans leurs selles.

Plus de 130 types de virus entériques appartenant à plusieurs familles et genres sont répertoriés. Ils peuvent provoquer des syndrômes variés allant des gastro-entérites aux méningites, sans oublier les hépatites (Tableau 1).

Les selles d'une personne infectée par des virus entériques, qu'elle présente ou non des signes cliniques, peuvent contenir de 10^9 à 10^{11} particules virales par gramme de selles.

Les virus ainsi éliminés dans les selles se retrouvent dans les eaux usées, qui constituent le premier maillon d'un cycle de l'eau (Figure 1) au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire, mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau (SCHWARTZBROD *et al.* - 1990).

Acide nucléique	Famille	Genre	Espèce	Maladies provoquées
ARN	PICORNAVIRIDAE	ENTEROVIRUS	Virus poliomyélitiques	paralyse, méningites, fièvre
			Virus Coxsackie A	méningites, maladies respiratoires
			Virus Coxsackie B	myocardites, méningites, éruptions cutanées
			Virus ECHO	méningites, diarrhées, maladies respiratoires, conjonctivites
			Entérovirus	méningites, encéphalites, conjonctivites
			Entérovirus72: Virus de l'hépatite A	hépatite virale A
	REOVIRIDAE	REOVIRUS	Réovirus	maladies respiratoires et digestives, souvent inapparentes
		ROTAVIRUS	Rotavirus	diarrhées infantiles, vomissements
		CALICIVIRIDAE	CALICIVIRUS	Calicivirus humains
	Virus de Norwalk			gastro-entérites
	Small round virus			gastro-entérites
?	ASTROVIRUS	Virus de l'hépatite E	hépatite infectieuse	
		Astrovirus humains	gastro-entérites	
	CORONAVIRIDAE	CORONAVIRUS	Coronavirus humains	entéro-colites
ADN	ADENOVIRIDAE	MASTADENOVIRUS	Adénovirus humains	pneumopathies, infections oculaires, gastro-entérites

Tableau 1 : Principaux virus entériques humains susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique (d'après SCHWARTZBROD - 1991)

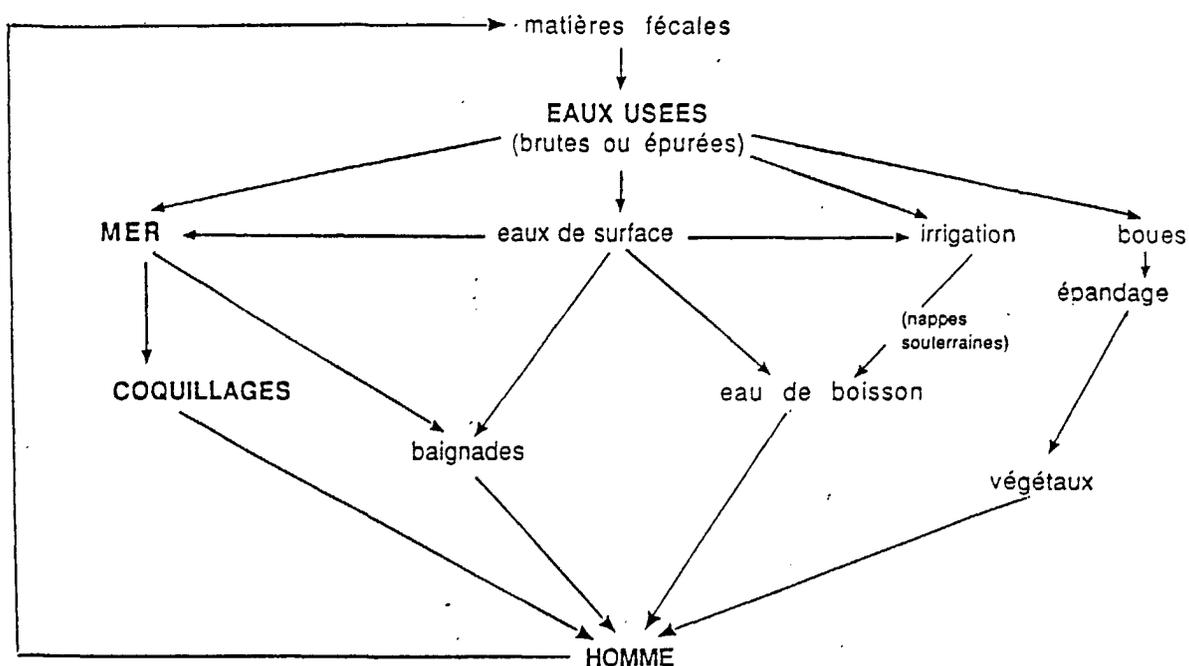


Figure 1 : Voies de contamination virale de l'Homme à partir des eaux usées

La concentration virale dans les eaux usées peut atteindre 10^5 particules/l (DAHLING *et al.* - 1989). Ces quantités varient selon des facteurs géographiques, saisonniers, mais surtout selon le niveau socio-économique et les conditions sanitaires du lieu considéré. En moyenne, elle peut être estimée à 10^3 particules/litre (Tableau 2).

CONCENTRATION VIRALE PAR LITRE	TYPE DE VIRUS ISOLE	REFERENCES
0,1 - 91 NPPUC	P _{2,3} ; CB ₄ ; E ₂₄	MAURIN et DEMILLAC - 1981
0 - 180 UFP	P _{1,2} ; CB ₃₋₅	SLADE - 1982
2 - 353 UFP	P ₁₋₃ ; CB _{2,5}	SIMMONDS <i>et al.</i> - 1983
0 - 3300 UFP	Entérovirus	MARTINS <i>et al.</i> - 1983
1 - 45 NPPUC	Entérovirus	PAYMENT et TRUDEL - 1985
666 - 9500 F.F.	Rotavirus	BOSCH <i>et al.</i> - 1988
100 - 242 500 UFP	Entérovirus	DAHLING <i>et al.</i> - 1989

P : Poliovirus ; CB : Coxsackie B virus ; E : Echovirus
 NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques

UFP : Unité Formant Plage
 F.F. : Foci Fluorescents

Tableau 2 : Virus isolés des eaux usées

Les eaux usées brutes ou traitées sont rejetées dans les rivières ou le milieu marin, ou bien réparties dans l'environnement sous forme de boues, qui sont un sous-produit du traitement.

L'élimination des micro-organismes d'origine fécale (bactéries, virus et parasites) par les stations d'épuration n'est pas complète, compte tenu des fortes concentrations existant dans les effluents bruts.

L'épuration, réalisée quelques fois par des techniques physico-chimiques (coagulation - floculation), mais le plus souvent par des procédés biologiques (lagunage, boues activées) permet d'éliminer entre 50 % et 90 % des virus présents (SCHWARTZBROD - 1984). La charge virale rejetée dans le milieu, avec les eaux usées épurées, est faible mais non-négligeable.

Ainsi, la station d'épuration biologique traitant les eaux usées de la communauté urbaine de Nancy de 300 000 habitants, produisant 150 000 m³ d'eaux usées par jour, rejette à la rivière au minimum 10⁹ particules virales par 24 heures (SCHWARTZBROD *et al.* - 1979).

Les eaux usées urbaines de la ville de Morlaix apportent dans la baie, jusqu'à 70 millions de virus entériques par jour.

A Toulon, les eaux usées épurées rejetées à la mer, contiennent entre 10 et 95 particules virales/litre (SCHWARTZBROD *et al.* - 1990).

Cette charge virale rejetée en rivière ou directement dans la mer est rapidement diluée. Il n'en demeure pas moins que, dans l'environnement d'un rejet d'eaux usées, la concentration virale de l'eau de mer littorale peut, dans certains cas, atteindre 85 UFP par litre.

Le tableau 3 rassemble quelques concentrations virales mesurées dans les eaux de mer côtières.

LIEU DE PRELEVEMENT	QUANTITE DE VIRUS PAR LITRE	TYPE DE VIRUS ISOLE	REFERENCES
Estuaire du New-Hampshire	ILD à 30 UFP	poliovirus coxsackie B3 réovirus	METCALF ET STILES (1968)
Golfe du Texas	0 à 0,2 UFP	poliovirus type 1 échovirus type 1 et 4	FARRAH <i>et al.</i> (1977)
Mer Baltique	0,5 à 12,6 UFP	entérovirus	STEINMANN (1977)
Méditerranée	0,1 à 27 NPPUC	entérovirus	HUGUES <i>et al.</i> (1979)
Golfe du Texas	0,01 à 0,44 UFP	entérovirus	GOYAL <i>et al.</i> (1979)
Long Island	ILD à 2,1 UFP	poliovirus échovirus	VAUGHN <i>et al.</i> (1979)
Méditerranée	ILD à 1,6 NPPUC	entérovirus	LUCENA <i>et al.</i> (1982)
Miami	0,05 à 0,14 UFP	entérovirus	SCHAIBERGER <i>et al.</i> (1982)
Tel-Aviv	1 à 85 UFP	entérovirus	FATTAL <i>et al.</i> (1983)
Golfe du Texas	0,007 à 0,03 UFP 0,3 à 2,6 UFP	rotavirus entérovirus	RAO <i>et al.</i> (1984) RAO <i>et al.</i> (1986 (b))

UFP : Unité Formant Plage

ILD : Inférieur à la Limite de Détection

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques

Tableau 3 : Taux de contamination virale dans les eaux de mer côtières

I - 2 : SURVIE DES VIRUS DANS L'EAU DE MER

De nombreuses études ont été menées sur la persistance des virus dans l'eau de mer.

Bien qu'elle apparaisse plus faible que celle observée dans l'eau douce (HURST et GERBA - 1980), la durée de survie des virus peut être importante dans

cet environnement. Le temps de survie est exprimé en T₉₀ ou T₉₉, ce qui représente le temps nécessaire (en jours) pour obtenir une chute de titre viral respectivement de 1 log ou 2 log.

FUJIOKA *et al.* (1980) observent que, dans de l'eau de mer naturelle, le T₉₀ du poliovirus type 1 est de 24 à 48 heures et qu'aucune particule virale n'est détectée après 72 à 96 heures.

Pour le même virus, LANDRY *et al.* (1983) rapportent, que le titre viral chute de 1 log en 4 jours, de 2 log en 7 jours et qu'aucune particule virale n'est décelable sur culture cellulaire après 15 jours.

Lors d'études réalisées au laboratoire à partir d'eau de mer artificiellement contaminée par du poliovirus type 1, GAILLOT (1986) observe un T₉₀ de 1 à 2 jours, un T₉₉ de 3 à 6 jours et aucun virus n'est isolé après 10 jours.

Il faut noter que d'une souche virale à l'autre, voire même d'un sérotype à l'autre, les vitesses d'inactivation constatées sont différentes. Ainsi DENIS *et al.* (1977) observent un T₉₉ de 36 jours à 12° C pour le virus ECHO 30 et de 12 jours pour le poliovirus type 2, à la même température, en eau de mer naturelle. De même, SMITH *et al.* (1978) montrent qu'une baisse de 4 log du titre viral est obtenue après 10 jours pour le poliovirus type 1, mais seulement après 2 jours pour le virus Coxsackie A9 dans de l'eau d'estuaire.

GIRONES *et al.* (1989 (a)) constatent, que le T₉₀ du poliovirus type 1 est inférieur de 1 à 2 jours à ceux du rotavirus SA 11 et des phages f₂ et B40-8.

BOSCH et SHIELDS (1987) rapportent que le virus de l'hépatite A a un T₉₀ de 15 jours dans l'eau de mer, ce qui indiquerait la résistance importante de cet entérovirus.

La survie des virus entériques dans le milieu marin est fonction, non seulement de différents paramètres biologiques et physico-chimiques, mais aussi de leur état (libres, adsorbés ou agrégés).

I - 2 - 1 : Facteurs influençant la survie des virus dans l'eau de mer

I - 2 - 1 - 1 : Facteurs liés au milieu marin

La composition particulière de l'eau de mer implique que de nombreux facteurs entrent en jeu, pour le devenir des particules virales.

Parmi les facteurs prédominants, la température joue un rôle décisif sur la persistance des virus dans le milieu marin (GAUTHIER et PIETRI - 1989).

Les basses températures favorisent la survie des virus. Ainsi DENIS *et al.* (1977) observent un T₉₉ de 6 jours à 22° C, contre 12 jours à 12° C pour le poliovirus type 2 alors que GERBA (1988) rapporte qu'à des températures inférieures à 10° C, les virus entériques survivent plusieurs mois.

La lumière solaire participe, grâce aux rayons ultraviolets de longueur d'onde comprise entre 200 et 300 nm, aux phénomènes d'inactivation des virus, mais seulement dans la couche d'eau superficielle (5 à 20 cm). De plus, le rayonnement solaire contribue également à l'augmentation de la température de l'eau. FATTAL *et al.* (1983) rapportent que la concentration microbienne de l'eau de mer est plus faible en été qu'en hiver.

Il ressort de diverses études expérimentales, que des facteurs biologiques interviennent également sur l'inactivation des virus dans l'eau de mer.

Ainsi, PATTI *et al.* (1987) montrent que l'inactivation du poliovirus et du virus de l'hépatite A est de 90 % en 1 jour dans de l'eau d'estuaire, et de 4 jours dans la même eau filtrée à 0,45 µm. Aucune chute du titre viral n'est observée dans l'eau autoclavée.

D'autres études soulignent l'influence de facteurs biologiques thermolabiles et filtrables sur la disparition des virus en milieu hydrique. Selon FUJIOKA *et al.* (1980), des micro-organismes marins induisent probablement une activité virucide dans l'eau de mer. GIRONES *et al.* (1989 (b)) ont isolé une bactérie marine possédant des propriétés virucides envers le poliovirus. L'inactivation des virus serait donc liée à la présence de bactéries et/ou de peuplements planctoniques. Il s'agit probablement d'un antagonisme microbien, avec production de métabolites de type enzymes lipolytiques ou protéolytiques. DENIS *et al.* (1977) parlent d'inactivation biotique.

L'identification de ces micro-organismes, qui sont, selon leur concentration dans l'eau de mer et selon la température ambiante, impliqués dans le processus d'inactivation virale, n'a cependant pas encore été couronnée de succès.

1 - 2 - 1 - 2 : Facteurs liés à l'état des virus

Dans le milieu marin, comme dans l'ensemble du milieu hydrique, les virus peuvent être présents soit à l'état libre, soit à l'état agrégé, soit enfin à l'état adsorbé sur des particules solides. Cependant plus de 90 % sont à l'état adsorbé soit sur les fèces avec lesquels ils ont été rejetés, soit à la surface de diverses particules en suspension (argiles, sables, limons, sédiments, matières organiques...).

La possibilité d'agrégation spontanée des virus ou d'association avec des particules en suspension est liée à leurs propriétés de surface. La nature protéique de la capsidie des virus entériques leur confère en effet un caractère amphotère.

Le pH, la salinité et la concentration en électrolytes interfèrent dans les phénomènes d'agrégation et d'adsorption. En effet, l'ionisation de certains groupes fonctionnels des acides aminés de la capsidie, ou l'adsorption d'ions à sa surface, apportent des charges électriques à la particule virale. Ainsi, les variations de salinité en zones d'estuaires entraînent une modification des charges de surface des particules et donc des possibilités d'adsorption des virus sur les substrats.

En fait, la persistance des virus dans le milieu marin est due à cette grande capacité à s'agréger ou à s'adsorber sur des matières en suspension. Il a ainsi été montré que les virus persistaient plus longtemps en eau de mer contenant des sédiments qu'en eau de mer seule.

L'adsorption des virus sur des éléments particuliers leur confère une protection de type physique ; le virion est stabilisé par des forces électrostatiques et des liaisons H. Il est protégé des facteurs inactivants (agents chimiques et physiques) et notamment de la chaleur (LIEW et GERBA - 1980), probablement grâce à une moins grande surface d'interactions entre les particules et le milieu environnant.

SMITH *et al.* (1978) ont établi quelques données comparatives sur la survie des virus dans des sédiments estuariens : l'échovirus 1 et le virus coxsackie B3 persistent plus de 18 jours, le poliovirus 14 jours et le virus coxsackie A9 pendant 4 jours. Or, dans l'eau de mer seule, le virus coxsackie A9 est indétectable après 2 jours et les trois autres virus survivent respectivement 7, 4 et 10 jours.

Pour LIEW et GERBA (1980), le T_{99,9} du poliovirus 1 est de 18 jours dans de

l'eau de mer, et supérieur à 33 jours en présence de sédiments. Ces valeurs sont en accord avec celles observées par LANDRY *et al.* (1983).

I - 3 : VIRUS ET SEDIMENTS MARINS

Les virus apportés dans les zones littorales par les eaux de fleuves ou par les eaux usées brutes ou épurées, étant très majoritairement adsorbés sur des particules en suspension ou agrégés, sédimentent. Les sédiments marins constituent donc un réservoir de virus important.

RAO *et al.* (1986 (b)) ont précisé que les virus associés à des particules de taille supérieure à 6 μm sédimentent rapidement, tandis que ceux adsorbés sur des particules ou des colloïdes plus petites (<3 μm) restent en suspension dans l'eau plus longtemps.

Ainsi les sédiments littoraux de la région de Barcelone, situés entre 100 et 500 m de la côte, contiennent entre 0 et 53 entérovirus par 100 g (SCHWARTZBROD *et al.* - 1987). De même, SCHWARTZBROD *et al.* (1990) ont isolé entre 7 et 203 entérovirus par kg de sédiments dans la baie de Morlaix.

En fait, RAO *et al.* (1986 (a)) ont montré que la concentration virale est de 10 à 1000 fois plus élevée dans les sédiments que dans l'eau surnageante.

Cependant, la couche superficielle sédimentaire dans laquelle se trouvent les virus est très légère et labile, et peut très facilement être remise en suspension sous l'effet de turbulences amenées par fortes pluies, draguage, passage de bateaux... Les virus présents peuvent ainsi être transportés vers des zones récréatives ou conchylicoles, en fonction des courants.

Ainsi, BOSCH *et al.* (1988) ont détecté des virus dans les sédiments à 5 km de la ligne de côte, à une profondeur de 82 mètres. De même, SCHAIBERGER *et al.* (1982) ont isolé des entérovirus à partir de sédiments de plage située à 3,6 km de distance d'un rejet urbain à des concentrations atteignant 30 UFP/litre, alors que aucune contamination ne persistait dans l'eau de mer.

Il apparaît donc que les sédiments littoraux peuvent assurer la conservation

et la dispersion de la pollution virale dans les zones d'estuaires. La recherche des virus uniquement dans l'élément liquide (l'eau de mer) ne représente pas toujours la réalité de la contamination virale du milieu.

Dans ces conditions, il serait souhaitable de faire des prélèvements non plus seulement dans la colonne d'eau, mais aussi au niveau de l'interface sédimentaire, pour avoir une bonne connaissance du niveau de pollution du site considéré (LANDRY *et al.* - 1983 ; CHAMROUX et GUICHAOUA - 1988).

II - VIRUS ET COQUILLAGES

Les coquillages provenant de gisements naturels ou de certaines zones d'élevage vivent sur des fonds littoraux peu profonds souvent dans les zones estuariennes et la plupart des concessions sont situées dans la zone de balancement des marées, en terrains émergeant à marée basse. Toutefois, l'élevage peut aussi se faire en eaux profondes, selon des pratiques culturelles un peu différentes, mais il est rarement réalisé au dessous de 12 m.

Compte tenu de ces conditions d'élevage, des apports contaminants en eau de mer littorale et du mode d'alimentation des mollusques par filtration de grandes quantités d'eau, on conçoit facilement que l'état sanitaire des coquillages dépende étroitement de celui du milieu dans lequel ils vivent. En cas d'élevage dans une zone contaminée, il existe un risque certain de contamination des coquillages par des micro-organismes pathogènes pour l'Homme et, par voie de conséquence, un risque pour la santé publique.

Seuls seront abordés dans ce travail les problèmes liés aux virus.

II - 1 : MODE DE CONTAMINATION DES COQUILLAGES

Les coquillages (huîtres, moules, coques, palourdes) doivent filtrer de grandes quantités d'eau pour leur nutrition et leur respiration. Mais, en même temps qu'ils retiennent les particules nécessaires à leur alimentation, ils retiennent

aussi les micro-organismes, bactéries et virus, libres ou associés à ces particules. Certaines d'entre elles sont absorbées avec le bol alimentaire et digérées ; d'autres, par contre, s'accumulent dans le corps du mollusque et y subsistent plus ou moins longtemps en fonction des conditions ambiantes.

II - 1 - 1 : Rappels anatomiques et physiologiques

L'huître est prise comme exemple et son anatomie est présentée sur la figure 2.

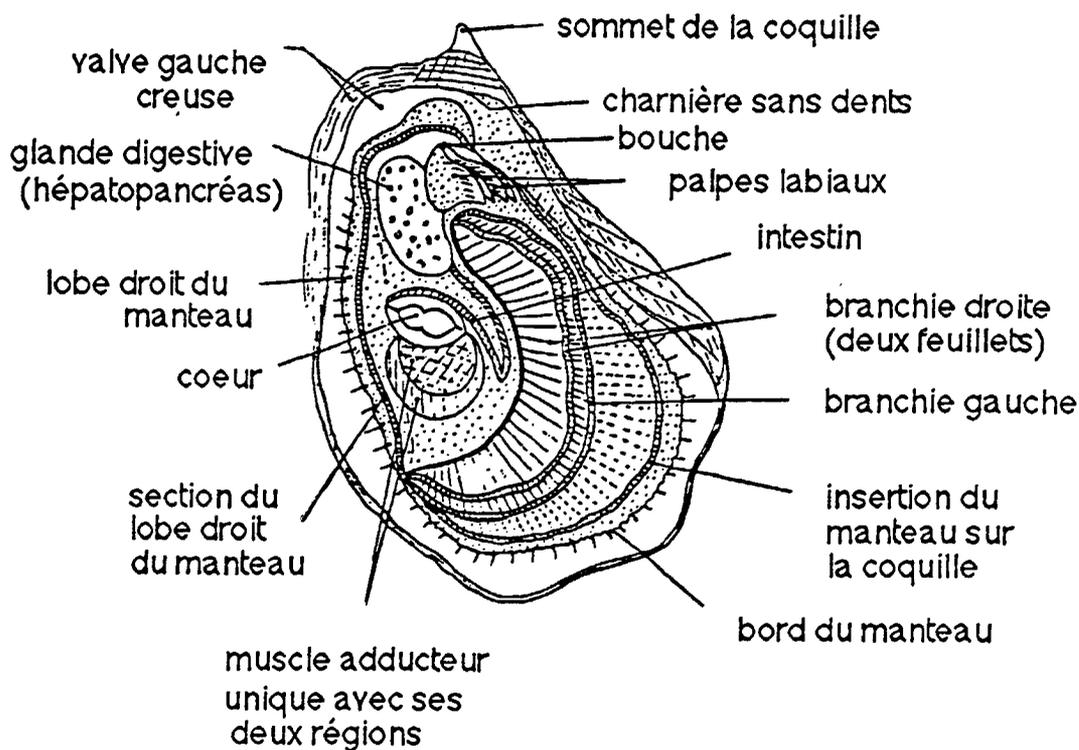


Figure 2 : Organisation schématique d'une huître creuse (genre *Crassostrea*)
(d'après BOUE et CHANTON - 1962)

L'huître est un mollusque bivalve, lamellibranche appartenant à l'ordre des Filibranchia, au sous-ordre des Anisomyaria et à la famille des Ostreidae.

Adulte, elle ne possède qu'un muscle adducteur. Elle adhère au support par la valve gauche (valve inférieure : valve concave). La charnière qui réunit ses valves, essentiellement constituée par un ligament élastique, ne porte pas de dents. Le tissu conjonctif recouvrant le corps de l'huître est appelé le "manteau". Celui-ci est constitué de 2 lobes (lobe droit et lobe gauche) eux-mêmes bordés de 3 bourrelets. Les bourrelets internes limitent une cavité palléale que les branchies séparent en une "chambre inhalante" et une "chambre exhalante". Le volume d'eau passant par ces chambres varie de 3 à 4 litres à plus de 20 litres par heure. L'eau qui traverse l'animal permet d'assurer l'apport de nourriture, les échanges gazeux respiratoires et l'expulsion des déchets.

II - 1 - 1 - 1 : Nutrition de l'huître

Comme tous les lamellibranches, les huîtres sont des microphages. Ils absorbent les micro-organismes et les particules alimentaires, qui sont capturés et agglutinés au niveau des branchies grâce à un film muqueux. Ces particules sont triées par les filaments branchiaux et retenues ou rejetées en fonction de leur taille.

Diverses études ont montré que les particules susceptibles d'être retenues par les lamellibranches doivent avoir une taille inférieure à 50 μm . MARTEIL (1976) indique que l'huître creuse retient 80 à 100 % des particules comprises entre 3 et 12 μm et un fort pourcentage des particules de 1 à 3 μm .

Cette gamme correspond à la taille de nombreuses bactéries, de protozoaires (foraminifères, radiolaires, dinoflagellés), de protophytes (diatomées), de débris de plantes ou d'animaux, de sédiments argileux etc...

Les particules trop volumineuses (pseudo-fèces) ne sont pas acceptées. Celles qui sont retenues sont amenées à la bouche, grâce aux battements des cils portés par les branchies et les 2 paires de palpes labiaux.

II - 1 - 1 - 2 : Mécanisme de digestion par l'huître

Les particules englobées de mucus pénètrent dans l'estomac et sont triturées par un stylet cristallin, qui libère au fur et à mesure des sucs digestifs. Il se résorbe chez l'huître qui jeûne. Les éléments les plus fins pénètrent dans les tubules de la glande digestive (ou hépato-pancréas) qui entoure l'estomac. Ces

tubules digestifs se composent de cellules vacuolaires riches en pigments caroténoïdes, en glycoprotéines, en lipides et en glycogène. Ces cellules assurent une digestion intracellulaire (par endocytose) et une digestion extracellulaire avec sécrétion d'enzymes (BEAUMONT et CASSIER - 1973).

L'estomac se prolonge par l'intestin. Les fèces véritables ou déchets issus de la digestion sont rejetés par l'anus débouchant dans la chambre exhalante.

II - 1 - 2 : Pompage et filtration de l'eau

Une huître plate pompe en moyenne 1 à 10 litres d'eau par heure, une huître creuse 4 à 26 litres et une moule 0,2 à 5 litres d'eau par heure.

On peut faire la différence entre le taux de pompage, c'est à dire la quantité d'eau traversant le mollusque, et le taux de filtration, c'est à dire la quantité d'eau filtrée (MARTEIL - 1976). La filtration, qui n'intervient que dans la fonction de nutrition, est ajustée en fonction des besoins de l'huître. Toutefois, une bonne activité de pompage est nécessaire pour assurer une prise de nourriture efficace par le bivalve.

Divers facteurs influencent les taux de pompage et de filtration, et l'intensité du courant d'eau transporté varie en fonction de facteurs internes et externes.

facteurs internes

L'état physiologique du coquillage modifie sensiblement les taux de pompage et de filtration. Il sont accrus, par exemple, en période de croissance et diminuent après la ponte (rejet des gamètes).

facteurs externes

* la température :

Le débit palléal serait maximum entre 18 et 25° C, très ralenti en hiver au dessous de 12° C, et quasiment nul au dessous de 4° C.

* la salinité :

Ce facteur n'intervient réellement sur le taux de pompage à long terme, que pour des valeurs extrêmes. En effet, les mollusques bivalves sont des organismes euryhalins, capables de s'adapter à des taux de salinité variant de ± 10 % par rapport à leur lieu d'origine (en général 25 à 35 ‰ de salinité). Cette propriété d'acclimatation permet leur transfert dans des milieux différents (parcs d'engraissement, dégorgeoirs...)

* la teneur en O₂ dissous :

Ce facteur peut devenir très vite limitant lors de l'augmentation de la température ou lors de fortes densités de mollusques dans un bassin clos.

Une teneur en oxygène inférieure à 50-60 % de la saturation (5 à 7 mg/l) entraîne rapidement une diminution de la vitesse de filtration et dans les cas extrêmes, peut provoquer des phénomènes de mortalité.

* la turbidité de l'eau :

LUBET (1978) a montré que l'activité de filtration de la moule et de l'huître creuse est fonction de la concentration en particules en suspension dans l'eau de mer : l'ajout, en proportions définies, de particules colloïdales inorganiques (argiles, charbon...) augmente la prise de nourriture. Ce phénomène serait dû à un effet mécanique stimulant que peuvent jouer ces particules.

METCALF *et al.* (1979) ont également constaté, qu'en conditions expérimentales, l'ajout de grains d'amidon à l'eau de stabulation, est un stimulant de l'activité de nutrition des clams. Ces particules agiraient en simulant la présence de phytoplancton.

II - 1 - 3 : Mécanisme de rétention des virus

Comme toute particule ingérable par les bivalves, les virus sont fixés au niveau du mucus branchial.

DI GIROLAMO *et al.* (1977) ont bien décrit les phénomènes mis en jeu lors de la contamination d'huîtres et de clams par des Entérovirus. Lors de ces expérimentations les auteurs récupèrent le mucus, après irritation des mollusques à l'hypochlorite de sodium, puis celui-ci est mis en contact avec des quantités

variables de virus selon différents taux de salinité et différents pH. Les résultats de cette étude montrent que les liaisons virus-mucus s'établissent très rapidement (65 % de fixation en 5 minutes).

L'adsorption du poliovirus sur le mucus apparaît être inversement proportionnelle à la salinité de l'eau : une baisse de 28 à 14 ‰ de salinité entraîne une augmentation de 20 % de virus adsorbés. A l'inverse, une concentration en sels accrue à 45‰ fait chuter de 15 % la quantité de virus retenus. Il y a probablement une compétition entre les cations de l'eau de mer (Na^+) et ceux des virus, pour la fixation sur les anions du mucus.

Le pH optimum d'adsorption est de 7-7,5. Pour des pH acides, où il y a excès d'ions H^+ , la possibilité de fixation des virus sur le mucus est abaissée. Une variation de pH vers l'acidité ou l'alcalinité conduit à l'éluion des virus, toutefois, celle-ci est plus rapide à pH 5, qu'à pH 8.

Ce phénomène de relargage pourrait se produire dans le tube digestif des bivalves sous l'effet de l'acidité gastrique. Les virus seraient alors "libérés" et pourraient être rejetés par les fèces ou pénétrer dans les tissus du coquillage par endocytose.

Les auteurs ont aussi fait agir différents enzymes et composés chimiques, destinés à dégrader sélectivement le mucus et à bloquer les groupements carboxyles et sulfates. Les résultats montrent que l'adsorption des virus est réalisée sur les mucopolysaccharides du mucus, notamment sur les radicaux sulfate de l'acide hyaluronique. En fait, il ressort de ces observations que les liaisons virus-mucus sont vraisemblablement en majorité de type ionique.

II - 2 : RETENTION DES VIRUS PAR LES COQUILLAGES : DONNEES EXPERIMENTALES

Le tableau 4 présente quelques valeurs expérimentales obtenues après immersion des coquillages, pendant une durée définie, dans une eau de mer contaminée par des virus. Toutes ces expériences ont été réalisées dans des aquariums sur un modèle statique.

Lorsque les coquillages ont concentré les virus, le facteur d'accumulation (virus par g de tissu / virus par ml d'eau de mer) varie de 1 à 65.

Tableau 4 : Rétention virale par les fruits de mer

COQUILLAGES	NATURE DU VIRUS	CONTAMINATION VIRALE DE L'EAU (UFP/ml)	DUREE D'EXPOSITION A LA CONTAMINATION (heures)	CONTAMINATION VIRALE DES TISSUS (UFP/g)	FACTEUR D'ACCUMULATION UFP/g de tissu UFP/ml d'eau	REFERENCES
Huitres (<i>Crassostrea Virginica</i>)	Poliovirus type 1	10 ³	1	2,7.10 ⁴	27	MITCHELL <i>et al.</i> (1966)
		≈ 10 ³	2	3,9.10 ⁴	39	
		≈ 2.10 ³	3	5,01.10 ⁴	25	
		≈ 1,2.10 ³	4	3,9.10 ⁴	32,5	
		≈ 1,2.10 ³	8	3,9.10 ⁴	32,5	
		≈ 1,2.10 ³	12	7.10 ⁴	58,3	
		≈ 1,2.10 ³	24	2,8.10 ⁴	23,3	
		2,5.10 ²	1	9.10 ²	3,6	
		≈ 3.10 ²	2	4.10 ³	13,3	
		≈ 3.10 ²	3	6.10 ³	20	
		≈ 2.10 ²	4	6,5.10 ³	32,5	
		≈ 10 ²	8	6,5.10 ³	65	
		≈ 2.10 ²	12	4,5.10 ³	22,5	
		≈ 2.10 ²	24	4.10 ³	22,5	
Huitres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Poliovirus type 1	≈ 3,1.10 ³	12	4,6.10 ³	1,4	DI GIROLAMO <i>et al.</i> (1975)
		≈ 1,5.10 ³	24	≈ 3,9.10 ³	2,6	
		≈ 10 ³	48	≈ 9.10 ³	9	
Huitres (<i>Ostrea lurida</i>)	Poliovirus type 1	≈ 1,5.10 ³	12	8,6.10 ³	5,7	
		≈ 3,9.10 ²	24	10 ⁴	25	
		≈ 10 ³	48	10 ⁴	10	

/ : pas d'accumulation

Clams (<i>Mya arenaria</i>)	Poliovirus type 1 naturellement associé à des fèces	0,2	6	≈ 5	25	METCALF <i>et al.</i> (1979-1980 (b))
Huitres (<i>Crassostrea gigas</i> ou <i>virginica</i>)	Poliovirus monodispersé	10,9 0,044	48 48	1,67 0,04	/ 1	LANDRY <i>et al.</i> (1982)
	Poliovirus type 1 naturellement associé à des fèces	≈ 1,45	48	0,01	/	
		≈ 0,96	120	0,03	/	
		≈ 0,12 < 0,1	144 216 et +	0,6.10 ⁻⁴ ND	/	
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Poliovirus type 1	390	1	64	/	GAILLOT <i>et al.</i> (1988)
		390	2	29	/	
		64	3	14	/	
		64	4	22	/	
		71	5	26	/	
		71	6	14	/	
		638	1	628	/	
		165	1	109	/	
		52	1	5	/	
		8	1	2	/	
3	1	0,5	/			
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Poliovirus type 1 + effluents brut préalablement décontaminés par la chaleur	5.10 ² à 5.10 ³	24	≈ 1,2.10 ²	/	POWER et COLLINS (1989)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Rotavirus Simien SA 11	≈ 3,5.10 ³	1	≈ 4,3.10 ³	1,2	BERIL et SCHWARTZBROD (1989)
Huitres (<i>Crassostrea</i> <i>Virginica</i>)	Poliovirus type 1	20	48 à 72	1,9 ± 1,3	/	BEMISS <i>et al.</i> (1989)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Poliovirus type 1	20	48 à 72	21,5 ± 10,3	1,1	
Clams (<i>Merceneria</i> <i>merceneria</i>)	Poliovirus type 1	10	48 à 72	25,9 ± 12,3	2,5	
(<i>Mya arenaria</i>)	Poliovirus type 1	10 à 100	48 à 72	11,68 ± 0,34	/	

La fixation des virus, par un coquillage physiologiquement actif, est un phénomène très rapide. Ainsi, avec une contamination de 1000 virus par ml d'eau de mer, MITCHELL *et al.* (1966) observent une concentration virale 27 fois plus élevée, dans les huîtres que dans l'eau après 1 heure. De même, GAILLOT *et al.* (1988) montrent que l'adsorption des virus est maximale après 1 heure de séjour dans l'eau contaminée par du poliovirus type 1 puis elle décroît ensuite et se stabilise après 3 heures de séjour.

Les expériences de contamination menées sur plusieurs jours, dans une eau de mer dont la concentration en poliovirus est considérée constante, montrent l'existence d'un cycle de bioaccumulation-relargage (GAILLOT *et al.* - 1988), conduisant à un équilibre dans la quantité de virus présente dans les coquillages (LANDRY *et al.* - 1982).

L'importance des taux de bioaccumulation des virus dépend, comme il a été mentionné précédemment, de l'intensité de l'activité de filtration du coquillage (c'est-à-dire de son état physiologique et des paramètres physico-chimiques de l'eau), mais aussi :

- du type de coquillage,
- du type de virus,
- de l'état du virus (libre ou adsorbé sur des particules),
- de la quantité de virus dans l'eau.

- le type de coquillage et ses particularités anatomiques influent grandement sur la quantité de virus retenus : les coquillages dits "fouisseurs" (coques, palourdes, clams, praires) vivent dans le sable, qui est un "réservoir" de micro-organismes et on conçoit aisément que ceux-ci se contaminent plus facilement que les huîtres ou les moules qui sont en pleine eau. De plus, DI GIROLAMO (1975) ont démontré qu'il existe des différences entre les espèces pour la bioaccumulation des virus : environ 86 % des poliovirus ajoutés dans l'eau de mer sont concentrés en 48 heures par *Crassostrea gigas* (huître creuse) et en 12 heures seulement par *Ostrea lurida* (huître plate).

- en ce qui concerne l'influence du type de virus, BEDFORD *et al.* (1978) ont étudié les taux d'accumulation par l'huître de 2 virus de taille similaire mais

possédant des propriétés de surface différentes : il ressort que le togavirus, type A (Semliki Forest), virus enveloppé, est accumulé à un taux plus faible que le réovirus type 3.

- l'état du virus joue un rôle important ; ainsi plusieurs études ont montré que les virus en suspension parmi des débris cellulaires (suspension brute) ou associés à un support particulaire étaient accumulés plus efficacement par les coquillages, que sous leur forme libre.

HOFF et BECKER (1969) ont constaté un facteur d'accumulation virale par l'huître de 10 à 900 avec une suspension de poliovirus non-clarifiée et seulement de 0,4 à 3,6 avec du poliovirus mono-dispersé. METCALF *et al.* (1979) ont aussi obtenu des taux d'accumulation plus élevés lorsque le poliovirus est associé à un support particulaire (fèces ou kaolinite) que lorsqu'il est libre. De même, BARON (1986) a constaté que le poliovirus purifié n'était pas accumulé par les huîtres, mais qu'après fixation des virus sur un support phytoplanctonique (algues unicellulaires), l'accumulation virale se produisait à un taux élevé.

- la quantité de virus présents entre en jeu et dans tous les cas, on observe de plus forts taux d'accumulation, lorsque le titre infectant de l'eau de mer est élevé. Toutefois, il y a probablement une quantité limitée de sites d'adsorption pour les virus sur le mucus branchial. Cette hypothèse, émise par DI GIROLAMO *et al.* (1977) est reprise par BEDFORD *et al.* (1978) qui estime à $4 \cdot 10^{10}$ le nombre maximum de particules adsorbables par une huître creuse.

La plupart des études sur la bioaccumulation ont été menées avec des concentrations virales dans l'eau de mer élevées de l'ordre de 10^1 à 10^4 par ml, dans le but de mieux comprendre les mécanismes de la rétention virale par les coquillages.

Cependant, METCALF *et al.* (1979) ont mené une étude avec des valeurs proches des conditions naturelles, c'est-à-dire que les coquillages étaient exposés à des concentrations allant de 0,09 à 14 poliovirus/ml (libres ou associés à un support). Ils constatent que le facteur de bioaccumulation des virus dans les tissus est compris entre 19 et 34, lorsque l'eau contient 0,2 virus/ml associés à des fèces.

LANDRY *et al.* (1982) ont travaillé également avec du poliovirus type 1 mono-dispersé ou associé à des fèces à des concentrations de 0,002 à 0,18 UFP/ml. Malgré la bonne sensibilité de la méthode d'extraction-concentration

utilisée par ces auteurs (1 à 2 UFP/huître), aucun virus n'est détecté si la contamination est inférieure à 0,01 UFP/ml d'eau.

En fait, il est difficile de savoir si les coquillages n'accumulent pas efficacement les virus en dessous de ce seuil ou bien si le relargage des virus dans l'eau est très rapide.

Répartition des virus dans les tissus

Après 2 à 4 heures de séjour dans l'eau contaminée, les virus retenus par les coquillages se répartissent, pour la quasi-totalité dans la glande digestive (METCALF *et al.* - 1980). Ainsi BARON (1986) a retrouvé, après 30 minutes de contamination, plus de 99 % des poliovirus absorbés dans le tube digestif de l'huître.

POWER et COLLINS (1990) ont constaté, que 89 % de la quantité totale de coliphage A1-5a retenus par la moule, sont présents dans son tractus digestif après 48 heures d'exposition à la contamination. Le tube digestif est d'ailleurs le seul organe où il y a concentration de micro-organismes. Les autres parties du corps (branchies, manteau, pied...) ne reflètent qu'un taux de contamination proche de celui de l'eau environnante. D'après ces auteurs, la détection de coliphages dans l'hémolymphe de la moule, expliquerait le fait que les contaminants peuvent être répartis dans les tissus.

DI GIROLAMO *et al.* (1975) ont observé la distribution des poliovirus dans le corps de l'huître creuse au cours du temps : après 25 heures d'exposition à la contamination, 96 % des virus sont dans le tube digestif, 2,6 % dans la partie manteau, branchies + liquide intervalvaire et 0,5 % dans le reste du corps (muscle, coeur...). Après 48 heures, 16 % des virus sont passés dans le corps. Il pourrait y avoir une diffusion progressive des virus du tractus digestif vers les tissus périphériques.

L'étude de la répartition des particules virales à l'intérieur du corps du mollusque est très utile pour expliquer les temps de rétention, car les contaminants présents dans le tube digestif sont vraisemblablement plus rapidement éliminés par les fèces que ceux présents dans le reste du corps.

III - 3 : PERSISTANCE DES VIRUS DANS LES COQUILLAGES

Lorsque des coquillages ont été contaminés par des virus entériques, ceux-ci ne peuvent en aucun cas s'y multiplier, car ils ne trouvent pas de cellules sensibles. Par conséquent, la population virale initiale ne peut que se maintenir ou décroître sous l'effet de l'environnement physique ou chimique.

L'inactivation virale est un phénomène irréversible, lié à la dégradation de l'acide nucléique, de la capsidie ou éventuellement de l'enveloppe lipoprotéique.

III - 3 - 1 : Persistance des virus pendant l'immersion des coquillages

Elle dépend de l'activité physiologique du coquillage et du milieu environnant, notamment du niveau de pollution virale de l'eau de mer. Cette persistance est très variable et peut être longue.

Ainsi METCALF et STILES (1965) rapportent la persistance de virus coxsackie B2 dans des huîtres stockées pendant une période supérieure à 60 jours durant les mois d'hiver et de printemps dans de l'eau d'estuaire (entre 1 et 10° C).

Lorsque les températures sont basses, les huîtres sont en activité ralentie et filtrent peu d'eau. Ces conditions favoriseraient donc la rétention des micro-organismes. Cela pourrait expliquer partiellement pourquoi les cas de gastro-entérites et d'hépatite A surviennent principalement en hiver et au début du printemps.

L'antigène du virus de l'hépatite A a été isolé dans des moules placées en Méditerranée hors du rejet des eaux usées de Toulon à j0, j+8 et j+23 après leur immersion (SCHWARTZBROD *et al.* - 1990).

Dans tous les cas, on peut se demander s'il s'agit de la persistance de virus à partir d'une contamination initiale ponctuelle, ou bien d'une recontamination par des particules virales présentes dans le milieu en permanence.

III - 3 - 2 : Persistance des virus après l'émersion des coquillages

Plusieurs études ont montré la survie des virus pendant de longues périodes dans les coquillages.

Les coquillages sont en général consommés après quelques jours de stockage à basse température (5-15° C) ou après congélation, à l'état cru ou après avoir subi une cuisson sommaire.

TIERNEY *et al.* (1982) observent qu'il n'y a pas de réduction dans la détection de poliovirus, à partir d'huîtres expérimentalement contaminées, après 28 jours de stockage à + 5° C (cette durée est considérée comme étant la plus longue entre la récolte et la consommation). Ceci confirme une étude précédente de METCALF et STILES (1965) qui avaient obtenu le même résultat avec du virus Coxsackie B2.

Dans des huîtres creuses congelées à -17,5° C, 91 % du poliovirus contaminant est viable après 2 semaines de stockage, 40 % après 6 semaines et 10 % après 12 semaines (DI GIROLAMO *et al.* - 1970).

FUGATE *et al.* (1975) ont isolé du poliovirus type 1 dans des huîtres importées congelées du Japon. Dans une épidémie de gastro-entérite causée par le virus de Norwalk, les coquillages avaient été congelés pendant 15 semaines, avant la consommation (LINCO et GROHMANN -1980). SCHWARTZBROD *et al.* (1981) ont même retrouvé dans des moules un nombre de poliovirus type 1 plus élevé que la contamination initiale, après une conservation de 30 jours à -20°. Ils expliquent ce phénomène par la désagrégation d'amas de virus à la suite de modification des conditions physiques (modification du pH, de l'ionocité par exemple) au niveau des tissus d'huîtres.

Pour des raisons de palatabilité et aussi de traditions alimentaires, les fruits de mer sont le plus souvent consommés crus. Une cuisson rapide est uniquement destinée, à permettre l'ouverture des valves. La cuisson ne dure guère plus de 5 à 10 minutes et la température atteinte au coeur des tissus est de l'ordre de 35° C à 50° C, ce qui ne permet pas l'inactivation de toutes les particules virales éventuellement présentes. C'est ainsi que des coquillages cuits à la vapeur ont été impliqués dans des épidémies à virus de Norwalk (MORSE *et al.* -1986)

Les temps de cuisson nécessaires pour inactiver tous les virus ne sont pas déterminés : les poliovirus garderaient leur pouvoir infectieux après 60 minutes à 65° C. L'inactivation du virus de l'hépatite A n'est que partielle à 60° C, même si l'exposition à cette température est prolongée pendant 10 heures. Toutefois, ce virus est inactivé à 100° C en 5 minutes (DEINHARDT et GUST - 1983).

En fait, pour éliminer le risque viral, on ne peut que préconiser une augmentation de la durée et de la température de cuisson (100° C pendant 5 à 10 minutes), au détriment peut-être des qualités organoleptiques du produit.

III - DONNEES EPIDEMIOLOGIQUES D'ORIGINE VIRALE

La possibilité d'accumuler des virus pathogènes par les fruits de mer, associé aux habitudes alimentaires (consommés crus ou peu cuits), font de ces aliments des agents privilégiés de la propagation des infections virales par voie orale (BLACKWELL *et al.* - 1985).

A la suite de la mise en place d'une surveillance bactériologique des zones conchylicoles et à l'établissement de critères de salubrité pour l'exploitation et la commercialisation des produits de la mer, les infections d'origine bactérienne, comme la fièvre typhoïde, très fréquentes durant la première moitié de ce siècle, ont reculé (SHEAR et GOTTLIEB - 1980 ; POGGI - 1986 (a))

Actuellement, les pathologies d'origine virale constituent un des principaux problèmes microbiologiques liés à la consommation des coquillages.

La transmission de virus par l'intermédiaire des fruits de mer a été établie depuis les années 50.

Elle est provoquée, le plus souvent, par la consommation de coquillages soit ramassés dans des zones non-autorisées par des professionnels peu scrupuleux ou des consommateurs imprudents, soit mal épurés (HELLER *et al.* - 1986).

Elle peut survenir aussi à la suite de l'ingestion de coquillages provenant de zones conchylicoles autorisées, mais momentanément polluées après une forte pluie ou un apport fluvial de polluants (MACKOWIAK *et al.* - 1976).

Les virus entériques, susceptibles d'être isolés à partir des bivalves, sont :

- les entérovirus cultivables (poliovirus, virus coxsackie, virus ECHO)
- les virus des hépatites :
 - hépatite A (VHA)
 - hépatite E (VHE)

- les virus des gastro-entérites :
 - rotavirus
 - virus de Norwalk et apparentés
 - small round virus
 - calicivirus
 - astrovirus
 - coronavirus
- les adénovirus

Or, il existe un hiatus entre la méthodologie et l'épidémiologie, en ce sens que, pour les virus cultivables, fréquemment isolés à partir des coquillages, il y a peu d'évidences épidémiologiques, alors que, pour les virus non-cultivables en routine (virus des hépatites, virus des gastro-entérites) les données épidémiologiques concernant la transmission par les mollusques bivalves sont importantes (Tableau 5).

En effet, entre 1981 et 1985, 162 épidémies d'hépatites et de gastro-entérites virales ont été signalées aux USA (GUZEWICH et MORSE - 1986), et entre 1961 et 1982, il y a eu près de 30 épidémies, regroupant plus de 1 300 cas d'hépatites A aux USA, dûs à l'ingestion d'huîtres et de clams contaminés (RICHARDS - 1985). De plus, le nombre de gastro-entérites associées à la consommation de fruits de mer est en nette augmentation, aussi bien en Grande-Bretagne (B.H.E 7/89) qu'aux Etats-Unis (Figure 3)

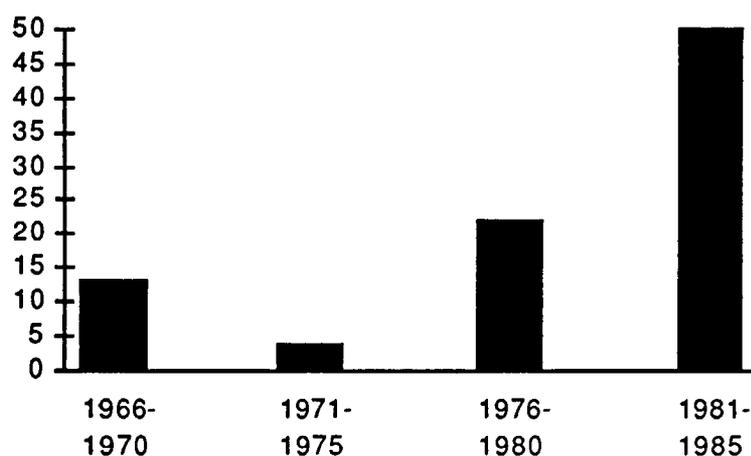


Figure 3 : Epidémies de gastro-entérites virales liées à la consommation des fruits de mer recensées entre 1966 et 1985 aux USA (d'après GERBA - 1988).

A l'échelle de la France, il est difficile d'évaluer l'incidence des gastro-entérites et des hépatites d'origine alimentaire, car ces maladies n'étant pas à déclaration obligatoire (suppression de la déclaration obligatoire de l'hépatite A en 1987), il est très problématique de réaliser des enquêtes épidémiologiques.

ANNEE	COQUILLAGE	LIEU	NOMBRE DE CAS	VIRUS RESPONSABLE	REFERENCES
1973	huîtres	USA	265	VHA	Mackowiak <i>et al.</i> (1976)
1978	huîtres	Australie	2000	Virus de NORWALK	Murphy <i>et al.</i> (1979)
1978	huîtres	Australie	150	Virus de NORWALK	Linco et Grohmann (1980)
1980	huîtres	Floride	6	Virus de NORWALK	Gunn <i>et al.</i> (1982)
1980	huîtres	Philippines	7	VHA	Ohara <i>et al.</i> (1983)
1980-81	coques	Grande-Bretagne	424	VHA	O'Mahony <i>et al.</i> (1983)
1982	clam huîtres	USA USA	813 204	Virus de NORWALK	Morse <i>et al.</i> (1986)
1983	coques	Singapour	322	VHA	Goh <i>et al.</i> (1984)
1983	huîtres	Grande-Bretagne	181	Virus de NORWALK	Gill <i>et al.</i> (1983)
1985	clam	New-York	5	gastro-entérites	Vogt et Satkin (1986)
1985	huîtres	Grande-Bretagne	13	Virus de NORWALK	Heller <i>et al.</i> (1986)
1988	clam	Shangai	292 301	VHA	Yao (1989)

VHA : Virus de l'Hépatite A

Tableau 5 : Quelques épidémies de maladies virales liées à la consommation de coquillages

Par ailleurs, l'épidémiologie des maladies infectieuses transmises par les coquillages est complexe. Elle nécessite une collaboration étroite entre médecins traitants, pharmaciens et organismes officiels de santé publique et il est souvent difficile de déterminer la nature puis l'origine du produit contaminant.

IV - CONCHYLICULTURE ET REGLEMENTATION SANITAIRE

IV - 1 : PRODUCTION CONCHYLICOLE FRANCAISE

Les mollusques bivalves marins sont largement consommés par l'Homme. Ils sont obtenus soit par la pêche, soit par l'élevage ou conchyliculture.

Les principaux mollusques commercialisés en France font partie de la famille des Ostréidae (huîtres, genres *ostrea* et *crassostrea*), des Mytilidae (moules), Pectinidae (coquilles St Jacques, pétoncles) et Veneridae (palourdes, praires, clams).

On dénombre actuellement plus de 8 000 entreprises d'élevage de coquillages répartis sur le littoral français. L'industrie coquillère, ou conchyliculture, est en grande partie représentée par l'élevage des huîtres et des moules. Ainsi, d'après le comité interprofessionnel de la conchyliculture, la production annuelle d'huîtres creuses est d'environ 120 000 tonnes et celle de moules de 60 000 tonnes.

La France vient au quatrième rang mondial pour la production d'huîtres creuses derrière les USA, le Japon et la Corée du Sud. La production française d'huîtres assure la quasi totalité de la demande intérieure. Par contre, 50 000 tonnes environ de moules sont importées chaque année en provenance des Pays-Bas et d'Espagne.

IV - 2 : L'OSTREICULTURE EN FRANCE

L'ostréiculture en France repose essentiellement sur des techniques d'élevage traditionnelles, c'est-à-dire la culture de la post-larve (ou petit naissain) jusqu'à l'adulte.

Cette culture, très bien décrite par MARTEIL en 1979, est organisée en plusieurs étapes :

- la production de naissain (ou captage des larves),
- la croissance et l'élevage des huîtres,
- l'engraissement ou l'affinage,
- la commercialisation.

La première étape de la culture des huîtres intervient lorsque les larves véligères issues d'un oeuf fécondé vont chercher à se fixer sur un support. Leur captage s'effectue sur des collecteurs. Les collecteurs les plus employés sont les tuiles romaines assemblées de différentes manières selon les régions.

Le naissain est le nom donné à la larve fixée en fin de métamorphose, qui sécrète une coquille et s'attache à ce support par le bord antérieure de sa valve gauche.

L'opération de décrochage de l'huître de son support est appelée "détroquage". Il a lieu, selon le type de collecteurs, entre 6 et 18 mois après la fixation. Le naissain détroqué est ensuite mis en élevage dans des viviers ou parcs pendant plusieurs mois ou années pour permettre la croissance des jeunes coquillages.

Les huîtres sont généralement livrées à la consommation dans la troisième ou quatrième année suivant la naissance. La récolte a lieu principalement pendant l'été et en automne. Toutefois, même si lors de la récolte, les huîtres ont acquis une qualité marchande quant à leur taille et leur poids, il est habituel de prolonger la culture par une étape "d'engraissement" qui a pour but d'améliorer le produit par accumulation de glycogène et de protéines. Cette opération, appelée affinage, est pratiquée en eaux libres, dans un site favorable où l'eau est un peu moins salée qu'en parc d'élevage et plus riche en plancton. Il est pratiqué aussi dans des "claires" où les huîtres restent en immersion permanente sous environ 50 cm d'eau. Ce sont d'anciens marais salants, très nombreux dans la région de Marennes-Oléron. La chair des huîtres y séjournant prend une couleur verte, ce qui leur permet d'acquérir des propriétés organoleptiques et une valeur commerciale accrues. Ce verdissement est dû à l'absorption par l'huître d'un pigment "la marennine" fabriqué et excrété par une diatomée, *Navicula ostrearia*.

Leur croissance achevée et après un éventuel affinage, les huîtres peuvent être directement expédiées par le producteur, mais la plupart du temps, ce travail

est confié à un autre établissement ostréicole spécialisé dans l'expédition, étant ou n'étant pas lui-même établissement d'élevage.

Dans l'attente du lavage, les coquillages peuvent être stockés dans des bassins submersibles ou insubmersibles. Ces installations sont semblables à celles utilisées dans l'élevage, souvent des casiers à fonds grillagés déposés sur la partie haute de l'estran, submersible par les marées.

Les mollusques récoltés sont nettoyés, lavés et débarrassés des corps étrangers puis transportés, soit dans des dégorgeoirs, soit dans des bassins de purification.

Tout établissement inscrit au casier sanitaire doit obligatoirement être équipé de dégorgeoirs. Ce sont des bassins insubmersibles, profonds de 0,5 à 1,20 m, et alimentés en eau de mer naturelle non-traitée, mais le plus souvent décantée dans une réserve adjacente. Le renouvellement de l'eau est, dans le meilleur des cas, quotidien. Toutefois, les exploitants négligent quelquefois ce changement, qui nécessite de lourdes manipulations.

Les coquillages restent en stabulation dans ces bassins 24 à 72 heures. Cette étape a pour but l'élimination des particules vaseuses ou sableuses restantes dans l'eau intervalvaire et d'améliorer l'aspect du coquillage (COEURDACIER - 1986).

L'alternance d'immersions et d'émersions apprend au coquillage à fermer progressivement et hermétiquement ses valves, tout en conservant son eau intervalvaire. Cette étape, appelée "trompage", est particulièrement utile dans le cas d'huîtres élevées en eau profonde dont le muscle adducteur est détendu, et qui, une fois sorties de l'eau, perdent rapidement leur eau intervalvaire, ce qui compromet leur transport et leur commercialisation.

Le dégorgement améliore également sensiblement la qualité bactériologique des huîtres, mais ne peut en aucun cas permettre l'épuration des coquillages insalubres (DEGRANGE - 1981). C'est pourquoi seuls les coquillages salubres y sont admis.

Contrairement au dégorgement, l'épuration a pour but de rendre bactériologiquement sains des coquillages reconnus insalubres. Les

établissements de purification sont équipés de bassins insubmersibles alimentés par une eau de mer désinfectée par différents procédés traditionnels (chlore, brome, ozone, U.V.). Les mollusques séjournant dans cette eau rejettent progressivement les micro-organismes qu'ils renferment sans s'auto-recontaminer.

Les coquillages lavés, dégorgés ou purifiés, et triés selon différentes catégories de taille et de poids, sont conditionnés dans des bourriches comportant une étiquette de salubrité, portant la définition du produit, le numéro d'établissement agréé et la date de conditionnement.

Cette étiquette, qui doit rester en place jusqu'à l'étal de vente, constitue une garantie pour le consommateur.

IV - 3 : CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES ZONE CONCHYLICOLES ET DES COQUILLAGES

Un milieu largement ouvert comme la mer ne peut pas être indemne d'éléments microbiens d'origine humaine. Ce qui importe avant tout est l'absence de germes pathogènes dans les secteurs fréquentés et exploités du littoral.

Il n'est pas envisageable actuellement, pour des raisons de coût et de lourdeur de mise en oeuvre, de rechercher en routine les bactéries pathogènes (salmonelles, vibrio) et les virus entériques dans l'environnement marin. Ainsi, en France, seuls les coliformes fécaux sont pris en compte et tiennent lieu d'indicateurs de la qualité sanitaire des zones littorales.

Les résultats des analyses sont destinés à donner l'assurance qu'aucun élément pathogène ne se trouve dans l'échantillon examiné. (HUNT - 1980).

Ces bactéries d'origine intestinale, sont excrétées en grandes quantités par les hommes et les animaux à sang chaud. Leur présence dans un échantillon donné est considérée comme le témoin d'une contamination fécale récente.

Tous les pays ont établi une échelle d'appréciation bactériologique des eaux et des coquillages, fondées sur le dénombrement de ces bactéries.

IV - 3 - 1 : Normes françaises

Le contrôle sanitaire des produits conchylicoles est assuré par:

- un classement du littoral en zones salubres et insalubres,
- un agrément des établissements d'expédition et de purification,
- une réglementation du mode de conditionnement des coquillages,
- l'exigence d'une autorisation de transport et d'une étiquette de salubrité sur chaque colis,
- le contrôle des coquillages mis en vente.

IV-3-1-1 : Normes de salubrité des zones conchylicoles

L'arrêté du 12 octobre 1976 fixe les normes de salubrité des zones conchylicoles. Ces normes tiennent compte du taux de contamination microbiologique des coquillages et non pas de l'eau elle-même. Les mollusques, qui concentrent et intègrent les germes en filtrant de grandes quantités d'eau, seraient des indicateurs de la qualité sanitaire d'une zone littorale, plus sensibles et plus stables que l'eau elle-même.

La quantification des coliformes fécaux est effectuée dans 100 ml de chair + liquide intervalvaire de coquillages, vivant sur le lieu considéré. Sur 12 mois consécutifs, 26 échantillons doivent être analysés.

La zone est considérée salubre, si le nombre le plus probable (NPP) de coliformes fécaux est inférieur ou égal à 300/100 ml de chair de coquillage broyée et diluée au 1/3 dans de l'eau physiologique.

5 dépassements sont autorisés en 12 mois, à condition que le NPP de coliformes fécaux soit inférieur à 1000/100 ml de chair lors de 3 prélèvements, et à 3000 lors de 2 prélèvements.

Les zones non-conformes à ces normes sont classées insalubres ; leur exploitation est soit interdite, soit autorisée par les autorités à la condition d'appliquer ensuite aux coquillages récoltés une purification en bassin ou un reparcage en zone salubre . Les durées minimales préconisées sont de 48 heures pour la purification, et de 1 mois pour le reparcage.

La norme de 300 coliformes fécaux/100 ml de chair de coquillages est reprise par la directive C.E.E. 79/923 du 30 octobre 1979 relative à la qualité des eaux conchylicoles.

La surveillance des zones conchylicoles est assurée par l'I.F.R.E.MER pour le compte de l'Administration des Affaires Maritimes (POGGI - 1986 (b)). Le suivi de la qualité du milieu et des produits comprend :

a) le classement et le contrôle des zones littorales

La qualité des eaux est évaluée grâce à 3 réseaux de surveillance :

Le RNO : réseau national d'observation de la qualité du milieu marin (contrôle des paramètres physico-chimiques)

Le REMI : réseau de surveillance microbiologique

Le REPHY : réseau de surveillance des efflorescences planctoniques toxiques (paralytic shellfish poison (PSP) et diarrhetic shellfish poison (DSP)).

Les résultats des contrôles périodiques sur la salubrité des zones conchylicoles peuvent amener le préfet à "fermer" temporairement les zones contaminées.

b) l'inspection des établissements de production, de commercialisation et de traitement des coquillages

c) l'agrément de nouvelles installations de conditionnement et d'expédition (inscription au casier sanitaire)

d) la délivrance d'étiquettes de salubrité

IV - 3 - 1 - 2 : Normes de salubrité des coquillages à la vente

L'arrêté du 21 décembre 1979 définit les critères microbiologiques des denrées animales, concernant les produits de la pêche. Ce texte impose la recherche et le dénombrement des coliformes fécaux et des streptocoques fécaux :

Les coquillages ne doivent pas contenir plus de 300 coliformes fécaux/100 ml de chair (avec une tolérance, si moins de 3/5 des résultats sont compris entre 3000 et 9000), ni plus de 2500 streptocoques fécaux/100 ml de chair.

Dans le cas où la contamination en coliformes fécaux dépasse 3000/100 ml de chair ou s'il y a eu intoxication alimentaire, le texte impose la recherche de salmonelles. Il doit y avoir absence de salmonelles dans 25 g.

Ce contrôle de la "denrée" est effectué par les services vétérinaires.

IV - 3 - 1 - 3 : Le contrôle aux frontières

Le contrôle à l'importation, des coquillages destinés à une consommation humaine directe, est réalisé par les douanes (contrôles documentaires) et les services vétérinaires (contrôles analytiques des produits et du conditionnement).

Lors de l'importation pour immersion, l'autorisation est délivrée par l'I.F.R.E.MER.

IV - 3 - 2 : Normes étrangères pour les zones conchylocoles et les coquillages

Les critères microbiologiques (coliformes) , imposés par les différents pays producteurs, sont présentés dans le tableau 6.

L'analyse de ces données chiffrées montre une certaine hétérogénéité. Cependant il apparaît que dans la très grande majorité des cas, le contrôle des zones conchylocoles et des coquillages est essentiellement fondée sur le dénombrement des coliformes fécaux.

Une évolution réglementaire, inscrite dans le cadre de marché unique européen de 1993 est essentielle, pour que la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants ne soit plus entravée par des disparités concernant le respect des exigences sanitaires.

IV - 3 - 3 : Directive européenne de 1993

Ce projet européen vise à harmoniser les règles sanitaires pour la production et la mise sur le marché des coquillages (y compris ceux importés des pays hors CEE), tout en assurant au consommateur la qualité du produit.

		Coliformes totaux /100 ml	Coliformes fécaux /100 ml	<i>E.coli</i> /100 ml	Tolérances
EAUX CONCHY- LICOLES	France		300		5 éch./12 dont 3 ≤ 1000 et 2 ≤ 3000
	Italie			2	10 % ≤ 7
	Espagne			15	50 % dont 90 % ≤ 50 10 % ≥ 50
	Pays-Bas		50		10 % ≤ 200
	CEE (1979)		300		25 % ≥ 300
	USA	70	14		10 % ≤ 230 10 % ≤ 43 ou 39 (selon analyse)
PRODUITS	France		300		60 % ≤ 9000
	Italie			500	
	Espagne		50		
	Pays-Bas		300		
	USA		230		
	Afrique du Sud		500		10 % ≥ 500

Tableau 6 : Normes microbiologiques internationales pour les coquillages
d'après HUNT (1980), GRABOW *et al.* (1989), POGGI (1990)

Une directive du conseil, N° 91/492/CEE a été publiée le 24 septembre 1991.

Elle prévoit une réglementation définissant :

a) des normes sanitaires des produits, parmi lesquelles sur le plan microbiologique la nécessité pour les coquillages de contenir moins de 300 coliformes fécaux ou moins de 230 *E. Coli* /100 g de chair + liquide intervalvaire, avec absence de salmonelles /25 g (ces critères microbiologiques proposés par la C.E.E. existent déjà dans la réglementation française).

b) en fonction des normes, un classement des zones de production :

- zones "a" : récolte pour une consommation humaine directe (normes précitées)

- zones "b" : récolte pour une consommation humaine différée, après que les coquillages ont subi une purification ou un reparcage, ou un traitement thermique. Les mollusques issus de ces zones ne doivent pas dépasser la limite de 6000 coliformes fécaux ou 4600 *E. Coli* /100 g de chair dans 90 % des échantillons.

A l'issue des traitements indiqués, les mollusques doivent avoir atteint les normes de la zone "a".

- zones "c" : récolte pour une consommation humaine très différée. Les mollusques issus de ces zones ne doivent pas dépasser la limite de 60 000 coliformes fécaux/100 g de chair. La mise sur le marché ne peut se faire qu'après une longue période de reparcage (minimum 2 mois) ou après un reparcage associé à une purification, en vue d'atteindre les normes de la zone "a".

Ce projet de norme constitue un compromis entre les partisans de la purification systématique des coquillages, ce qui permettrait de s'affranchir des variations de qualité du milieu marin (Italie, Espagne, Grande-Bretagne) et ceux de la préservation du milieu initial (France, Pays-Bas). La France en effet, n'a pas choisi d'imposer le passage des coquillages en station de purification, mais plutôt d'opter pour l'assainissement des zones de production.

Ce texte communautaire prévoit aussi des réglementations concernant :

- les normes pour la récolte et le transport des mollusques,
- les conditions du reparcage,
- les conditions d'agrément des établissements,
- le contrôle des établissements,
- les conditions de conditionnement, conservation, transport,
- le contrôle des importations à partir d'un pays tiers.

Ce texte prévoit aussi une surveillance périodique (au niveau biologique et chimique), des eaux et des cheptels .

Chaque état membre serait responsable de ses contrôles.

On peut remarquer que ce projet n'est nullement directif sur les durées de reparcage et de passage dans les établissements de purification des coquillages. Seul le respect des normes microbiologiques en fin de traitement (300 coliformes fécaux/100 g) est exigée.

Enfin, ce projet précise que "en l'absence de techniques de routine pour la recherche de virus et de la fixation de normes virologiques, le contrôle sanitaire est uniquement basé sur le comptage de bactéries fécales". Actuellement, aucun pays n'applique de normes virologiques aux eaux conchylicoles et aux coquillages.

V - LA CONTAMINATION VIRALE DES COQUILLAGES EN MILIEU NATUREL

Différentes études ont été menées sur la recherche de virus entériques à partir de coquillages récoltés en zones soit autorisées, soit interdites ; leurs résultats sont résumés dans le tableau 7. On constate, que plusieurs analyses ont conduit à l'isolement de virus entériques à partir d'huîtres provenant de zones autorisées pour l'exploitation.

Les virus isolés appartiennent principalement au groupe des Entérovirus. Parmi ceux-ci, les poliovirus, le plus souvent de souche vaccinale, les virus E.C.H.O. et les virus Cocksackie du groupe B.

L'isolement de réovirus, de Cocksackie de groupe A cultivables et du virus de l'hépatite A est plus exceptionnel. Cette très faible prévalence du VHA de même que l'absence de mise en évidence des virus responsables des gastro-entérites s'explique facilement par les difficultés méthodologiques rencontrées pour l'isolement de ces virus.

A 2 reprises, des virus sont isolés à partir d'eaux d'élevage autorisées, à des taux de 0,01 à 0,4 particules/litre (GOYAL *et al.* - 1979) et de 0,3 à 2 particules/litre (VAUGHN *et al.* - 1980). Dans tous les autres cas, la présence de virus dans l'eau n'était pas établie.

En fait, la relation entre la pollution virale des eaux d'élevage et la présence de virus dans les coquillages est généralement faible, ce qui rend l'analyse virologique des eaux inadaptée à l'estimation de la contamination virale des fruits de mer eux-mêmes (GERBA *et al.* - 1980). Les virus peuvent en effet être retenus par les coquillages, pendant une période qui peut aller jusqu'à 2 mois, longtemps après que les virus aient complètement disparu de l'eau environnante sous l'effet de facteurs inactivants naturels (dilution, sédimentation) (MACKOWIAK *et al.* - 1976).

La contamination des coquillages peut ainsi être le témoin d'une pollution récente ou ancienne dans le temps, ou bien proche ou éloignée dans l'espace.

De nombreuses études ont montré, depuis une quinzaine d'années, que les normes bactériennes de contamination fécale étaient inadaptées à la prévention du risque sanitaire potentiel lié aux virus. Il est en effet admis qu'il n'y a pas de corrélation entre les indicateurs bactériens dans l'eau de mer et les coquillages, et le nombre de virus observés dans l'eau de mer et ces mêmes mollusques. Les standards bactériens se révèlent inaptes à traduire une contamination virale faible des fruits de mer, car les mécanismes complexes intervenant dans l'accumulation des micro-organismes par les coquillages et l'auto-épuration de ceux-ci sont probablement différents dans le cas des bactéries et dans le cas des virus.

Cette disparité pourrait également s'expliquer par le fait que le comportement de ces différents micro-organismes n'est pas identique dans le milieu marin. Les coliformes sont plus sensibles à des facteurs naturels d'inactivation, comme l'ensoleillement, que la plupart des entérovirus (FATTAL *et al.* - 1983). Les virus sont, en outre, plus résistants aux traitements d'épuration et persistent plus longtemps après leur rejet dans l'eau de mer que les bactéries (LUCENA *et al.* - 1982).

VI - RECHERCHE D'UN INDICATEUR DE CONTAMINATION VIRALE

A l'heure actuelle, la détermination d'une contamination virale consiste en la recherche des entérovirus eux-mêmes. Différents auteurs, parmi lesquels GRABOW *et al.* (1989), ont émis l'idée d'un indicateur, autre que les coliformes

fécaux, qui pourrait permettre l'évaluation du risque viral. Cet indicateur de contamination virale devrait satisfaire aux conditions suivantes :

- l'indicateur doit toujours être présent quand les virus entériques sont présents,
- l'apparition et la persistance de l'indicateur et des virus entériques doivent être similaires,
- l'indicateur et les virus entériques doivent se trouver dans un rapport constant et le dénombrement de l'indicateur doit donner une bonne estimation du nombre de virus pathogènes présents,
- l'indicateur doit être présent à des taux supérieurs à ceux des virus entériques,
- l'indicateur doit être résistant aux stress de l'environnement et aux désinfectants dans les mêmes proportions que les virus entériques,
- l'indicateur doit être non pathogène et facilement quantifiable,
- l'indicateur doit être facilement détectable dans tous les types d'échantillons.

Les Streptocoques fécaux ont été proposés comme indicateurs de présence virale. Ces germes sont effectivement plus résistants que les coliformes aux traitements de désinfection et persistent plus longtemps dans le milieu marin. Ces propriétés font que leur devenir se rapproche plus de celui des virus que les coliformes. DELATTRE et DELESMONT (1981) observent une concentration 15 fois plus élevée des streptocoques fécaux que d'*E. coli* dans les moules et les coques.

En outre, BOSCH *et al.* (1988) ont noté une corrélation entre les taux d'entérovirus et de streptocoques fécaux dans les sédiments en cas de pollution par une déposition récente.

Cependant, les streptocoques fécaux ne constituent pas un bon indicateur viral car leur sensibilité aux agents désinfectants est en général plus élevée que celle des virus entériques. C'est pourquoi de nombreux travaux sont en cours pour rechercher un modèle viral spécifique des virus entériques, qui pourrait être constitué par des bactériophages. Ceux-ci sont en effet mis en évidence facilement et avec une grande rapidité.

Parmi les bactériophages, les coliphages somatiques ont l'avantage d'être proches des virus humains par leur taille, leur morphologie, leur structure et leur

composition (GRABOW - 1986). Ils sont associés à une pollution par des eaux usées et sont généralement 1000 fois plus nombreux que les virus entériques pathogènes dans l'eau.

Cependant, le choix des coliphages comme indicateurs de contamination virale est critiqué car d'une part, l'eau usée traitée contient souvent des coliphages, sans refermer d'entérovirus, et d'autre part, les coliphages peuvent se multiplier dans les eaux d'estuaire pendant l'été, car les bactéries hôtes sont présentes dans le milieu.

Parmi les phages isolés à partir du milieu hydrique, les coliphages F spécifiques, qui utilisent comme récepteurs les pili sexuels d'*E. coli*, ont une structure proche de celle des entérovirus et leur réplication semble limitée au tube digestif des animaux à sang chaud. Toutefois, HAVELAAR (1987) a constaté leur multiplication dans des eaux usées aux dépens de bactéries-hôtes ayant déjà acquis leurs pili sexuels, avant rejet dans l'environnement.

JOFRE *et al.*, en 1986, ont proposé d'utiliser les bactériophages de *Bacteroïdes fragilis* comme témoin de contamination virale des eaux. D'après ces chercheurs, ces phages sont présents dans une proportion dix fois plus grande que les virus entériques et leur présence serait corrélée avec celle des entérovirus et des rotavirus dans des sédiments marins pollués. Ce rapport est le même dans les eaux usées.

De plus, ils auraient le même comportement que les virus entériques vis-à-vis des traitements d'épuration et des conditions environnementales (JOFRE *et al.* 1989).

En effet, BOSCH *et al.* (1986) ont montré que ces bactériophages étaient aussi résistants que le poliovirus et les rotavirus à la chloration.

Les phages de *Bacteroïdes fragilis* présentent l'avantage d'être hautement spécifiques de la pollution fécale humaine, et contrairement à certains coliphages, ils ne peuvent pas se multiplier dans l'environnement, hors du tractus intestinal humain.

Cependant, leur mise en évidence est encore relativement difficile car elle nécessite de travailler en conditions d'anaérobiose.

Un groupe de travail international étudie actuellement la possibilité d'utiliser effectivement et en routine les bactériophages comme indicateurs de

contamination virale. Ses conclusions ne sont pas encore déposées. Cependant certains auteurs pensent que l'on pourrait s'orienter vers l'utilisation d'un panel de bactériophages.

VII : AMELIORATION DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES COQUILLAGES

La contamination des coquillages est un phénomène réversible et les bivalves placés en eau propre sont susceptibles d'éliminer spontanément les germes dont ils sont porteurs. Deux techniques sont appliquées à cette fin ; il s'agit de la purification et du reparcage.

A l'issue du traitement, les coquillages doivent satisfaire aux normes microbiologiques de salubrité pour la commercialisation.

VII - 1 : PURIFICATION

La purification consiste en un stockage des mollusques insalubres, pendant un temps minimum de 48 heures dans des bassins insubmersibles alimentés par de l'eau de mer désinfectée.

Une eau de mer de qualité chimique et biologique acceptable est d'abord introduite dans des bassins de décantation, puis elle passe dans des bacs de contact, où elle est désinfectée par des procédés classiques (chlore, brome, ozone U.V.). Elle est ensuite envoyée dans les bassins de traitement des mollusques.

La circulation d'eau à travers ces bassins de traitement peut se faire en circuit fermé, avec stérilisation de l'eau en continu, ou bien en circuit ouvert et dans ce cas l'eau est renouvelée à intervalles réguliers.

VII - 1 - 1 : Désinfection de l'eau

Un traitement de désinfection est considéré comme efficace lorsque l'abattement moyen obtenu sur chaque germe est d'au moins 3 log.

La résistance d'un micro-organisme est variable en fonction du désinfectant utilisé et de son état dans le milieu hydrique. Ainsi, les micro-organismes agrégés ou associés à des éléments particulaires sont relativement protégés de l'action d'un désinfectant, qu'il soit chimique (chlore, brome ou ozone) ou physique (U.V.).

L'efficacité des procédés de désinfection dépend aussi de la nature des agents germicides, des conditions de leur mise en oeuvre (dose, temps de contact) et de la qualité physico-chimique de l'eau (pH, matières en suspension...).

L'action d'un désinfectant se traduit par la perturbation dans la structure chimique des micro-organismes et plus particulièrement, dans le cas des virus, par la destruction de son acide nucléique et/ou de la capside.

On constate des différences de sensibilité aux traitements désinfectants entre les différents types de virus. Cela est probablement dû à des diversités conformationnelles, ou à la plus ou moins grande complexité de leur acide nucléique (simple ou double brin).

En règle générale, les indicateurs microbiens (bactéries fécales) sont plus sensibles à la désinfection que les virus entériques et que d'autres pathogènes comme les mycobactéries, les bactéries sporulées et les kystes de protozoaires (SOBSEY - 1989).

Les principaux agents de désinfection et d'élimination des micro-organismes dans les eaux sont le chlore, le brome, l'ozone et les rayons ultra-violet.

- le chlore

La chloration consiste à mettre en contact de la façon la plus homogène possible le réactif (chlore gazeux (Cl_2), eau de javel (NaOCl), hypochlorite de calcium (Ca(OCl)_2)) avec l'eau de mer pendant un temps approprié. En fin de traitement, la dose résiduelle de chlore libre recommandée est de 0,1 à 0,2 mg/l.

Cette technique a pour principal inconvénient de générer des sous-produits indésirables. En effet, le chlore réagit avec la matière organique pour donner des produits organo-chlorés stables et avec l'ammoniaque pour former des chloramines, qui sont beaucoup moins germicides que le chlore libre.

Leur toxicité pour les organismes vivants aquatiques est largement

démontrée. PAILLARD et SIBONY (1986) estiment que pour n'observer aucune toxicité aiguë, la dose de chlore résiduel ne devrait pas excéder 0,06 mg/l.

GRABOW *et al.* (1983) inactivent 99,99 % du virus de l'hépatite A en 2 min30 avec un résiduel de chlore libre compris entre 0,28 et 0,4 mg/l.

FUJIOKA *et al.* (1986) éliminent plus de 99,9 % du poliovirus 1 en 5 minutes en tampon phosphate, avec 0,4 à 0,8 mg/l de résiduel de dioxyde de chlore.

KESWICK *et al.* (1985) montrent que le virus de Norwalk est plus résistant au chlore que les autres virus entériques. Ainsi, à des doses de 3,75 ou 6,25 mg/l de chlore libre pendant 30 minutes, le virus de Norwalk et le bactériophage f2 ne sont pas complètement inactivés, contrairement au poliovirus et au rotavirus Wa. Seul le bactériophage f2 présenterait donc une sensibilité comparable à celle du virus de Norwalk.

- le brome

L'action du brome est similaire à celle du chlore. Le brome réagit avec la matière organique et se combine avec l'ammoniaque pour former des bromamines, plus germicides que les chloramines, mais dont le temps de vie est plus court (AUDIC - 1990).

Les formes résiduelles du brome disparaissent rapidement.

A dose molaires égales, le chlore et le brome présentent un pouvoir germicide voisin.

La bromation est encore peu développée en désinfection de l'eau de mer.

- l'ozonation

L'ozone est produit à partir de l'oxygène de l'air par décharge électrique entre 2 électrodes. L'air ozoné ainsi produit est additionné à l'eau à désinfecter.

Les doses appliquées sont sensiblement les mêmes que celles du chlore (0,1 à 5 mg/l) (KAWAMURA *et al.* - 1986), et comme pour le chlore, la présence de fortes quantités de matières organiques dissoutes limite l'efficacité du traitement. En effet, celles-ci réagissent avec l'ozone et réduisent ainsi la quantité de désinfectant libre disponible pour agir sur les micro-organismes.

L'ozone ne présente pas d'effet remanent et ne génère pas de sous-produit

toxique, mais il est recommandé de l'employer uniquement pour traiter des eaux peu chargées.

Son spectre d'action germicide est très étendu et notamment vis-à-vis des virus. ROY *et al.* (1982) obtiennent 99 % d'inactivation du poliovirus type 1 en 25 à 90 secondes avec respectivement 0,15 et 0,20 mg/l d'ozone résiduel dans un tampon inorganique. Selon HERBOLD *et al.* (1989), 0,25 à 0,38 mg/l d'ozone est nécessaire pour obtenir l'inactivation complète dans l'eau du virus de l'hépatite A, mais seulement 0,13 mg/l pour inactiver le poliovirus type 1.

L'efficacité virucide de l'ozone est plus forte et plus rapide que celle du chlore. Ainsi, VAUGHN *et al.* (1987) rapportent une inactivation à pH 8 de 99,9 % du rotavirus simien SA 11 en 6 secondes avec un résiduel d'ozone de 0,1 mg/l, contre 28 secondes avec un même taux de chlore résiduel. Ils indiquent aussi que le rotavirus humain Wa est plus sensible à la désinfection que le rotavirus simien SA 11.

- le rayonnement ultra-violet (U.V.)

Les radiations U.V. stérilisantes sont comprises entre 200 et 280 nm.

Pour effectuer la stérilisation de l'eau, il est nécessaire de la faire circuler devant des lampes à vapeur de mercure générant un rayonnement de longueur d'onde 253,7 nm, pour laquelle l'efficacité germicide est optimale.

Les U.V. sont actifs sur tous les micro-organismes, virus, bactéries, champignons, algues et certains protozoaires. Cet effet germicide est obtenu sans qu'il y ait modification de la composition chimique de l'eau, ni de sa couleur, ni de son pH.

D'après HARRIS *et al.* (1987), les U.V. agissent sur la dimérisation de l'uracile. Etant donné que contrairement aux bactéries, les virus ne possèdent pas d'enzymes capables d'induire une photoréactivation, l'acide nucléique est ainsi irréversiblement lésé.

De toutes les méthodes de désinfection, les radiations U.V. sont considérées comme l'une des plus efficaces, rapides et des moins polluantes, cependant il n'y a aucune rémanence, et le traitement n'est efficace que sur une faible profondeur et

si l'eau est peu turbide.

En effet, les matières en suspension (MES) sur lesquelles se fixent un grand nombre de germes font un écran vis-à-vis des micro-organismes.

En fait, la désinfection par les U.V. ne serait efficace que lorsque l'eau contient moins de 20 mg de MES/l (PAILLARD et SIBONY - 1986).

Le vieillissement des lampes et l'encrassement des tubes protecteurs nécessitent un renouvellement des équipements toutes les 7000 ou 8000 heures.

La dose de rayonnement U.V. est exprimée en mW.s/cm^2 (ou en mJ/cm^2). Elle est dépendante de la puissance de la lampe (mW./cm^2) et du temps d'exposition d'un volume d'eau à cette intensité lumineuse.

Pour dépurier à 99,9 % des eaux contenant différents micro-organismes, les doses U.V. nécessaires peuvent varier d'un facteur de 1 à 15, selon le germe considéré.

Les doses minimales de traitements recommandés sont de 16 mW.s/cm^2 pour l'aquaculture, 25 mW.s/cm^2 pour l'eau potable et 100 mW.s/cm^2 pour les eaux résiduaires. Il n'y a pas de risque de surdosage.

Il est difficile de comparer les doses U.V. inactivantes pour chaque micro-organisme, appliquées par différents auteurs, car les expérimentations effectuées diffèrent par le mode d'exposition (système statique ou eau circulante), le milieu dans lequel se trouve le micro-organisme (eau, tampon, milieu de culture cellulaire) etc... En outre, il est difficile de mesurer précisément une dose U.V. en système expérimental.

Selon CHANG *et al.* (1985), l'inactivation du poliovirus 1 et du rotavirus SA 11 nécessitent respectivement 21 et 25 mW.s/cm^2 . Tandis que HARRIS *et al.* (1987) appliquent des doses de 29 et 45 mW.s/cm^2 pour inactiver le poliovirus 1 et le réovirus 1. Enfin, BOSCH *et al.* (1989) constatent que le phage f2 est plus résistant aux U.V. que le poliovirus 1, le rotavirus SA 11 et le phage B40-8.

Les doses nécessaires pour inactiver la plupart des bactéries végétatives sont beaucoup plus faibles que celles requises pour les virus, puisqu'elles varient de 5 à 15 mW.s/cm^2 .

VII - 1 - 2 : Application des traitements de désinfection à l'eau des stations de purification des coquillages

Lorsque la désinfection par un procédé chimique est appliqué à l'eau de mer destinée à la purification des coquillages, il faut veiller à ce que les quantités d'oxydant résiduel ne modifient pas l'activité physiologique des mollusques, ce qui pourrait perturber la purification.

En France, fonctionnent essentiellement des stations de purification au chlore et à l'ozone, alors qu'aux USA et en Grande-Bretagne, la désinfection est réalisée avec l'action des U.V.

En juin 1991, 34 stations de purification existaient le long du littoral français, parmi lesquelles 8 seulement sont des stations expérimentales utilisant les rayons ultra-violetts.

Ce choix français est probablement lié en grande partie au coût d'installation des équipements U.V. et à la nécessité de traiter des eaux peu turbides, ce qui oblige parfois à pratiquer une filtration préalable de l'eau de mer lorsque la décantation est incomplète.

Les stations utilisant le chlore gazeux ou liquide (eau de javel) sont les plus anciennes. Le mélange du désinfectant avec l'eau de mer y est réalisé dans un bac de contact. Le chlore libre résiduel est ensuite éliminé par action d'un composé réducteur tel que le thiosulfate de sodium parfois suivie d'un passage de l'eau sur charbon actif. L'eau ainsi désinfectée est ensuite envoyée dans les bassins de traitement des coquillages.

Il est extrêmement important d'éliminer le chlore libre et les dérivés chlorés car, même à faible concentration (0,1 mg/l), ils sont susceptibles d'avoir un effet négatif sur le mécanisme de filtration des coquillages, et dans ce cas, certains micro-organismes, présents dans les mollusques contaminés ne sont plus inactivés.

Les stations utilisant l'ozonation fonctionnent sur le même principe. A noter que la toxicité de l'ozone en excès et son fort pouvoir de blanchiment des coquilles nécessitent une agitation vigoureuse de quelques minutes, avant d'introduire l'eau ozonée dans les bassins de traitement des mollusques.

VII - 2 : REPARCAGE

Le reparcage est une opération simple qui consiste à transférer les coquillages d'une zone polluée vers une zone salubre. La durée conseillée de séjour en reparcage est d'un mois minimum.

En dehors de toute notion d'épuration, ce reparcage est assez souvent réalisé en phase finale d'élevage.

VII - 3 : EFFICACITE DES TECHNIQUES DE DECONTAMINATION DES COQUILLAGES - DONNEES EXPERIMENTALES

Différentes études ont été menées pour évaluer l'efficacité des techniques de purification et de reparcage des coquillages, quant à l'élimination des micro-organismes

VII - 3 - 1 : Efficacité de la purification

La quasi-totalité des expérimentations réalisées sur la purification des coquillages a été menée dans des bassins remplis d'eau, traitée en continu par les rayons U.V. (RICHARDS - 1988).

Le tableau 8 rassemble quelques données chiffrées sur l'efficacité de ce système d'épuration.

La comparaison des travaux effectués sur l'épuration est parfois difficile, car les données varient selon l'espèce de coquillage, le mode de contamination (naturel ou artificiel), le niveau de contamination initial, le système d'épuration utilisé (système statique ou dynamique) etc.... Il ressort toutefois de ces études quelques points essentiels :

Coquillages	Micro-organismes	Température	Durée de l'épuration (eau traitée par U.V.)	Niveau de Contamination (/g)		Références
				Avant	Après	
Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	poliovirus	20-24° C	72 h	5.10 ³	N.D.	MITCHELL <i>et al</i> (1966)
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>) (<i>Ostrea lurida</i>) Clams (<i>Tapes japonica</i>)	suspension brute de poliovirus 1		96 h	10 ⁴	N.D.	HOFF et BECKER (1969)
	poliovirus 1 purifié		48 h	3,9.10 ²	N.D.	
	suspension brute de poliovirus 1		48 h	4.10 ⁴	5	
suspension brute de poliovirus 1		96 h	5.10 ⁴	10 ²		
Clams (<i>Mercenaria Mercenaria</i>)	<i>E. coli</i>	16° C	24 h	10 ⁵	10 ¹	CANZONIER (1971)
	Coliphage S-13	16° C 24° C	144 h 72 h	33 11	9 N.D.	
Clams (<i>Mya arenaria</i>)	poliovirus 1, 2 et 3.		144 h 72 h 24 h	2,26-3,33 <0,21 0,33	<0,5 <0,03 N.D.	METCALF <i>et al.</i> (1979-1980)
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Coliformes fécaux	21° C	24 h	8	<0,2	BUISSON <i>et al.</i> (1981)
				50	<0,5	
Huîtres (<i>Crassostrea gigas</i>)	Cricket paralysis virus		96 h	3.10 ⁴	1,5.10 ³	SCOTTI <i>et al.</i> (1983)
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	<i>E. coli</i>	15° C	72 h	0,8 10 ⁵	N.D. 10 ¹	MESQUITA (1988)
	Streptocoques fécaux		72 h	10 10 ⁵	2,3 5.10 ²	
	Coliphage		72 h	10 ² 10 ⁵	10 ² 10 ³	
Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	<i>E. coli</i>	15,5-19,5° C	52 h	8.10 ³	≈ 10 ¹	POWER et COLLINS (1989)
	poliovirus 1		52 h	2.10 ²	≈ 4	
	Coliphage A1-5a	52 h	5.10 ⁵	≈ 5.10 ³		
	<i>E. coli</i>	10° C	48 h	6,3.10 ⁵	≈ 10 ³	
	Coliphage A1-5a		48 h	7,1.10 ²	≈ 5.10 ¹	

N.D. : Non Déteçté

Tableau 8 : Efficacité de l'épuration (eau traitée par U.V.)

- le relargage des micro-organismes n'est obtenu que lorsque les conditions de l'environnement garantissent un bon état physiologique des coquillages :

La décontamination des bivalves n'est en effet compatible qu'avec une bonne activité de filtration. C'est pourquoi, la concentration en O₂ dissous dans l'eau des bassins d'épuration doit être supérieure à 60-70 % de la saturation (supérieure à 5 mg/l). De même, si une température minimale de 12° C est compatible avec une activité physiologique, une température supérieure à 19° C permet un relargage beaucoup plus efficace. Ceci a été bien montré par LIU *et al.* (1967) pour des virus coxsackie B4 en 48 à 72 heures, présents à des concentrations initiales de l'ordre de 10²/g de tissu.

Par ailleurs, l'épuration des coquillages est efficace lorsque la salinité est comprise entre 23 et 30‰ (à 18-20° C), et une salinité de 50 à 60 ‰ inférieure à celle des eaux de récolte, stoppe le processus d'épuration des bivalves (LIU *et al.* - 1967).

L'efficacité de l'épuration peut être entravée également pendant la période de reproduction. La sur-saturation de l'eau de stabulation en gamètes peut entraîner la mortalité des coquillages ou gêner la pénétration des rayons U.V. (BUISSON *et al.* - 1981).

- les cinétiques d'épuration peuvent être variables selon les virus.

la quasi-totalité des expérimentations sur l'épuration virale des mollusques bivalves ne fait appel qu'au modèle du poliovirus. Ainsi, SOBSEY *et al.* (1987) montrent qu'une durée d'épuration de 3 jours permet l'élimination de plus de 98 % de poliovirus type 1, mais qu'elle est insuffisante pour le virus de l'hépatite A, qui persiste encore à des taux équivalents à 41 % de la contamination initiale après 5 jours. De même POWER et COLLINS (1989) étudiant les cinétiques de relargage du poliovirus et d'un coliphage A1-5a montrent qu'après 52 heures d'épuration dans l'eau circulante désinfectée par les U.V., la quantité de poliovirus dans les moules a baissé de 1,86 log, tandis que celle des coliphages a chuté de 2,16 log.

On constate donc que les taux d'élimination sont variables selon le virus considéré.

- *le taux de décontamination décroît avec le temps.*

HOFF et BECKER (1969) ainsi que METCALF *et al.* (1979) ont souligné la forte décroissance du poliovirus durant les 24 premières heures du processus d'épuration, puis le ralentissement de la vitesse de décontamination.

Il est probable que les premiers micro-organismes éliminés sont ceux, le plus grand nombre, initialement présents dans le tube digestif des mollusques et que ceux présents dans les tissus sont plus difficiles à inactiver.

- *la vitesse de relargage des bactéries, et notamment celle des bactéries-tests de contamination fécale, est plus rapide que celle des virus :*

L'élimination des virus nécessite, le plus souvent, une stabulation des coquillages de 3 jours au minimum en bassin d'épuration, alors que l'élimination des bactéries, mêmes présentes à des taux initiaux très élevés (10^2 à $10^3/g$) est en général complète en 24 ou 48 heures (CANZONIER - 1971 ; PERKINS *et al.* - 1980 ; MESQUITA - 1988).

Cette disparité entre la vitesse d'élimination des bactéries et des virus par les coquillages expliquerait la survenue de maladies virales à partir d'huîtres épurées, satisfaisant aux critères bactériens de salubrité (GROHMANN *et al.* - 1981 ; GILL *et al.* - 1983 ; RICHARDS - 1985).

Différents auteurs ont émis une hypothèse selon laquelle les micro-organismes (virus et bactéries) présents dans le tractus digestif et associés aux particules alimentaires seraient éliminés dans les mêmes proportions, par les fonctions de défécation et/ou de digestion. Seuls les virus localisés dans les tissus périphériques seraient alors retenus plus longtemps (DI GIROLAMO *et al.* - 1975 ; METCALF *et al.* - 1980).

Toutefois, les travaux de POWER et COLLINS (1990) sur l'élimination du coliphage A1-5a et d'*E.coli*, ont montré que les 2 types de micro-organismes ne sont pas éliminés à la même vitesse à partir du tractus digestif. Après 48 heures d'épuration dans de l'eau traitée aux U.V., la réduction d'*E.coli* est de 99,9 %, alors que 10 % de la quantité initiale de coliphage est encore présente. La réduction de la contamination dans les autres tissus (manteau, branchies, muscles...) est tout à fait comparable pour ces deux micro-organismes (baisse de 95 % environ).

L'élimination des coliformes fécaux n'est donc pas la preuve d'une épuration complète.

Elle ne peut être que l'indication d'une activité de filtration satisfaisante des coquillages pendant la stabulation.

VII - 3 - 2 : Efficacité du reparcage

Le reparcage en eaux saines permet aux mollusques de relarguer les micro-organismes pathogènes et de se charger, éventuellement, en flore saprophyte de leur nouvel habitat.

La durée conseillée de reparcage est variable selon les pays, allant de 2 semaines aux USA à plus d'un mois en France.

Tout comme pour la purification, les 2 facteurs principaux qui interviennent à ce stade dans la décontamination des coquillages, sont la température de l'eau et le niveau de contamination initiale.

COOK et ELLENDER (1986) ont montré que lorsque les huîtres sont faiblement contaminées (entre 16 et 71 poliovirus type 1/100 g), l'épuration est complète en moins de 15 jours à condition que la température soit supérieure à 10° C. Pour des concentrations beaucoup plus élevées (22000 à 43000 UFP/100 g), les virus sont encore présents dans les coquillages après 31 jours, si la température est de 10° C, mais l'épuration est également incomplète après 15 jours à 17° C. En revanche, la totalité des virus est éliminée en moins de 7 jours si la température est supérieure à 25° C.

La décroissance bactérienne est beaucoup plus rapide, puisque ces mêmes auteurs observent une chute de 99,9 % des coliformes fécaux en 5 jours à 17° C et l'élimination de quantités élevées de salmonelles ($10^4/g$) en moins de 11 jours à 10° C.

Les taux de décroissance des micro-organismes (virus et bactéries) sont plus faibles en reparcage, qu'en épuration contrôlée, probablement à cause de fluctuations de température et de salinité, ainsi que de perturbations mécaniques etc...

Le reparcage n'est pas pratiqué dans tous les pays, en effet, il est parfois difficile de disposer de zones littorales non-polluées et faciles d'accès. Ces zones sont, de plus, susceptibles de subir des contaminations ponctuelles, à la suite de fortes pluies, entraînant un apport fluvial accru de polluants ou une remise en suspension de sédiments. La décontamination s'avère alors inefficace.

En outre, le reparcage des coquillages nécessite leur transport, souvent sur de longues distances, manipulation coûteuse et malaisée.

VIII - ELABORATION ET EVALUATION DES METHODOLOGIES D'ANALYSE VIROLOGIQUE DES COQUILLAGES

De nombreuses méthodes d'analyse virologique des coquillages sont proposées dans la littérature. L'évaluation de l'efficacité de chacune de ces méthodes est, dans la plupart des cas, réalisée à partir de coquillages artificiellement contaminés.

VIII - 1 : LES METHODES DE CONTAMINATION ARTIFICIELLE DES COQUILLAGES

La contamination artificielle des coquillages est réalisée soit **in-vitro** soit **in-vivo**.

VIII - 1 - 1 : Contamination in-vitro

La contamination artificielle des coquillages est effectuée **in-vitro** :

- soit par injection directe de la suspension virale dans le **tube digestif** (KOSTENBADER et CLIVER - 1972) ou dans la glande digestive (METCALF *et al.* - 1980),

- soit par contact entre la suspension virale et les tissus du coquillage.

Pour certains auteurs, aucune condition particulière n'est requise : pour l'adsorption des virus sur les tissus, LEWIS ET METCALF (1988) proposent un contact de 30 à 60 minutes à température ambiante, et CROCI *et al.* (1984) une nuit

à 4°C. Toutefois, l'influence du pH et de la conductivité sur l'adsorption des entérovirus sur les broyats de tissus de coquillages, a été mise en évidence par SOBSEY *et al.* en 1978. Ces deux paramètres sont contrôlés dans la plupart des protocoles expérimentaux recensés (Tableau 9).

Coquillages	Masse de tissus contaminée	Quantité de virus inoculée	pH d'adsorption	Dilution des tissus	Salinité (mg NaCl/l)	% de virus adsorbés	Références
Huîtres	100 à 400 g	poliovirus adénovirus réovirus (10 ⁵ UFP)	5	N.C.	≤ 2000	99 % 99 % 99 %	SOBSEY <i>et al.</i> (1978)
Coques	100 g	poliovirus (5.10 ⁷ UFP)	5	1/7	≤ 2000	N.C.	JOHNSON <i>et al.</i> (1981)
Huîtres	25 g	poliovirus (10 ⁵ UFP)	6	1/1	2000	50 %	FINANCE <i>et al.</i> (1981)
Moules	25 g	poliovirus (10 ⁵ UFP)	4 - 7	1/1	2000	65 %	
Huîtres	100 g	poliovirus (25 à 100 UFP)	4,8	1/1,5	N.C.	N.C.	SULLIVAN <i>et al.</i> (1984) TIERNEY <i>et al.</i> (1985)
Huîtres	20 à 40 g	poliovirus (2.10 ⁵ UFP)	4,8	1/3	≈ 4000	95 %	SPEIRS <i>et al.</i> (1987)
		rotavirus (2.10 ⁵ UFP)	4,5	1/10 (eau distillée + 0,2 % lait écrémé)	≈ 1800	59 %	

UFP : Unités Formant Plages

N.C.: non communiqué

Tableau 9 : Méthodes d'adsorption des virus sur les tissus de coquillages in-vitro

Les résultats obtenus démontrent que ces méthodes de contamination artificielle des tissus sont d'une efficacité très moyenne (50 à 99 % d'adsorption virale). Il faut cependant remarquer que la quasi-totalité des expérimentations a été réalisée à l'aide de poliovirus et qu'il est dangereux d'extrapoler les résultats à d'autres modèles viraux. Ainsi, SPEIRS *et al.* (1987) ont montré qu'aucun rotavirus n'est adsorbé sur les tissus d'huîtres, si on procède selon le même protocole que celui utilisé pour le poliovirus. L'adsorption maximale des rotavirus (59 %) est obtenue à pH 4,5 après dilution des tissus au 1/10 dans l'eau distillée additionnée de 0,2 % de lait écrémé.

Ces techniques de contamination in-vitro sont très éloignées des mécanismes physiologiques, régissant les processus d'adsorption et de rétention des virus dans les coquillages en milieu naturel.

VIII - 1 - 2 : Contamination in-vivo

La contamination in-vivo est en général réalisée en immergeant les coquillages dans de l'eau de mer naturellement ou artificiellement contaminée par une quantité connue de virus. L'absorption virale s'effectue alors d'une manière physiologique lors de l'activité de nutrition : les coquillages filtrent de grands volumes d'eau à partir desquels ils retiennent des particules en suspension et par là-même les virus présents.

La plupart des expériences d'accumulation virale ont lieu dans des conditions contrôlées de température (entre 10 et 20° C), de salinité (entre 21 et 30 ‰), de pH (entre 7 et 8,5) et avec aération (de façon à obtenir une concentration en O₂ dissous supérieure à 60 % de la saturation), dans le but d'optimiser la nutrition des mollusques. En effet, le taux de filtration conditionne le taux d'accumulation des virus.

Lors des contaminations expérimentales, les virus sont souvent volontairement associés à un support particulaire, dans le but de se rapprocher le plus possible des conditions existantes dans le milieu naturel et ainsi d'accroître l'activité de filtration et par voie de conséquence la rétention virale. Ainsi les virus peuvent être associés à des fèces, des grains d'amidon (LARKIN et METCALF - 1980) ou des particules d'argile (METCALF *et al.* - 1980). BARON (1986) propose l'utilisation d'algues unicellulaires comme support des particules virales. Parfois, l'eau de mer est contaminée par des effluents bruts d'eaux usées, qui assurent simultanément l'apport de matières organiques et des virus associés (JOHNSON *et al.* - 1981).

Les temps de séjour des coquillages dans l'eau contaminée sont très variables selon les auteurs : 1 heure (SCHWARTZBROD *et al.* - 1987 ; GAILLOT *et al.* - 1988 ; 4 à 6 heures (LARKIN et METCALF - 1980), 18 à 24 heures (VAUGHN *et al.* - 1979 ; LANDRY - 1980), 24 heures (JOHNSON *et al.* - 1981), 48 à 72 heures (BEMISS *et al.* - 1989)...

Ce temps de séjour permet d'éliminer les organismes affaiblis et de disposer d'un lot de coquillages présentant une contamination jugée homogène.

En réalité, dans toute expérience de contamination, il faut tenir compte de variations dans l'activité de filtration des individus, entre eux et au cours du temps (LANDRY *et al.* 1982). Il existe des écarts considérables dans les capacités de bioaccumulation selon les individus. Ainsi, METCALF *et al.* (1980) ont obtenu, après une stabulation de 2 à 4 heures, des contaminations de clams variant de 0 à 13 poliovirus par individu.

Il apparaît donc souhaitable, pour évaluer un taux de contamination, de choisir des individus au hasard, parmi ceux qui sont actifs, et de faire l'analyse sur un homogénat de plusieurs bivalves, plutôt que de les traiter un par un.

VIII - 2 - L'ANALYSE VIROLOGIQUE DES COQUILLAGES

L'analyse virologique est, en général, effectuée sur une prise d'essai comprise entre 50 et 100 g de tissu.

Le protocole d'analyse comprend 6 étapes principales :

1. l'extraction-élution des virus à partir des tissus,
2. la clarification de l'éluat,
3. la concentration des virus sous un faible volume,
4. la détoxification des concentrats,
5. la décontamination des concentrats,
6. la mise en évidence et la quantification des virus.

VIII - 2 - 1 : Extraction-élution des virus à partir des tissus

Dans le milieu naturel, les virus sont adsorbés sur les tissus ou retenus dans le tractus digestif des coquillages grâce à des interactions électrostatiques et hydrophobes (CLIVER *et al.* - 1983).

La première étape de la recherche des virus dans les coquillages consiste à rompre ces liaisons virus-tissus et à libérer ainsi les particules virales de leur

support. A cette fin, on utilise généralement des solutions éluantes alcalines, qui, en modifiant les conditions du milieu (apport d'ions, variation de pH), entraînent l'inversion du potentiel de charge des particules virales et ainsi permettent leur libération dans la phase liquide.

Les solutions éluantes utilisées sont, dans la plupart des cas, des solutions tamponnées, de pH alcalin, enrichies en protéines (afin de favoriser la compétition virus-protéines pour les sites d'adsorption) et en sels minéraux (pour éviter l'inactivation des virus et favoriser la dispersion moléculaire) (BARON - 1985).

SOBSEY *et al.* (1978) ont montré que les virus sont efficacement désorbés des tissus, lorsque la conductivité de la solution éluante est élevée. Aussi, la concentration saline des principales solutions est-elle supérieure ou égale 8000 mg de NaCl/l.

Les solutions les plus souvent rencontrées dans la littérature sont :

- les tampons glycine

Ils sont utilisés à des molarités et des pH différents selon les auteurs:

- glycine 0,05 M, NaCl 0,15M, pH7,5 (SOBSEY *et al.* - 1978),
- glycine 0,05 M, NaCl 0,15M, pH9,5 (JOHNSON *et al.* - 1981),
- glycine 0,05 M, NaCl 0,14M, pH8 (WEST et WILLIAMS - 1988),
- glycine 0,05 M- 10% TPB (bouillon tryptose phosphate), pH9 (LEWIS et METCALF - 1988),
- glycine 0,2 M, pH9,5 (BEMISS *et al.* - 1989).

- les tampons phosphate

- tampon phosphate (PBS) - 3 % d'extrait de boeuf pH 9 (METCALF *et al.* - 1980)
- tampon phosphate (PBS) pH 7,2 (CROCI *et al.* - 1984)

D'autres éluants ont été proposés, tels que de l'eau déminéralisée ajustée à pH9 par NaOH (FINANCE *et al.* - 1981 ; SPEIRS *et al.* - 1987), du Minimum Essential Medium (MEM) - lait écrémé - MgCl₂ pH9 (SULLIVAN *et al.* - 1984), du tampon borate - 3% d'extrait de boeuf pH9 (BIZIAGOS *et al.* - 1989)...

Le volume du liquide d'éluion varie selon les auteurs de 1 à 10 fois la masse initiale de tissus.

L'extraction est effectuée sous homogénéisation et agitation pendant 10 à 15 minutes et est parfois associée à une ultrasonication (METCALF *et al.* - 1980 ; BIZIAGOS *et al.* - 1989). Ce dernier traitement permet une meilleure dissociation des liaisons virus-tissus et d'éventuels agrégats de particules virales.

VIII - 2 - 2 : Clarification de l'éluat

L'éluat obtenu précédemment est fortement chargé en matières en suspension. Il est indispensable de le clarifier, de façon à éliminer ces matières en suspension ainsi que les débris de tissus et à conserver la phase aqueuse, qui contient les virus.

L'efficacité d'une méthode de clarification est évaluée en fonction de l'abaissement de la turbidité de l'échantillon et du temps nécessaire à sa mise en oeuvre.

Les principales techniques employées sont la centrifugation, la filtration et la floculation.

VIII - 2 - 2 - 1 : Centrifugation

Les vitesses et durées de centrifugation sont variables selon les auteurs :

- 10000 g - 15 min (METCALF *et al.* - 1980)
- 12000 g - 30 min (SULLIVAN *et al.* - 1982)
- 10440 g - 15 min (RICHARDS *et al.* - 1982)
- 1500 g - 10 min (BARON - 1986)
- 10410 g - 15 min (BEMISS *et al.* - 1989)

Cette méthode de clarification est efficace et présente, en outre, l'avantage de la simplicité associée à la rapidité d'application.

VIII - 2 - 2 - 2 : Filtration

Différents supports sont utilisés pour la filtration des éluats :

TIERNEY *et al.* (1980) réalisent une filtration sur laine de verre prétraitée par du tampon Tricine, tandis que CROCI *et al.* (1984) procèdent à une filtration sur gaze hydrophile.

SOBSEY *et al.* (1978) proposent une clarification par filtration à travers des membranes en fibre de verre (Millipore AP25 puis Cox 0,45 μm de porosité). Ils constatent une rétention maximale sur les filtres de 1% pour le poliovirus et de 13% pour les réovirus et adénovirus.

Les méthodes de clarification par filtration occasionnent donc une perte de virus mais de plus elles sont lentes et limitées par le risque de colmatage des membranes.

II - 2 - 2 - 3 : Floculation

Les méthodes par floculation visent non seulement à éliminer les matières en suspension, mais aussi à supprimer ou à réduire la toxicité des éluats de coquillages, sans entraîner de perte virale.

2 techniques sont très répandues : la technique au Fréon et la technique avec un flocculant cationique (Cat-Floc).

Technique au Fréon

Le Fréon TF (trichloro-trifluoro-éthane) est utilisé en tant que solvant des lipides et agent de rupture des liaisons entre les virus et leur support.

Les quantités de Fréon ajoutées au liquide d'élution sont variables. Ainsi, SULLIVAN *et al.* (1984) l'utilisent dans la même proportion que le tampon éluant (v/v), tandis que BEMISS *et al.* (1989) préconisent un rapport de 1/3 entre la masse de tissus et le volume de Fréon.

Lorsque l'on procède à l'homogénéisation du mélange, il y a formation d'un gel emprisonnant les débris tissulaires. Ce gel est ensuite soumis à une centrifugation à l'issue de laquelle le Fréon et les débris forment le culot alors que les virus sont présents dans le surnageant qui est alors recueilli.

Technique du flocculant cationique

KOSTENBADER et CLIVER ont proposé, dès 1972, l'utilisation d'un polyélectrolyte cationique dans le but de flocculer les solides en suspension dans les extraits de coquillages et ainsi, de favoriser la clarification et l'élimination de la toxicité.

Parmi plusieurs flocculants testés, le Cat-Floc (chlorure de polydiallyldiméthylammonium) donne des résultats satisfaisants. Ce polyélectrolyte cationique (PM \approx 500 000) est largement utilisé dans les différentes méthodes d'analyse virologique des coquillages.

Le Cat-Floc est ajouté dans une faible proportion à l'éluat final (0,01 % à 0,5%). Après homogénéisation, le floc est éliminé par centrifugation (VAUGHN *et al.* - 1987 ; RICHARDS *et al.* - 1982 ; SPEIRS *et al.* - 1987). Le surnageant contenant les virus est, soit utilisé dans l'état, soit soumis à une filtration sur fibre de verre (LANDRY *et al.* - 1980).

Les méthodes de clarification de l'éluat par floculation sont efficaces, mais nécessitent une étape supplémentaire de centrifugation. Elles sont de moins en moins utilisées.

VIII - 2 - 3 : Concentration des virus

Le volume de l'éluat clarifié est, dans la plupart des cas, trop important (50 à 500 ml) pour être inoculé en totalité sur un système cellulaire sensible. Une étape de concentration s'avère indispensable pour obtenir les virus présents dans l'éluat sous un très faible volume.

Les techniques de concentration les plus souvent décrites sont :

- l'hydroextraction,
- l'ultrafiltration,
- l'ultracentrifugation,
- la précipitation.

VIII - 2 - 3 - 1 : Hydroextraction

Cette méthode consiste à réduire la quantité d'eau présente dans l'échantillon par la dialyse. En effet, un sac de dialyse contenant une suspension virale immergé dans une phase hydrophile de haut poids moléculaire (polyéthylène glycol) laisse passer les molécules d'eau et retient les particules virales. La membrane de dialyse a une porosité définie, qui permet la rétention des particules virales, tout en étant perméable aux substances de faible masse moléculaire. Le matériel restant dans le sac de dialyse après l'hydroextraction est remis en suspension dans un faible volume de solution isotonique tamponnée. Cette suspension constitue l'éluat final prêt à être inoculé sur systèmes sensibles.

Cette méthode a été employée par TIERNEY *et al.* (1980) pour la concentration d'éluats d'huîtres et de palourdes.

Elle présente l'inconvénient d'être longue à réaliser, et s'applique donc préférentiellement à de faibles volumes d'éluats clarifiés.

VIII - 2 - 3 - 2 : Ultrafiltration

L'ultrafiltration est une technique membranaire permettant de séparer par tamisage des molécules de tailles différentes dans une solution. Il est donc possible de récupérer les particules virales dans un rétentat ou à la surface d'un filtre, dont le diamètre des pores est inférieur à celui des virus (poids moléculaire seuil le plus souvent compris entre 10^4 et 10^5) (JANSONS et BUCENS - 1986).

L'ultrafiltration sur fibres creuses est largement répandue. Toutefois, l'efficacité de cette méthode de concentration est très variable en fonction du type de membrane (plus ou moins grande exclusion moléculaire, surface filtrante totale) et du degré de clarification de l'extrait de coquillages.

Ainsi, avant de procéder à une ultrafiltration, il est souhaitable de réaliser une pré-filtration de l'éluat sur une membrane de porosité $0,45 \mu\text{m}$, pour éliminer une grande partie des macromolécules et des bactéries (SOBSEY *et al.* - 1978). Le rétentat obtenu à l'issue de l'ultrafiltration est récupéré par un faible volume de milieu pour cultures cellulaires (KOSTENBADER et CLIVER - 1972).

Cette méthode est longue à réaliser et limitée par les risques de colmatage des membranes.

VIII - 2 - 3 - 3 : Ultracentrifugation

L'ultracentrifugation repose sur la capacité de sédimentation des virus selon leur masse. Une forte accélération centrifuge permet une récupération efficace des virus.

FINANCE *et al.* (1981) ont obtenu une récupération des virus supérieure à 92 % après ultracentrifugation de l'éluat à 195 400 g pendant 4 heures.

SPEIRS *et al.* (1987) ont noté que les techniques d'ultrafiltration et d'ultracentrifugation (116 000 g - 90 min) permettent des taux de récupération de l'ordre de 47 % de rotavirus.

Si cette technique donne de bons résultats, il faut cependant signaler d'une part qu'après l'ultracentrifugation, le culot obtenu est difficile à remettre en suspension et la cytotoxicité des concentrats obtenus est importante.

VIII - 2 - 3 - 4 : Précipitation

Les virus étant des nucléo-protéines, ils présentent, de ce fait, des analogies étroites de comportement avec les protéines et, les méthodes de concentration par précipitation se fondent sur leurs propriétés de floculation (réversible en fonction du pH) et sur des caractéristiques de surface (charge, hydrophobicité).

2 techniques sont fréquemment utilisées en virologie des coquillages:

- la floculation organique (précipitation acide),
- la précipitation par le polyéthylène glycol (PEG).

a) Floculation organique

Cette méthode a été proposée en 1976 par KATZENELSON *et al.* pour la concentration des virus à partir d'échantillons d'eau. Elle ne peut s'appliquer qu'aux éluats enrichis en protéines.

L'éluat protéique (où enrichi en protéines) clarifié, est amené à pH acide à l'aide d'HCl, ce qui provoque la formation d'un précipité protéique dans lequel les virus sont emprisonnés. Le floc est récupéré par centrifugation puis dissous dans

un faible volume de solution tamponnée, de pH neutre ou alcalin.

- LANDRY *et al.* (1980) préconisent une floculation organique à pH 3,5 après addition de 6 % d'extrait de boeuf à l'éluat (solution éluante : glycine 0,09 M),
- SPEIRS *et al.* (1987) pratiquent une précipitation à pH 4,8 avec ajout de 1,5 % d'extrait de boeuf à l'éluat (solution éluante : eau distillée),
- WEST et WILLIAMS (1988) procèdent à une précipitation directe (sans ajout de support protéique) à pH 4,5. La seule fraction protéique est celle de l'huître présente initialement (solution éluante : glycine 0,05 M).

Différents auteurs ont comparé l'efficacité de la floculation organique à celle d'autres méthodes de concentration :

SOBSEY *et al.* (1978) rapportent des résultats analogues avec l'ultrafiltration et la floculation organique (50 % de récupération virale), mais préconisent la seconde méthode pour sa simplicité de mise en oeuvre.

De même, SPEIRS *et al.* (1987) obtiennent la même récupération de poliovirus ($\approx 80\%$) par ultrafiltration, ultracentrifugation et floculation organique. Toutefois, cette dernière méthode se révèle la moins efficace pour la concentration des rotavirus. Il est probable que ceux-ci soit, ne précipitent pas avec la matière organique et restent dans le surnageant, soit et plus vraisemblablement sont plus sensibles que les autres virus aux variations de pH intervenant dans ce mode de concentration (STRAPPE - 1991 ; IDEMA *et al.* - 1991).

b) Précipitation par le polyéthylène glycol (PEG 6000)

Le PEG est un polymère synthétique hydrophile, non toxique, qui, dans des conditions définies de pH, de salinité et de concentration permet la précipitation des protéines (ATHA et INGHAM - 1981).

Les bases moléculaires de la précipitation des protéines par le PEG sont mal définies : le PEG séparerait les protéines de leur solvant aqueux, jusqu'à ce qu'elles ne soient plus en solution et précipitent. Cette précipitation peut être affectée par la taille des protéines, la concentration ionique initiale de la solution, etc...

LEE et LEE (1981) suggèrent, que la charge des protéines produit un effet thermodynamique défavorable sur le PEG solubilisé, entraînant l'exclusion de

celui-ci de la zone protéique. Ainsi, à des concentrations appropriées du polymère, il y aurait précipitation ou cristallisation des protéines, les plus fortement chargées ou hydrophobes précipitant le plus rapidement.

Cette technique est donc applicable à la concentration des virus par co-précipitation. Les méthodes de purification et de concentration par le PEG sont rapides et non-agressives pour les virus (PHILIPSON *et al.* - 1960). Le PEG 6000 est en général utilisé à cette fin.

Le PEG 6000 est ajouté à l'éluat jusqu'à obtention de la concentration optimale pour la précipitation des virus. Ce taux est déterminé expérimentalement en fonction du virus recherché. Après un temps de contact compris entre 1 et 18 heures pour permettre la formation de liaisons intermoléculaires, le mélange est centrifugé et le culot protéique recueilli est solubilisé dans un faible volume de solution tampon.

Les travaux de LEWIS et METCALF (1988) ont montré que le virus de l'hépatite A et le rotavirus humain Wa étaient efficacement concentrés avec des quantités respectives de 6 et 7 % de PEG 6000 en volume final. Le choix de 8 % permettait la récupération de 97 % de virus de l'hépatite A et de rotavirus simien SA11, de 40 % de rotavirus humain Wa et de 105 % de poliovirus.

BIZIAGOS (1989) procède à 2 précipitations successives du virus de l'hépatite A par 10 % de PEG 6000 en volume final. Il obtient une récupération moyenne de 65 à 80 %.

Cette méthode apparaît plus efficace que la floculation organique pour la concentration du virus de l'hépatite A et des rotavirus, mais n'est pas significativement plus performante pour la concentration du poliovirus. Elle présente l'avantage de ne nécessiter aucune variation de pH et s'avère ainsi moins drastique que la floculation organique pour les virus. En outre, cette technique est applicable à des échantillons contenant peu de matières organiques et aucun apport protéique n'est nécessaire. Il n'y a donc pas addition de facteurs supplémentaires de cytotoxicité.

Quelle que soit la technique utilisée, le concentrat obtenu a, dans la plupart des cas, un faible volume (environ 10 fois inférieur au volume initial de l'éluat).

Ces concentrats présentent souvent une cytotoxicité qui peut être attribuée à de nombreuses causes, parmi lesquelles : la nature du coquillage analysé, la charge protéique du concentrat final, la présence de substances toxiques etc...

Lorsque la recherche des virus est réalisée par inoculation du concentrat sur cultures cellulaires, leur mise en évidence est souvent entravée par ces phénomènes de cytotoxicité. Cela se traduit par une destruction cellulaire ou une diminution de la sensibilité aux virus et dans tous les cas, elle conduit à une sous-estimation du titre viral.

Afin d'améliorer l'efficacité des protocoles d'extraction-concentration, il convient donc de réduire ou d'éliminer cette toxicité.

VIII - 2 - 4 : Détoxification des concentrats

La méthode de détoxification la plus répandue consiste à diluer le concentrat dans du milieu nutritif ou une solution saline tamponnée mais diverses techniques de détoxification, sont proposées dans la littérature.

Ainsi des agents de clarification tels que le Fréon (TIERNEY *et al.* - 1980) ou le Cat-Floc (METCALF *et al.* - 1980 ; SULLIVAN *et al.* - 1982-1984 ; TIERNEY *et al.* - 1985) sont souvent ajoutés en phase finale de concentration. Ces méthodes nécessitent une étape ultérieure de centrifugation pour éliminer ces agents floculants.

D'autres protocoles de détoxification font appel à une filtration à travers un gel de billes de dextran, mais aucun n'a été appliqué aux coquillages.

La filtration à travers un gel de Sephadex LH20 (préparé à 22 % dans du tampon phosphate) qui permet de retenir des particules dont le poids moléculaire est inférieur à 4000 , a ainsi été proposée. Ce procédé a été utilisée par AGBALIKA (1986) pour clarifier une suspension de selles contenant du virus de l'hépatite A.

QUERO *et al.* (1984) ont procédé de la même façon pour éliminer des molécules toxiques contenues dans des produits désinfectants.

ORAGUI et MARA (1989) ont, par ailleurs, proposé une détoxification d'ultrafiltrats d'eaux usées par mélange avec des billes de Sephadex G50 (porosité 25000) ou avec un gel de polyacrylamide. Ils ont ainsi obtenu une élimination ou une réduction de la toxicité supérieure à 80 %.

VIII - 2 - 5 : Décontamination des concentrats

Avant son inoculation sur cultures cellulaires, le concentrat, détoxifié ou non, qui est souvent très riche en micro-organismes, doit subir une décontamination bactérienne et fongique. Ceci est réalisé, soit par traitement à l'éther ou au chloroforme, soit par addition d'antibiotiques et d'antifongiques, soit par filtration sur membrane stérilisante. Cette dernière méthode est, d'après METCALF *et al.* (1980), très efficace mais entraîne une perte virale d'environ 30 %.

Le traitement par l'éther ou le chloroforme (solvants des lipides) est applicable à condition de ne pas rechercher de virus enveloppés et nécessite l'élimination totale de toute trace de solvant, toxique pour les cellules (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1982).

La technique efficace la plus couramment employée est l'addition d'un mélange d'antibiotiques et d'antifongiques (pénicilline, streptomycine, néomycine, gentamicine, amphotéricine...) dans le concentrat, à des doses non toxiques pour les cellules.

VIII - 3 : MISE EN EVIDENCE DES VIRUS ENTERIQUES A PARTIR DES COQUILLAGES

Les virus susceptibles d'être transmis par les coquillages sont essentiellement des virus entériques. Jusqu'à présent, les analyses ont surtout porté sur la recherche des entérovirus, des rotavirus, et des adénovirus, qui sont isolés sur cultures cellulaires.

Malheureusement, cette méthode ne permet ni la recherche des virus de l'hépatite A et E ni celle des virus des gastro-entérites, en particulier du virus de Norwalk. Ces virus, soit ne se répliquent pas (Norwalk), soit se multiplient très peu et très lentement (hépatite) en cultures cellulaires.

Il est donc nécessaire d'appliquer des méthodes de détection faisant appel à l'observation en microscopie électronique, à l'immunologie ou à l'hybridation moléculaire pour la recherche de ces virus.

VIII - 3 - 1 : Mise en évidence des virus entériques sur cultures cellulaires

Une culture cellulaire "in-vitro" est un système dans lequel des cellules placées dans un environnement artificiel sont capables de se multiplier sans conserver l'organisation structurale du tissu de départ (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1982).

Pour la recherche de virus entériques à partir des coquillages, on utilise généralement des cellules de primates en lignées établies, qui ont la particularité de pouvoir être entretenues et subcultivées à 37°C indéfiniment.

Parmi les très nombreuses lignées cellulaires proposées dans la littérature, il faut citer :

les lignées d'origine simienne :

- cellules VERO, BGM, MA 104 (rein de singe).

les lignées d'origine humaine :

- cellules Hela (cancer du col de l'utérus),
- cellules KB (cancer de la peau),
- cellules RD (rhabdomyosarcome),
- cellules Hep 2 (carcinome du larynx).

Les cellules en culture ne présentent pas toutes la même sensibilité aux virus. Ainsi, les lignées cellulaires les plus fréquemment utilisées pour la recherche des virus dans les coquillages sont la lignée BGM, qui est adaptée à l'isolement de nombreux Entérovirus (virus poliomyélitiques, Coxsackie B, E.C.H.O.) et la lignée MA 104, qui permet, en outre, la bonne réplique des Rotavirus.

La multiplication virale sur culture cellulaire, quand elle a lieu, peut, soit se traduire par des lésions du tapis cellulaire (effet cytopathique en milieu liquide ou plage de lyse en milieu gélosé), soit ne provoquer aucune atteinte cellulaire visible.

VIII - 3 - 1 - 1 : Virus provoquant des lésions cellulaires

La plupart des Entérovirus (virus poliomyélitiques, E.C.H.O., Coxsackie B et certains sérotypes de Coxsackie A), à l'exception du virus de l'hépatite A, se répliquent bien en culture cellulaire en provoquant un effet cytopathique (E.C.P.). La recherche des virus sur culture cellulaire comporte 4 étapes :

- l'inoculation de l'échantillon,
- l'observation de l'E.C.P.,
- l'identification du virus isolé,
- la quantification.

a) Inoculation de l'échantillon sur cultures cellulaires

Pour permettre l'isolement d'un nombre maximum de virus, il est recommandé d'inoculer plusieurs types cellulaires en série, en parallèle ou sur un mode séquentiel (CHONMAITREE *et al.* - 1988 ; BENTON et HURST - 1990).

Des tapis de cellules confluentes sontensemencés avec l'échantillon à analyser. Les virus présents dans l'échantillon s'adsorbent sur des récepteurs spécifiques cellulaires puis pénètrent dans les cellules sensibles à l'intérieur desquelles se réalise la réplication du virus. Les durées d'incubation sont variables (1 à 12 jours) et définies en fonction des techniques d'isolement et du virus recherché.

La multiplication virale conduit à la libération des virions néoformés dans le milieu extracellulaire et à la lyse des cellules infectées. Les virus néoformés vont, de proche en proche, infecter les autres cellules du tapis et finalement entraîner sa destruction complète (E.C.P.).

Lors de l'isolement en milieu liquide, les particules virales libérées se dispersent sur tout le tapis cellulaire, tandis que sous couverture gélosée, celles-ci ne peuvent infecter que les cellules adjacentes à la cellule infectée, formant ainsi des plages de lyse.

Un résultat jugé positif, uniquement à l'observation d'un E.C.P., doit toujours être confirmé par une subculture ou une 2ème analyse.

En effet, l'échantillon testé peut présenter une toxicité ou une contamination bactérienne induisant une destruction cellulaire non-spécifique.

b) Observation de l'E.C.P.

L'observation de l'E.C.P. est tout d'abord réalisé à l'état frais (E.C.P. en milieu liquide ou plages de lyse en milieu gélosé), ensuite après fixation et coloration des cellules.

- Observation à l'état frais

Selon le type de virus infectant, la destruction cellulaire est plus ou moins rapide et la dégénérescence cellulaire caractéristique (état des cellules, tendance à l'individualisation ou à la formation de syncytiums, aspect des plages de lyse...).

Ainsi les virus poliomyélitiques provoquent une rapide destruction cellulaire entre 24 et 72 heures. En milieu liquide, les cellules apparaissent arrondies et réfringentes. Sous couverture gélosée, les plages de lyse sont à contours bien délimités. En revanche, les E.C.P. et les plages de lyse observés avec les virus Coxsackie et E.C.H.O. sont plus tardifs (4 à 12 jours) et la destruction cellulaire est moins massive.

- Observation après coloration

Pour orienter l'identification, il est nécessaire de procéder à la coloration des cellules infectées par les virus, pour mettre en évidence la présence de lésions et de modifications intracellulaires spécifiques. On utilise généralement une coloration à l'hématoxyline-éosine, qui colore le cytoplasme des cellules en rose, le noyau en bleu violacé et les nucléoles en rouge (PAYMENT et TRUDEL - 1989).

Ainsi, des cellules infectées par un Entérovirus présentent une grosse inclusion intra-cytoplasmique éosinophile, qui refoule le noyau à la périphérie.

Cette observation des cellules à l'état frais et après coloration ne permet pas l'identification du virus responsable mais permet de réaliser un diagnostic d'orientation.

c) Identification du virus isolé

Pour identifier précisément le virus isolé, il est fait appel à des techniques immunologiques (inhibition de l'hémagglutination, inhibition de l'hémadsorption, séroneutralisation...) parmi lesquelles la séroneutralisation de l'E.C.P. est la plus utilisée.

Cette méthode est fondée sur une réaction entre le virus inconnu et une batterie d'anticorps de spécificité connue.

Le virus à identifier est dans un premier temps mis en présence d'antisérums connus. Si le virus correspond aux anticorps proposés dans la réaction, il y a formation de complexes antigènes-anticorps et le virus est neutralisé. Cependant, cette neutralisation ne se traduit pas par un phénomène visible et il est nécessaire de procéder à une révélation.

Aussi, le mélange sérum-virus, obtenu à l'issue de la phase immunologique précédente est, dans un 2ème temps, inoculé sur cultures cellulaires puis incubé pendant 3 jours à 37°C. Si aucun E.C.P. n'est observé, cela signifie que le virus n'a pas pu se multiplier et qu'il a donc été neutralisé par les anticorps employés lors de la phase immunologique de la réaction. L'identité du virus est ainsi indiquée.

d) Quantification

La détermination du titre infectieux d'un virus est effectuée par une méthode de numération soit de type énumératif (comptage des lésions cellulaires), soit de type quantique (comptage des résultats positifs par rapport au nombre total d'inoculations).

La méthode énumérative est bien adaptée, par exemple, à la technique d'inoculation en milieu gélosé : le titre du virus en unités formant plages (U.F.P.) est calculé par comptage des plages, corrigé par le facteur de dilution et ramené au volumeensemencé.

Cette méthode est utilisable également pour le titrage de virus par immunofluorescence sur cultures cellulaires ; le titre viral est alors exprimé en Foci de Fluorescence (F.F.)

La méthode quantique est applicable à la plupart des techniques d'inoculation. Elle est souvent utilisée au cours de la mise en évidence des virus sur cultures cellulaires en milieu liquide, mais peut parfaitement être employée avec la méthode d'inoculation en milieu gélosé.

Le titre du virus est calculé par une formule mathématique en fonction du nombre de tapis cellulaires inoculés, du nombre de tapis infectés et du facteur de dilution (CHANG *et al.* - 1958 ; WYSHAK et DETRE - 1972 ; HUGUES - 1981). Les méthodes de la dose cytopathique 50% (DCP50), le nombre le plus probable

d'unités cytopathiques (NPPUC), ainsi que la méthode de Fisher (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1982) sont des techniques de type quantique.

VIII - 3 - 1 - 2 : Virus ne provoquant pas de lésions cellulaires

Parmi les virus isolés à partir des coquillages, certains, tels que les Rotavirus se multiplient sur cultures cellulaires mais provoquent un E.C.P. inconstant. Ainsi, leur mise en évidence se fait généralement par inoculation sur cultures cellulaires associée à une révélation à l'aide d'une technique immunologique, réalisée in situ.

La recherche de ces virus comporte 3 phases :

- une phase d'inoculation de l'échantillon à tester sur la culture cellulaire,
- une phase d'incubation, de durée variable, pendant laquelle ont lieu la fixation, la pénétration et la multiplication virale intracellulaire.
- une phase de révélation de cette multiplication virale grâce à une technique immunologique, qui consiste à faire réagir un antiserum anti-rotavirus directement sur les tapis cellulaires infectés, après fixation. Les anticorps anti-rotavirus se lient de façon spécifique aux protéines virales intracellulaires produites pendant l'incubation. Ce complexe antigène-anticorps est révélé et quantifié par addition d'anticorps spécifiques conjugués à un fluorochrome (technique d'immunofluorescence indirecte (SMITH et GERBA - 1982 ; PATTI *et al.* - 1990) ou à une enzyme (technique d'immunoperoxydase indirecte (GENTHE *et al.* - 1991).

Cette méthode, dont la sensibilité est équivalente à celle des E.C.P., est toutefois plus rapide (24 à 48 heures) et plus spécifique. Elle présente, en outre, l'avantage de permettre simultanément l'isolement et l'identification du virus.

En conclusion et en ce qui concerne la mise en évidence des virus sur cultures cellulaires, il apparaît que ces méthodes sont soumises à des facteurs de variabilité, tels que l'état des cellules, la nature de l'inoculum (turbidité, texture plus ou moins fibreuse), et l'éventuelle toxicité des échantillons.

L'interprétation des résultats de l'analyse doit être prudente. Quelle que soit la technique de détection sur culture cellulaire utilisée, la sensibilité n'est pas absolue. En effet, les virus ne sont probablement pas tous "disponibles" pour infecter les tapis cellulaires, et de plus, la toxicité des concentrats entraîne, le plus souvent, une destruction cellulaire très rapide masquant toute multiplication virale.

- l'espèce du coquillage analysé (BEMISS *et al.* - 1989)

- le type de virus recherché :

Pour une méthode donnée, il est en effet possible d'observer des rendements de récupération très différents selon que l'on s'adresse par exemple à un poliovirus ou un rotavirus. Avec ce dernier virus, les rendements sont souvent plus faibles, sans doute parce qu'il est plus sensible aux conditions plus ou moins drastiques des protocoles analytiques. (IDEMA *et al.* - 1991).

- la complexité du protocole d'analyse :

La multiplication des étapes dans le traitement de l'échantillon conduit à l'augmentation de la perte virale à chaque niveau (TOWNSEND-COLE *et al.* - 1986)

- la technique de mise en évidence :

Cultures cellulaires (quantité de concentrat inoculée, temps d'incubation, mode de quantification...) (CLIVER *et al.* - 1983), méthodes immunologiques...

On peut remarquer que les méthodes d'extraction-concentration et de détection des virus à partir des coquillages ont rarement été soumises à des tests interlaboratoires, qu'aucune n'est privilégiée au niveau international et que peu d'entre-elles ont été évaluées pour la recherche du virus de l'hépatite A, pourtant largement impliqué dans les épidémies liées à la consommation de coquillages.

Tableau 10 : Rendement de différentes méthodes d'extraction-concentration des virus à partir de coquillages artificiellement contaminés

COQUILLAGE	VIRUS	QUANTITE DE VIRUS AJOUTES (U.F.P.)	ELUTION	CLARIFICATION	CONCENTRATION	RENDEMENT GLOBAL DE LA METHODE (% de récupération)	REFERENCES
Huitres (<i>Crassostrea virginica</i>)	Poliovirus 1	15 à 134 / 15 à 45 g 74 à 162 / 67 à 100 g	tampon glycine pH 7,5 (1 volume)	centrifugation ou filtration sur fibre de verre 0,45 µm	ultrafiltration	47 %	SOBSEY <i>et al.</i> (1978)
	Réovirus 3	26 à 126 / 15 à 45 g			floculation organique à pH 4,5	48 %	
		3520 / 100 g			ultrafiltration	42 %	
	Adénovirus simien SV 11	17 à 472 / 15 à 45 g 2200 / 100 g			floculation organique à pH 4,5	54 %	
Huitres et Clams	Poliovirus 1 Coxsackie B3 Echovirus 7	10 / 100 g	tampon Tricine MgCl 2-DEAE dextran pH 9 (10 volumes)	Filtration sur laine de verre	hydroextraction	50 %	TIERNEY <i>et al.</i> (1980)
Clams (<i>Tapes japonica</i>)	Poliovirus 1	93 à 660 / 100 g	tampon glycine pH 9,5 + 0,5 % Cat-Floc	centrifugation 1500 g - 20 min	+ 6 % d'extrait de boeuf - floculation organique à pH 4	73 %	JOHNSON <i>et al.</i> (1981)
Huitres (<i>Crassostrea gigas</i>) Moules (<i>Mytilus edulis</i>)	Poliovirus 1	8 à 10 / 25 g	eau déminéralisée NAOH pH 9 (4 volumes)	centrifugation 3000 t/min 10 min	ultrafiltration	37 à 50 %	FINANCE <i>et al.</i> (1981)
		1 à 8 / 25 g			ultracentrifugation	75 à 90 %	
			ultrafiltration	37 à >100 %			
			ultracentrifugation	37 à 100 %			
Huitres (<i>Crassostrea virginica</i>)	Poliovirus 1	30 à 100 / 100 g	MEM + lait écrémé + MgCl2 + Fréon pH 9 (1 volume)	centrifugation 5000 g - 20 min	Floculation organique à pH 4,8	35 à 55 %	TIERNEY <i>et al.</i> (1985)

Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	Poliovirus 1	20 à 2000 / 30 à 100g	eau déminéralisée NAOH pH 8,9 + 0,5 % Cat-Floc (1 volume)	centrifugation 1800 g - 20 min	dilution au 1/4 avec eau + 0,2 % de lait écrémé - floculation organique à pH 4,5	79 %	SPEIRS <i>et al.</i> (1987)
	Rotavirus simien SA 11	20 à 2000 / 30 à 100g			ultracentrifugation	78 %	
Huîtres	Rotavirus humain Wa	N.C.	tampon glycine 10 % TPB pH 9 (7 volumes)	centrifugation 10000 g - 30 min	précipitation par PEG 6000 (8 % en volume final)	40 %	LEWIS et METCALF (1988)
	Rotavirus simien SA 11					97 %	
	Poliovirus 1 VHA					105 %	
Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>) Clams (<i>Mercenaria mercenaria</i>) Moules (<i>Mytilus edulis</i>) Mye (<i>Mya arenaria</i>) Huîtres (<i>Crassostrea virginica</i>)	Poliovirus 1	≈ 97 / 50 g	tampon glycine pH 9,5 (10 volumes) + Fréon + Cat-Floc	centrifugation 10410 g - 15 min	Floculation organique à pH 3,5	63,8 %	BEMISS <i>et al.</i> (1989)
		≈ 3120 / 50 g				48,3 %	
		≈ 1078 / 50 g				67,3 %	
		≈ 230 / 50 g				42,1 %	
		≈ 2400 / 50 g				10,1 %	
Huîtres	VHA	10 ⁶ TCID ₅₀ / 100 g	tampon borate 3 % d'extrait de boeuf pH 9 (1 volume)	centrifugation 10000 g - 45 min	2 précipitations successives par le PEG 6000 (10 % en volume final)	69,5 %	BIZIAGOS (1989)

MATERIEL ET METHODES

I - : MATERIEL

I - 1 : LES HUITRES

Les huîtres creuses (*Crassostrea gigas*) utilisées pour les expérimentations proviennent d'établissements expéditeurs de Marennes-Oléron (Charente-Maritime) ou de Guipavas (Finistère).

Elles ont subi un dégorgeement de 48 heures au minimum avant l'envoi et sont acheminées sur Nancy dans les 24 heures suivant leur émergence. Dès leur réception elles sont placées dans un aquarium de 280 ou de 800 litres d'eau de mer dans les locaux de l'aquarium tropical de Nancy. Elles y sont stockées dans cet aquarium pendant 4 jours minimum avant toute expérimentation. Cette période est nécessaire pour leur réadaptation à l'immersion.

I - 2 : LE STOCKAGE DES HUITRES

L'aquarium de stockage des huîtres (Figure 4) est rempli d'eau de mer reconstituée et équipé d'un dispositif d'aération en continu, et d'un système de recirculation permanente et de stérilisation de l'eau par rayonnement U.V.

La circulation d'eau s'effectue en permanence avec filtration à travers des blocs de polyéther de forme cubique. Une canalisation perforée récupère les eaux filtrées et les conduit jusqu'à la pompe de circulation (Figure 5)

L'eau de l'aquarium est maintenue entre 16° C et 18° C grâce à un système de réfrigération.

I - 3 : LES ALGUES UNICELLULAIRES

Des algues unicellulaires (*Dunaliella primolecta*) nous ont été fournies par le Dr Prieur (Université de Bretagne occidentale - Brest). Elles sont cultivées au laboratoire en ballons de 250 et 500 ml dans du milieu de Walne (annexe 1), constitué d'eau de mer reconstituée et stérilisée, complétée avec diverses solutions de métaux et de vitamines.

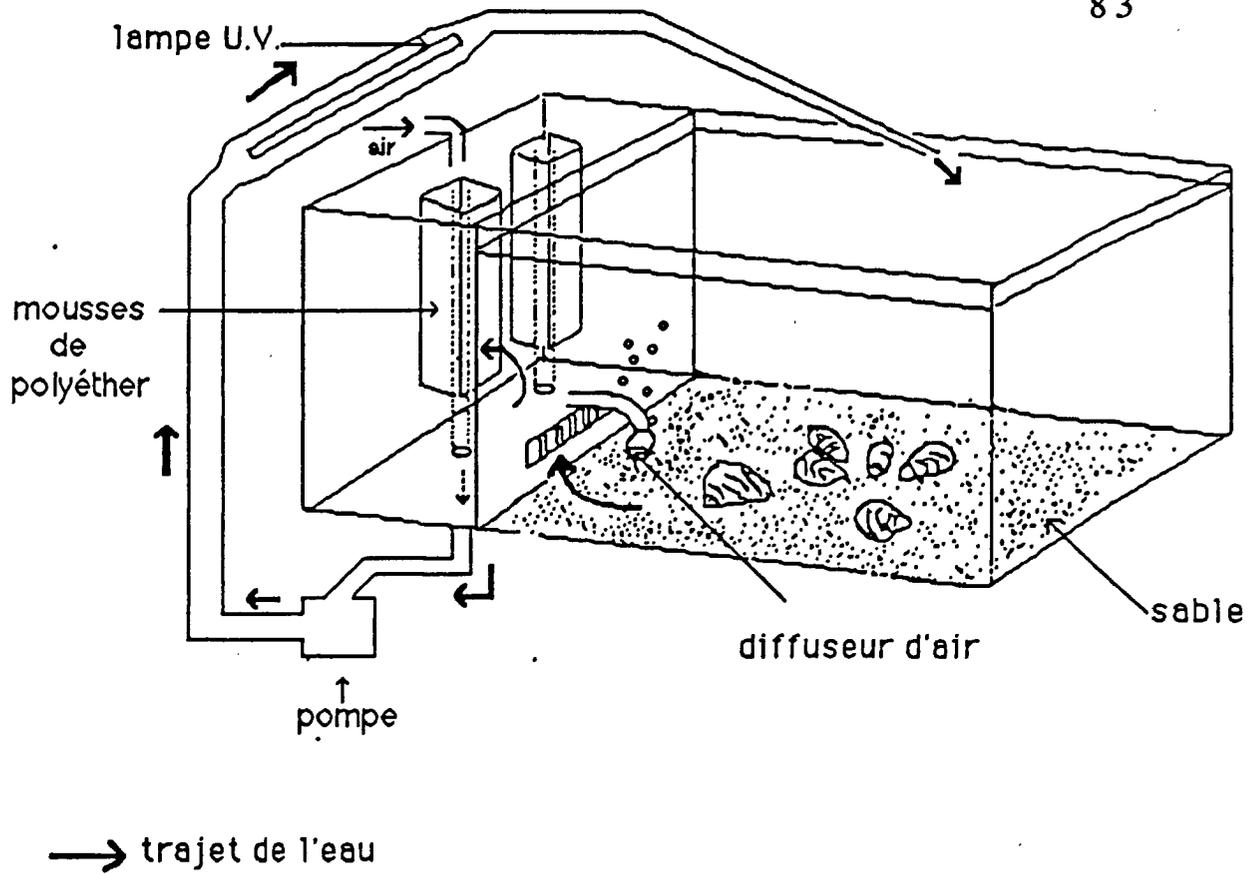


Figure 4 : Schéma de l'aquarium de stockage des huîtres

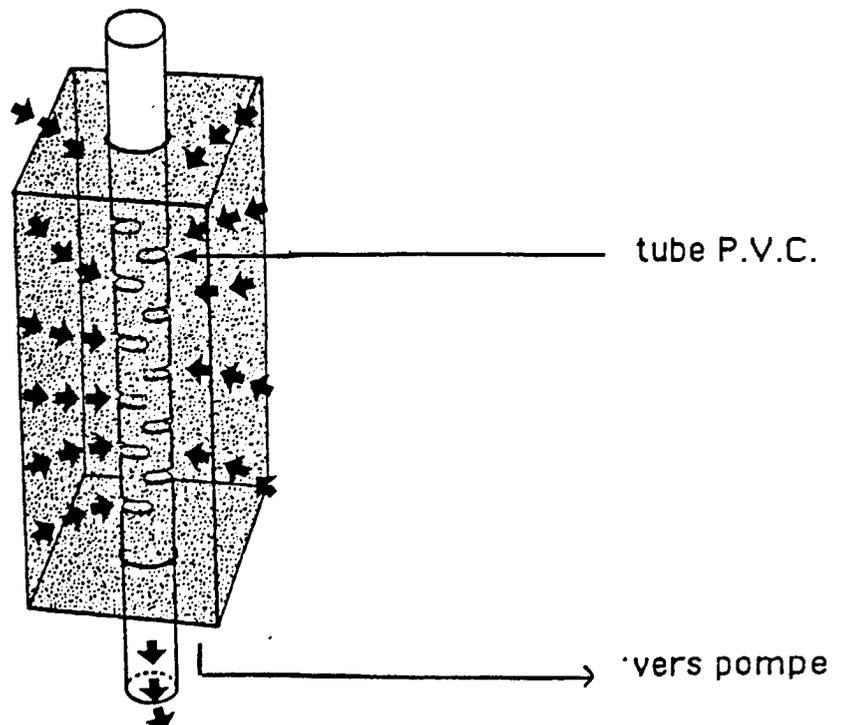


Figure 5 : Schéma de principe d'une mousse cubique (d'après TERVER - 1989)

Les cultures sont placées dans une pièce climatisée à 18° C, sous un éclairage constant assuré par 3 tubes néon (2 tubes Sylvania "gros lux life line" 40W et 1 tube "Cool white" 40W). Un repiquage au 1/10 de la culture est effectué tous les 10 jours lorsque la densité d'algues a atteint et s'est stabilisée à environ 10^6 cellules/ml.

Ces algues unicellulaires sont utilisées soit pour nourrir les huîtres pendant leur stockage (environ 10^9 algues sont ajoutées dans l'aquarium tous les 10 à 15 jours) soit comme support de fixation des rotavirus pendant les expérimentations.

I - 4 : L'EAU DE MER

L'eau de mer utilisée au laboratoire, pour la culture des algues et la contamination artificielle des huîtres, est reconstituée par dissolution de sel marin synthétique (Instant Ocean - Aquarium System) dans de l'eau désionisée. Le mélange est réalisé de façon à obtenir une salinité de 33 g de chlorure de sodium/litre.

L'eau de mer est stérilisée par filtration sur cartouche de porosité 0,45 μm et 0,2 μm (Sartobran 5111 30 7 H9P) puis conservée à +4° C dans des bidons stériles en polyéthylène. Le pH de l'eau de mer stérile est compris entre 7,4 et 7,8.

I - 5 : LES CULTURES CELLULAIRES

Deux lignées cellulaires établies ont été utilisées au cours de ce travail, les cellules MA104 et les cellules BGM

- les cellules MA104 : ce sont des cellules en lignées établies qui proviennent de rein d'embryon de singe rhésus. Elles ont été utilisées pour la mise en évidence des Rotavirus.

- les cellules BGM : Ce sont des cellules de rein de singe vert africain en lignées établies. Elles ont été utilisées pour la mise en évidence des Entérovirus.

I - 5 - 1 : Les milieux de culture

Les cellules sont cultivées avec du milieu essentiel minimum (MEM) de Eagle avec L-glutamine, et avec sels de Earle (annexe 2).

Le milieu est préparé par dissolution d'un milieu commercial déshydraté. Celui-ci est dissous (q.s.p. 5 litres) dans de l'eau ultrapure stérile (Millipore Milli-Q) additionnée de NaHCO₃. Le milieu destiné à la culture des cellules BGM est, en outre, complété lors de sa fabrication avec 1 % d'une solution d'acides aminés non-essentiels 100 fois concentrée.

Le pH est ajusté entre 7 et 7,2 à l'aide HCl 1N ou NaOH 1N, puis le milieu est immédiatement filtré, sous pression d'azote, au travers d'un préfiltre (Millipore AP 25 124 50) et de 3 filtres successifs de porosité 1,2 µm (Millipore RAWP 14 250), 0,45 µm (Millipore HAWP 14 250) et 0,22 µm (Millipore AP 25 124 50). Il est distribué aseptiquement dans des flacons stériles de 100, 250 ou 500 ml à l'aide d'une cloche de répartition.

La stérilité du milieu de culture est contrôlée par ensemencement de 2 tubes de milieu au thioglycolate à la résazurine (croissance des bactéries aérobies et anaérobies) et de 2 tubes de milieu trypticase-soja (croissance des bactéries aérobies et des levures), avec 1 ml de milieu prélevé en début et en fin de filtration.

Ces tubes sont ensuite incubés 5 jours respectivement à 37°C et à température ambiante (20 à 23°C).

De plus, les flacons de milieu sont laissés 5 jours à la température du laboratoire, à l'abri de la lumière. Si après ce délai, aucun trouble n'est apparu dans les flacons et si les milieux de contrôle de stérilité sont négatifs, le milieu est stocké à 4° C jusqu'à son utilisation.

Si la durée de stockage est supérieure à un mois, ce qui doit être exceptionnel, il convient d'ajouter aux milieux avant leur emploi 1% de L-glutamine 100 fois concentrée. Cet acide aminé présente en effet la caractéristique d'être très instable au dessus de -20° C.

Lors de l'emploi, le milieu est additionné d'une solution d'antibiotiques à la concentration de 1/100 (annexe 3).et supplémenté avec du sérum de veau foetal

(Labsystem) décomplémenté à 56° C pendant 30 minutes, à raison de 10 % pour le milieu de croissance et de 2 % pour le milieu de survie

I - 5 - 2 : Entretien de la souche cellulaire

Lorsque des cellules en suspension dans un milieu nutritif sont introduites dans un récipient, elles sédimentent et se fixent sur les parois inférieures puis se multiplient. Après quelques jours d'incubation à 37° C, la croissance cellulaire se traduit par la création d'un tapis cellulaire qui recouvre intégralement la surface inférieure du support.

Les lignées cellulaires MA104 et BGM sont cultivées au laboratoire en flacons plastiques (Falcon ou Nunclon) de 80 ou 150 cm².

La quantité de cellules produites varie de 10⁷ à 3.10⁷ pour les flacons de 80 cm² et de 3.10⁷ à 8.10⁷ pour les flacons de 150 cm².

Tout au long de la multiplication cellulaire, les variations du pH du milieu de culture sont systématiquement surveillées. En effet, l'acidification du milieu signifie un métabolisme cellulaire intensifié, qui se caractérise par le rejet de catabolites acides et par l'appauvrissement du milieu nutritif. Le milieu doit alors être éliminé et remplacé soit par un milieu de croissance identique si le tapis de cellules n'est pas continu soit par un milieu de survie si le tapis cellulaire est continu.

Les cellules MA104 et BGM ont un taux de multiplication élevé et il est possible de faire 3 à 5 subcultures à partir d'une culture originale tous les 5 à 7 jours. Ces subcultures sont réalisées par trypsination des tapis cellulaires.

a) Subculture par trypsination

La subculture s'effectue, selon un protocole schématisé dans la figure.6., à l'aide d'une solution de trypsine associée à un complexant (versène) (annexe 4).

La trypsine est une protéase spécifique des résidus arginine ou lysine. Elle attaque les protéines membranaires et rompt les liaisons peptidiques intercellulaires. Le versène complète l'action de la trypsine, en complexant les ions divalents, qui interviennent dans ces liaisons.

Le tapis cellulaire est ainsi dissocié et les cellules sont individualisées. Elles sont alors réparties dans différents supports, en vue de l'entretien de la souche cellulaire, du titrage de virus ou de l'analyse d'échantillons. Le tableau 11 indique la densité cellulaire et le volume de milieu nécessaire pour les différents supports utilisés.

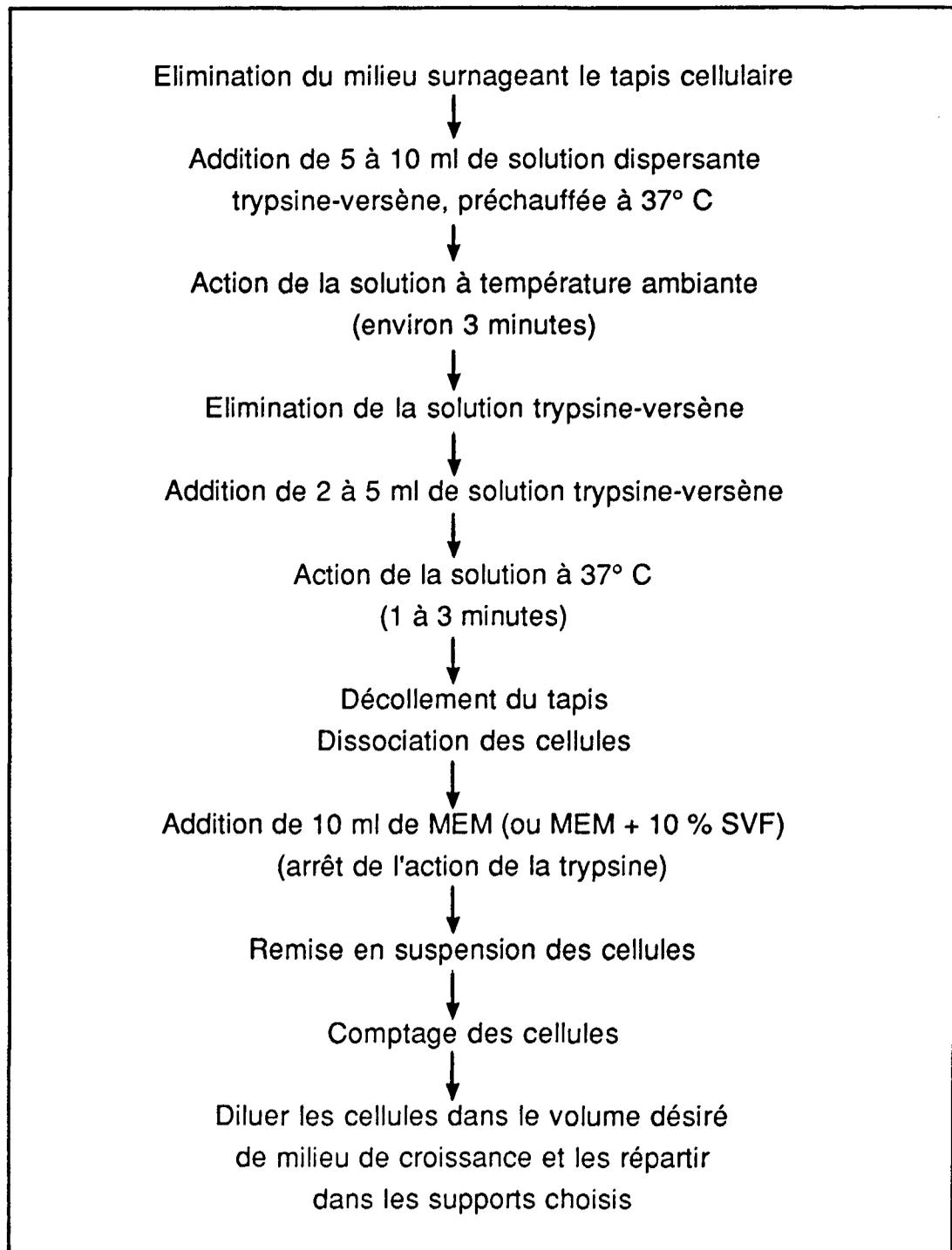


Figure n° 6 : Protocole de subculture des cellules par trypsination

TYPE DE SUPPORT	VOLUME DE MILIEU	DENSITE CELLULAIRE (par ml)
flacon de 80 cm ²	20 ml	2.10 ⁵
flacon de 150 cm ²	50 ml	1.5.10 ⁵
plaques de 96 cupules	100 µl	2.10 ⁵
plaques de 6 cupules	5 ml	10 ⁵

Tableau 11 : Densité cellulaireensemencée selon le type de support

Après 2 à 3 jours d'incubation à 37° C, on obtient un tapis cellulaire continu, prêt à être inoculé. A noter que les cultures réalisées en récipients non-hermétiquement clos doivent être incubées en atmosphère enrichie en CO₂ (5%), de façon à éviter la dissociation à l'air du NaHCO₃ qui tamponne les milieux de culture.

Toutes les manipulations en cultures cellulaires sont réalisées avec les plus grandes précautions d'aseptie sous hotte à flux laminaire vertical.

b) Conservation des lignées cellulaires

Les lignées cellulaires peuvent être conservées pendant des périodes de temps très longues à condition de les congeler.

- congélation des cellules

Pour ce faire, il est préparé une suspension de cellules dans des milieux MEM contenant 20 % de sérum de veau nouveau-né et 10 % de diméthylsulfoxyde (DMSO). La concentration cellulaire est de 2 ± 1.10^6 cellules par ml. Cette suspension est ensuite répartie sous des volumes de 2 à 3 ml ($4 \text{ à } 6.10^6$ cellules par tube) dans des cryotubes qui sont ensuite congelés à -75° C dans des boîtes isothermes.

- décongélation et mise en culture des cultures

La décongélation des cellules doit être rapide. Les cryotubes sont placés, dès leur sortie du congélateur, dans un bain-marie à 37° C et après décongélation

complète, le contenu du tube est placé dans un flacon de 25 ou 80 cm² contenant 7 ou 20 ml de milieu de croissance.

Après 24 heures d'incubation à 37° C, les cellules survivantes ont adhéré sur le support et ont commencé leur multiplication. Mais il est nécessaire d'éliminer les cellules mortes et les débris cellulaires, c'est pourquoi le milieu est rejeté et remplacé par du milieu nutritif de croissance neuf. Les sous-cultures sont ensuite possibles dès l'obtention du tapis continu. Il est toutefois recommandé d'attendre la 2ème trypsination après la décongélation, pour répartir les cellules dans des supports destinés à un ensemencement, en vue de l'isolement de virus.

I - 6 : LE ROTAVIRUS

La souche de rotavirus simien SA 11 (ATCC VR 899) est utilisée pour toute l'expérimentation.

Elle est conservée à -75° C.

I - 6 - 1 : Préparation de la suspension virale stock

Le stock de rotavirus est préparé à partir d'une culture de cellules MA104, selon le protocole décrit dans la figure 7.

Le virus est inoculé à un tapis cellulaire continu en présence de trypsine, puis incubé à 37° C pendant 24 à 48 heures. (il a été montré que la trypsine potentialisait le pouvoir infectieux du virus, en facilitant la décapsidation de la particule virale dans la cellule-hôte). Un effet cytopathique apparaît et lorsqu'il est total et que le tapis cellulaire est entièrement détruit, la culture est congelée puis décongelée 3 fois de suite à -75° C de façon à faire éclater les cellules infectées et permettre la libération des particules virales intracellulaires. La suspension est ensuite centrifugée de manière à éliminer le maximum de débris cellulaires. Le surnageant est réparti en tubes stériles sous de faibles volumes (1 à 4 ml) puis conservé à -75° C dans l'attente du titrage et des utilisations ultérieures.

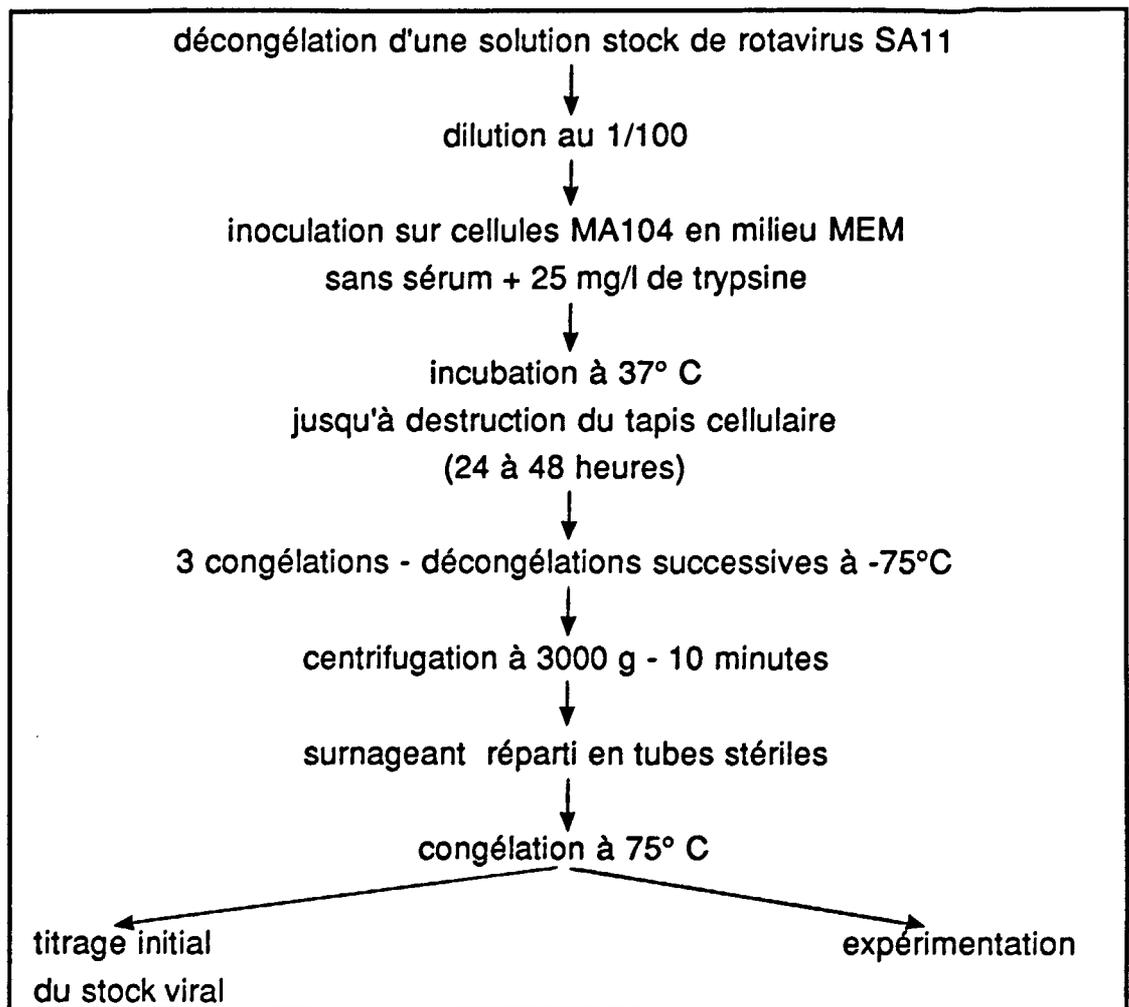


Figure 7 : Protocole de préparation de la suspension de rotavirus SA 11

II : METHODES

Dans ce chapitre sont décrites les méthodes générales utilisées au cours du travail.

II - 1 : CONTAMINATION EXPERIMENTALE DES HUITRES

La contamination artificielle des huîtres est réalisée in-vivo, dans des conditions proches des conditions naturelles. Cependant, BARON (1986) ayant montré que les virus libres n'étaient pas retenus par les filaments branchiaux des huîtres, ceux-ci sont préalablement fixés sur des algues unicellulaires ingérables. Les virus fixés sur les algues sont alors retenus par les huîtres.

Les virus fixés sur les algues sont alors retenus par les huîtres.

II - 1 - 1 : Fixation du rotavirus simien SA 11 à la surface d'algues unicellulaires (*Dunaliella primolecta*)

Cette technique de fixation d'un virus sur des algues a été mise au point par BARON (1986). Il est d'abord procédé à une évaluation de la concentration en algues dans la culture-mère. Elle est déterminée par comptage à la cellule de Nageotte, après dilution dans de l'eau de mer. On prélève ensuite le volume de la culture-mère correspondant à la quantité d'algues désirée, déterminée en fonction du nombre d'huîtres à contaminer (environ 10^7 cellules algales/huître).

Les algues de la culture-mère sont concentrées par centrifugation (1500 g ; 20 minutes). Le culot est remis en suspension dans 17 ml d'eau de mer stérile. et y est ajouté 1 ml de la suspension virale de titre connu. On additionne à ce mélange 2 ml de chlorure d'aluminium $15 \cdot 10^{-3}M$ ($15 \cdot 10^{-4}M$ en concentration finale), qui facilite l'adsorption des virus sur les algues. Le pH est ajusté à la valeur du pH initial de l'eau de mer (pH 8), à l'aide de NaOH 0,1N.

L'adsorption des rotavirus sur les algues est réalisée sous agitation mécanique ménagée pendant 3 heures à 18° C.

II - 1 - 2 : Contamination des huîtres par le rotavirus SA11

Les huîtres sont prélevées dans l'aquarium de stockage et amenées jusqu'au laboratoire, dans des récipients remplis d'eau de mer.

Les bacs de contamination sont remplis avec 12 litres d'eau de mer, dans lesquels est introduite la suspension de rotavirus fixés sur les algues. Un diffuseur d'air (type RENA) assure un brassage efficace de l'eau.

Après une homogénéisation de 15 minutes, un aliquot de 10 ml d'eau est prélevé en vue du titrage des rotavirus, de façon à connaître précisément la quantité de virus présents dans l'eau contaminante.

Les huîtres sont ensuite réparties au fond du bac, pendant une durée variant selon l'expérimentation.

A l'issue de la période de séjour dans l'eau contaminée, elles sont prélevées et placées 1 ou 2 minutes dans de l'eau désionisée stérile, afin d'éliminer par lavage d'éventuelles particules virales retenues sur les coquilles. Les huîtres sont ensuite soumises à l'analyse virologique.

II - 2 : EXTRACTION ET CONCENTRATION DES VIRUS

Chaque huître est ouverte, l'eau intervalvaire est rejetée, et les tissus sont prélevés à l'aide d'un scalpel stérile. Ils sont recueillis dans un flacon et pesés. Il est ensuite procédé à un broyage de ces tissus à l'aide d'un appareil type "Virtis 23" ou "Waring-Blendor" à 10 000 - 14 000 tours par minute pendant 5 minutes par fractions de 20 secondes. Le broyat obtenu est homogénéisé à l'aide d'un appareil type "Ultra-Turrax 25" à 20 000 tours par minute pendant 1 minute.

L'extraction-concentration des virus est ensuite réalisée à partir de cet homogénéisat.

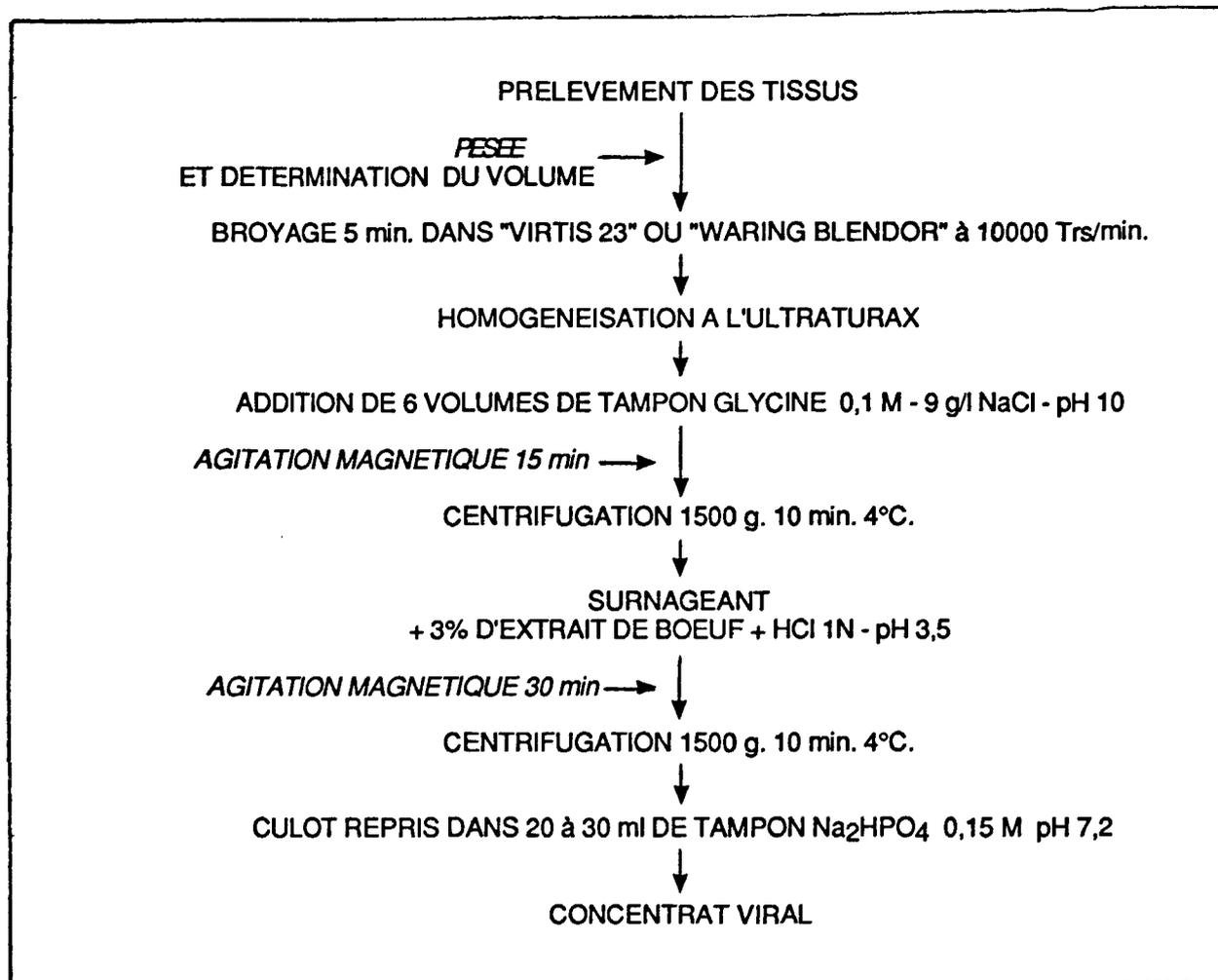
II - 2 - 1 : Technique d'extraction à pH 10 (tampon glycine 0,1 M - NaCl 0,9 %) et de concentration par floculation organique

La technique d'extraction est celle proposée par BARON (1986) pour des huîtres contaminées avec du poliovirus type 1.

Les tissus d'huîtres broyés et homogénéisés sont additionnés de 6 volumes de tampon glycine 0,1 M-NaCl 0,9 % à pH 10 (annexe 6).

Après vérification du pH et ajustement éventuel à 10, le mélange est agité mécaniquement à 250 tours par minute (appareil type "New Brunswick Scientific CO Inc.") pendant 15 minutes. Il est ensuite centrifugé à 1500 g pendant 10 minutes à +4°C. Le surnageant, qui contient les virus, est recueilli et additionné de 3 % d'extrait de boeuf (OXOID L29). La concentration est alors réalisée selon la technique de KATZENELSON *et al.* (1976) en amenant le pH à 3,5 à l'aide d'HCl 1N. Après 30 minutes d'agitation magnétique à 350 tours par minute (appareil type "Merck LMC teledmodule 20 P"), le floc formé est récupéré par centrifugation à 1500 g pendant 15 minutes, puis dissous dans 20 à 30 ml d'une solution stérile de Na₂HP0₄ 0,15 M pH 7,2. La solution obtenue constitue le concentrat viral.

Le protocole de cette technique est détaillé dans la figure 8.

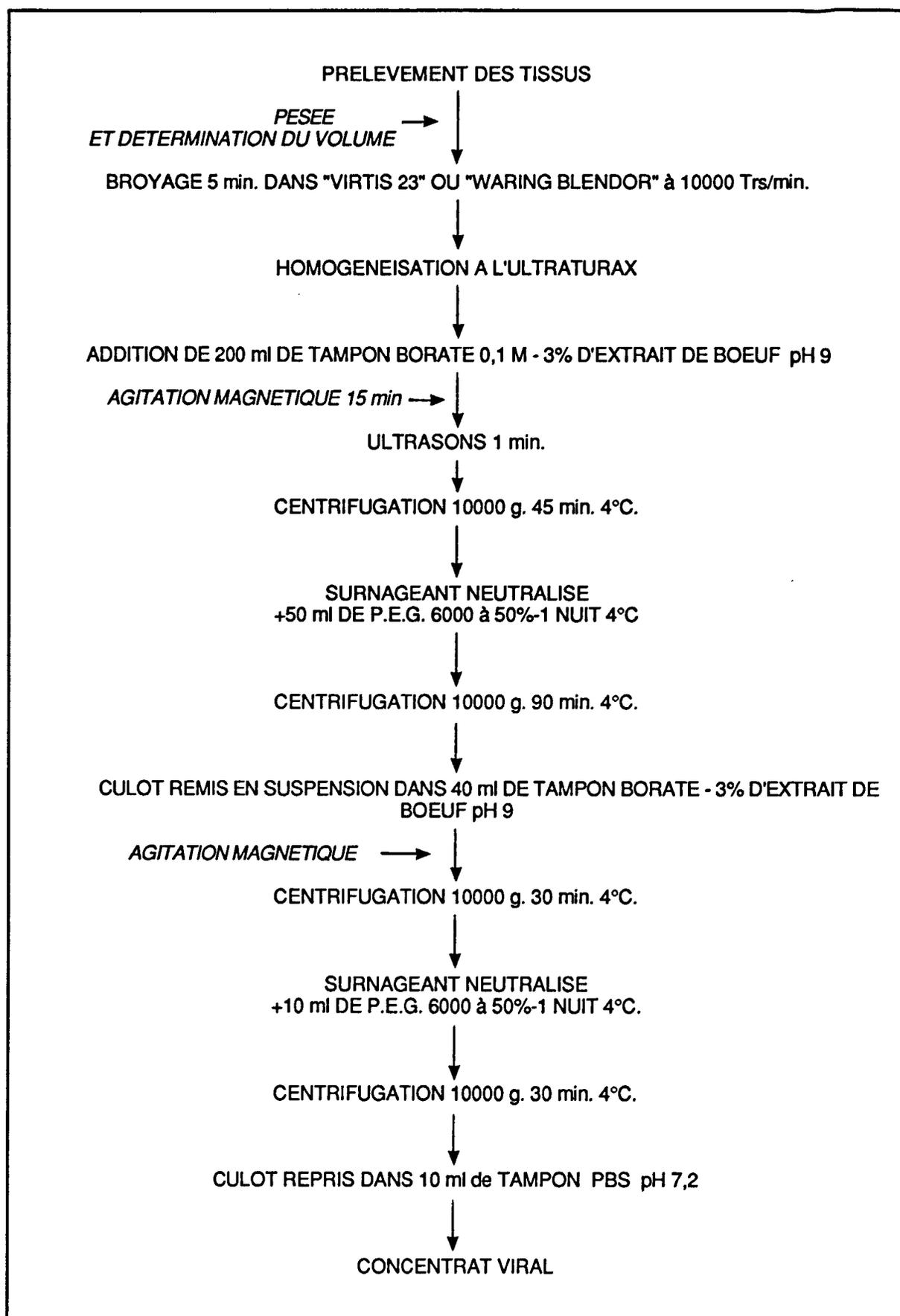


**FIGURE 8 : PROTOCOLE D'EXTRACTION-CONCENTRATION
PAR LE TAMPON GLYCINE-NaCl pH10
ASSOCIE A UNE FLOCCULATION ORGANIQUE**

II - 2 - 2 : Technique d'extraction à pH 9 (tampon borate-3 % d'extrait de boeuf) et de concentration par 2 précipitations par le polyéthylène glycol 6000 (P.E.G. 6000)

Le protocole de cette technique, proposée par BIZIAGOS (1988), est détaillé dans la figure 9.

Les tissus d'huîtres broyés et homogénéisés sont additionnés de tampon borate-3 % d'extrait de boeuf (annexe 6), jusqu'à un volume final de 200 ml.



**FIGURE 9 : PROTOCOLE D'EXTRACTION-CONCENTRATION
PAR LE TAMPON BORATE- 3% D'EXTRAIT DE BOEUF pH 9
ASSOCIE A 2 PRECIPITATIONS PAR LE P.E.G. 6000**

Le mélange est soumis à une agitation magnétique durant 15 minutes, puis à une sonication (1 minute - 30 W - appareil type "Branson Sonic Power 5125"). Il est centrifugé à 10000 g durant 45 minutes à +4° C.

Le surnageant clarifié, qui contient les virus, est recueilli, neutralisé à l'aide d'HCl 1N. puis additionné de 50 ml d'une solution de PEG 6000 à 50 % (annexe 7).

Après homogénéisation et repos d'une nuit à +4° C, le mélange est centrifugé à 10000 g durant 90 minutes à + 4° C. Le culot est remis en suspension dans 40 ml de tampon borate-3 % d'extrait de boeuf. Pour bien homogénéiser et dissoudre ce culot, une agitation magnétique pendant 10 à 20 minutes est nécessaire. Cette suspension est soumise à une centrifugation à 10000 g durant 30 minutes à +4° C.

Le surnageant neutralisé est à nouveau additionné de 10 ml de PEG 6000 à 50 %, puis laissé une nuit à + 4° C. Après une centrifugation à 1000 g durant 30 minutes à + 4° C, le culot est dissous dans 10 ml de tampon PBS pH 7,2.

La solution obtenue constitue le concentrat viral.

II - 3 : DETOXIFICATION DES CONCENTRATS

La méthode de détoxification sur gel de Sephadex LH 20 (Pharmacia), inspiré par QUERO *et al.* (1984) a été mise au point au laboratoire par BERIL *et al.* (1990).

Le protocole résumé dans la figure 10 consiste d'abord à préparer 20 à 30 ml de gel de Sephadex LH20 à 22 % dans du tampon PBS, puis à l'introduire dans un support filtre pyrex (Millipore), comprenant une grille en acier inoxydable à sa base et relié à une trompe à vide. Le tampon est ensuite éliminé par aspiration, et le gel est alors prêt à être utilisé. Le concentrat viral est "déposé" sur le gel puis filtré par aspiration. Le filtrat détoxifié est recueilli.

Pour la réalisation de certaines expérimentations, le protocole a été modifié. Avant filtration, le concentrat viral d'huîtres est amené à pH 9 et clarifié par centrifugation (Figure 11)

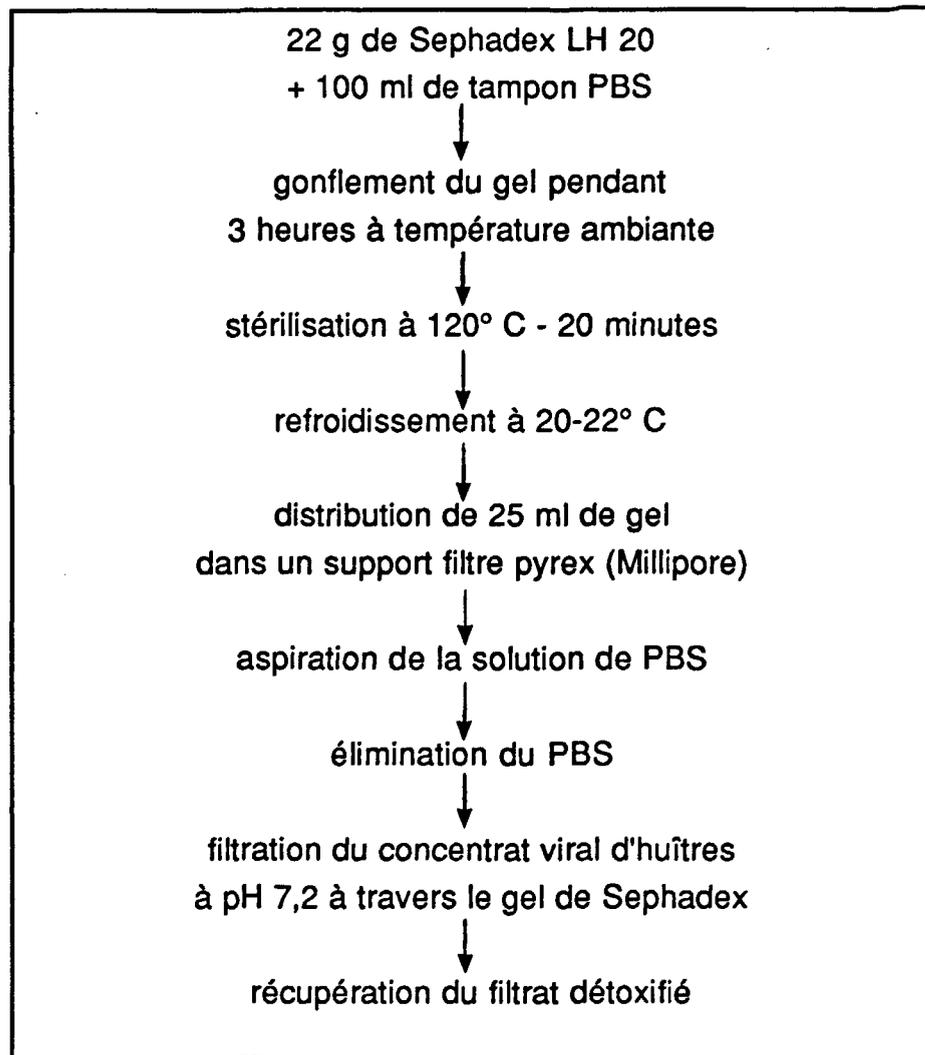


Figure 10 : Détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH20

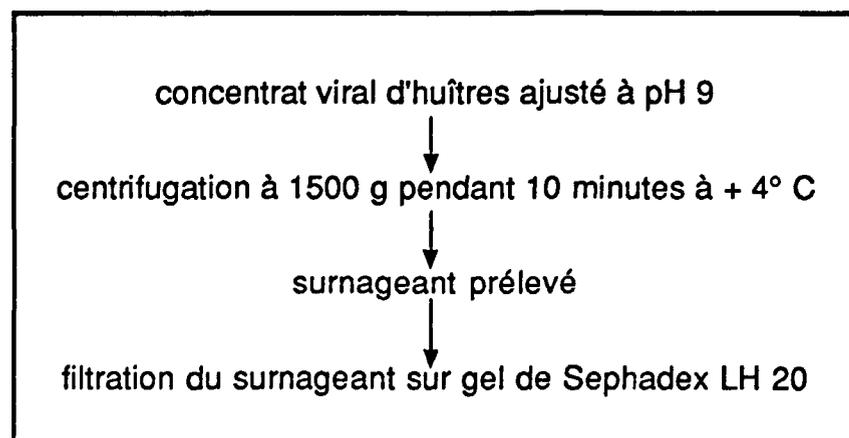


Figure 11 : Modification du protocole de détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH 20

II - 4 : DECONTAMINATION DES CONCENTRATS

Les concentrats viraux sont d'abord additionnés de milieu MEM 10 fois concentrés dans la proportion de 0,1 ml par ml, de façon à maintenir une isotonicité du milieu.

La décontamination est réalisée par addition d'une solution d'antibiotiques (annexe 5) à raison de 0,1 ml par ml de concentrat puis d'une solution antifongique (amphotéricine B à 250 µg/ml) à raison de 0,02 ml par ml de concentrat. L'échantillon ainsi traité est incubé pendant 2 heures à 37° C avant d'être inoculé sur cultures cellulaires.

II - 5 : ISOLEMENT ET QUANTIFICATION DES ROTAVIRUS

L'isolement des rotavirus a été réalisé par inoculation sur cellules MA104 et la révélation de leur multiplication ainsi que leur quantification ont été effectuées par une technique d'immunofluorescence indirecte, directement appliquée sur les tapis cellulaires inoculés.

II - 5 - 1 : Inoculation sur cultures cellulaires

Les échantillons à tester sont dilués dans du milieu MEM sans sérum, additionné de 8 µg/ml de trypsine. L'inoculation des échantillons dilués est réalisée sur des tapis cellulaires MA104 développés dans des plaques de microtitration de 96 cupules. Après élimination du milieu de croissance par aspiration et 2 lavages successifs avec du milieu MEM sans sérum, 40 ou 80 cupules, suivant les dilutions et les échantillons, sont inoculées à raison de 100 µl d'inoculum par puits. Des puits de cultures cellulaires témoin non-inoculées sont préparés conjointement.

Après inoculation, les plaques sont incubées 48 heures à 37° C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂.

II - 5 - 2 : Fixation des cellules

Après la période d'incubation, qui correspond à environ 3 cycles de réplication du rotavirus dans une cellule, les tapis cellulaires sont fixés par addition dans chaque cupule de 300 µl de mélange Alcool absolu 80 %-Acétone 20 % à + 4° C.

Après un contact de 5 minutes, le mélange est éliminé et cette opération est répétée 3 fois. Lors de la dernière fixation, la plaque est laissée 15 minutes à + 4° C. Le mélange fixateur est ensuite éliminé et la plaque est séchée à l'air. Les plaques de cellules ainsi fixées peuvent être conservées au congélateur à - 75° C.

II - 5 - 3 : Révélation des rotavirus par immunofluorescence indirecte

La révélation des rotavirus est réalisée sur les tapis cellulaires fixés, par la mise en oeuvre d'une réaction d'immunofluorescence indirecte (I.F.I.).

Deux réactifs immunologiques sont utilisés :

- un sérum de chèvre anti-rotavirus humain *
(1er lot de titre 15 360 ; utilisé à la dilution 1/1000.
2ème lot de titre environ 30 720 ; utilisé à la dilution 1/2000).
- un sérum de lapin anti-Ig G de chèvre couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine** ; il est utilisé à la dilution 1/400.

Le protocole de la révélation des rotavirus par I.F.I. est détaillé figure 12.

L'observation des cupules est réalisée à l'aide d'un microscope ZEISS équipé d'une lampe à vapeur de mercure à haute pression (HBO 50W), et d'un épicondenseur de fluorescence muni d'un filtre chromatique permettant l'émission d'une lumière bleue (450 à 490 nm). L'isothiocyanate de fluorescéine émet une fluorescence verte (520 nm) lors de l'excitation par la lumière bleue.

Le rayonnement d'excitation est dirigée sur la préparation à travers l'objectif. Toute la surface de la cupule (30 mm²) est observée.

* aimablement fourni par les laboratoires de Virologie et d'Immunologie de l'INRA, Jouy-en-Josas (Dr L'HARIDON et VAUTHEROT)

** Laboratoires BYOSIS

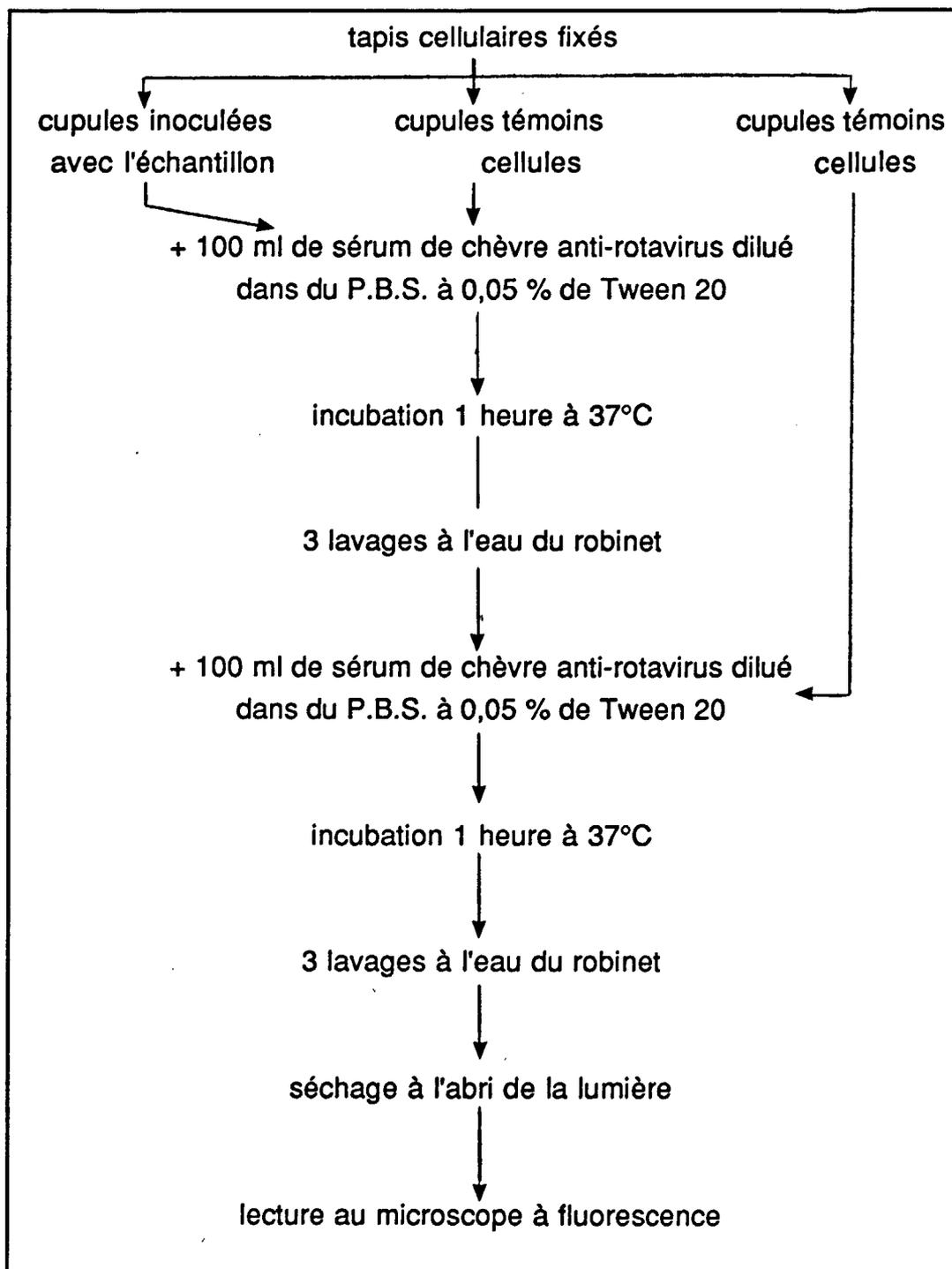


Figure 12 : Protocole de la révélation des rotavirus par I.F.I.

Les antigène viraux, marqués lors de la réaction immunologique, sont détectés en fluorescence dans le cytoplasme des cellules infectées (photo 1).

Photo 1 : Cellules MA 104 infectées par du rotavirus simien SA11
Révélation par immunofluorescence indirecte (grossissement x100)

II - 5 - 4 : Expression quantitative des résultats

La quantité de rotavirus dans l'échantillon est évaluée à partir du comptage des foci de fluorescence (F.F.) dans chaque cupule de la microplaque, inoculées avec la même dilution virale. Le chiffre obtenu est ensuite ramené au volume total d'échantillon non-dilué, lui-même rapporté éventuellement à la masse de tissus d'huîtres analysés ou au volume d'eau de mer.

Les intervalles de confiance à 95 % ont été calculés selon les formules et les valeurs d'encadrement proposées par BLOCK et SCHWARTZBROD (1989).

II - 6 : ISOLEMENT ET QUANTIFICATION DES ENTEROVIRUS

L'isolement des entérovirus a été réalisée par inculcation sur cellules BGM. La multiplication des virus à l'intérieur des cellules se traduit par un effet cytopathique (E.C.P.) et la destruction progressive du tapis cellulaire.

II - 6 - 1 : Inoculation sur cultures cellulaires

Les échantillons testés sont dilués dans du milieu de survie (MEM 2% de sérum de veau foetal) et l'inoculation est réalisée sur des tapis de cellules BGM développés dans des plaques de microtitration à 6 puits.

Après élimination du milieu de croissance par aspiration, les tapis cellulaires sont inoculés à raison de 0,5 ml d'échantillon, dilué ou non, par cupule. 5 cupules sont inoculées sur 4 ou 6 niveaux de dilution (rapport de dilution 2).

Après un contact de 2 heures à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂, l'inoculum est éliminé et le tapis cellulaire rincé avec une solution de lavage (annexe 8) pré-chauffée à 37°C. Après élimination de cette solution de lavage, le tapis cellulaire est recouvert avec 5 ml de MEM 2% de sérum de veau foetal.

Une cupule non-inoculée par plaque constitue le témoin-cellules

Les plaques sont incubées à 37°C en atmosphère enrichie en CO₂.

II - 6 - 2 : Observation de la multiplication virale

Les cupules sont observées au microscope inversé chaque jour pendant 7 à 12 jours de façon à noter l'apparition d'un E.C.P. et suivre son évolution. L'observation se poursuit tant que les cupules-témoins présentent des tapis cellulaires en bon état.

A la fin de la période d'observation, les cultures cellulaires sont soumises à 3 congélations-décongélations successives et après centrifugation, les surnageants sont inoculés sur de nouveaux tapis cellulaires en cupules. Cette subculture est systématiquement réalisée, aussi bien pour confirmer la nature virale d'une destruction du tapis cellulaire, qu'en l'absence de toute altération, pour augmenter les chances d'isolement d'un virus.

II - 6 - 3 : Quantification des Entérovirus

la quantité d'Entérovirus dans l'échantillon est évaluée à partir du comptage des cupules présentant un E.C.P. La méthode de numération est de type quantique et l'estimation du nombre de particules virales dans l'inoculum est obtenue par la méthode de FISHER.

Cette méthode repose sur l'exploitation du nombre de résultats négatifs comptés pour l'ensemble des niveaux de dilution, sans les différencier, en tenant

compte du nombre de cupulesensemencées à chaque niveau (BLOCK et SCHWARTZBROD - 1989).

L'équation définissant la densité virale d'un échantillon étant complexe, des tables de résultats sont proposées (FISHER et YATES - 1970 ; WISHAK et DETRE - 1972).

II - 6 - 4 : Diagnostic d'orientation

Les surnageants de culture des cupules présentant un E.C.P. sont soumis à 3 congélations-décongélations successives, de façon à faire éclater les cellules et libérer les virions qui y sont accumulés.

Cette suspension est ensuite inoculée selon les mêmes modalités que précédemment sur un tapis cellulaire en tube de Leighton. Au cours de l'incubation à 37°C, une observation microscopique est effectuée régulièrement et dès l'apparition des premières lésions, il est procédé à la fixation puis à la coloration des cellules par l'hémalum-éosine, selon le protocole suivant :

- Fixer les cellules cultivées sur la lamelle par le mélange de Bouin (acide picrique + formol + acide acétique),
- Décolorer par action d'alcool à 70 %,
- Rincer puis colorer les cellules par une solution d'hémalum acide de Man (15 minutes),
- Différencier quelques secondes dans l'alcool acide, puis bleuir dans de l'eau ammoniacale.
- Colorer dans une solution d'éosine à 0,5 % (1 minute),
- Rincer à l'eau puis déshydrater la préparation par passages dans des bains successifs en débutant avec l'éthanol à 70 %, à 95 % puis absolu,
- Éliminer l'éthanol par un solvant (toluène),
- Fixer la lamelle sur une lame porte-objet grâce à du baume du Canada et observer au microscope.

Cette opération permet une observation précise des lésions cellulaires et l'établissement d'un diagnostic d'orientation.

II - 7 : MISE EN EVIDENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE A *

La détection du virus de l'hépatite A (VHA) est réalisée à l'aide d'une méthode radioimmunologique (PURCELL *et al.* - 1976) de type sandwich, dans laquelle l'antigène viral, après fixation sur les anticorps, est mis en évidence par des anticorps radiomarqués. La méthode utilise au moins deux sites de l'antigène à doser et l'antigène est pris en sandwich entre deux anticorps dont l'un est marqué à l'iode 125. Elle est dénommée "Solid Phase Radio Immuno Assay" (SPRIA)

La méthodologie est la même que celle décrite par ALBERT (1989).

Protocole expérimental

Test de détection

La détection de l'antigène du VHA comporte les étapes suivantes :

- 100 µl d'un sérum de titre anti-VHA voisin de 200 UI/ml dilué au 1/200 dans du PBS sont disposés dans chaque cupule d'une plaque de microtitration en polyvinyl souple. Après 48 H à + 4° C en atmosphère humide, la plaque est lavée 2 fois avec une solution de lavage à 0,15 M de chlorure de sodium et 0,5 % Tween 20, puis 5 fois avec de l'eau distillée. Cette phase correspond à la fixation des anticorps anti-VHA sur les parois des cupules.

- 50 µl de chaque échantillon sont déposés par cupule et la plaque est incubée en chambre humide deux heures à + 45° C, puis une heure à + 4° C. La plaque est alors lavée comme précédemment. Au cours de cette étape les antigènes du VHA éventuellement présents se sont combinés avec les anticorps.

- 50 µl d'IgG anti-VHA marquées à l'iode 125 (150 000 cpm) sont déposés et la plaque est incubée une nuit à température ambiante. La plaque est lavée comme précédemment puis découpée et la radioactivité fixée sur chaque cupule est mesurée directement à l'aide d'un compteur gamma (PACKARD).

* Cette détection de l'antigène du VHA par radioimmunologie a été réalisée par le Docteur BIZIAGOS, au Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de La Tronche.

Le rapport P/N entre le nombre de cpm de l'échantillon étudié (P) et celui de témoins négatifs (N) doit être supérieur ou égal à 2,1 pour pouvoir conclure à la présence de VHA.

Test de confirmation

Les échantillons positifs au test de détection sont dans un deuxième temps soumis au test de confirmation pour apprécier la spécificité du dosage. Le protocole utilisé est le suivant :

- les anticorps anti-VHA sont fixés dans les cupules selon la même méthode que celle utilisée dans le test de détection.

- 50 μ l d'échantillon à étudier sont déposés dans deux cupules. Après incubation (2 H à + 45° C puis 1 H à + 4° C) qui permet la fixation de l'antigène, les lavages sont effectués comme précédemment.

- 50 μ l d'un mélange d'IgG anti-VHA marquées à l'iode 125 et d'un sérum contenant des anticorps anti-VHA (sérum positif : SP) sont déposés dans une des deux cupules alors que l'autre cupule reçoit 50 μ l d'un mélange d'IgG anti-VHA marquées à l'iode 125 et d'un sérum ne contenant pas d'anticorps anti-VHA (sérum négatif : SN). Les sérums de référence utilisés sont soit des sérums de chimpanzé correspondant au sérum avant et après infection expérimentale par le VHA, soit des sérums de malade avant et après la maladie.

Après incubation une nuit et lavage, la radioactivité est mesurée sur les deux cupules ; on recherche une diminution de la radioactivité dans le puit contenant le sérum positif par rapport au puit contenant le sérum négatif.

Le rapport des cpm obtenus SN/SP doit être supérieur à 2,1 pour confirmer la présence de VHA.

Un résumé des protocoles de recherche des virus est représenté sur la figure 13.

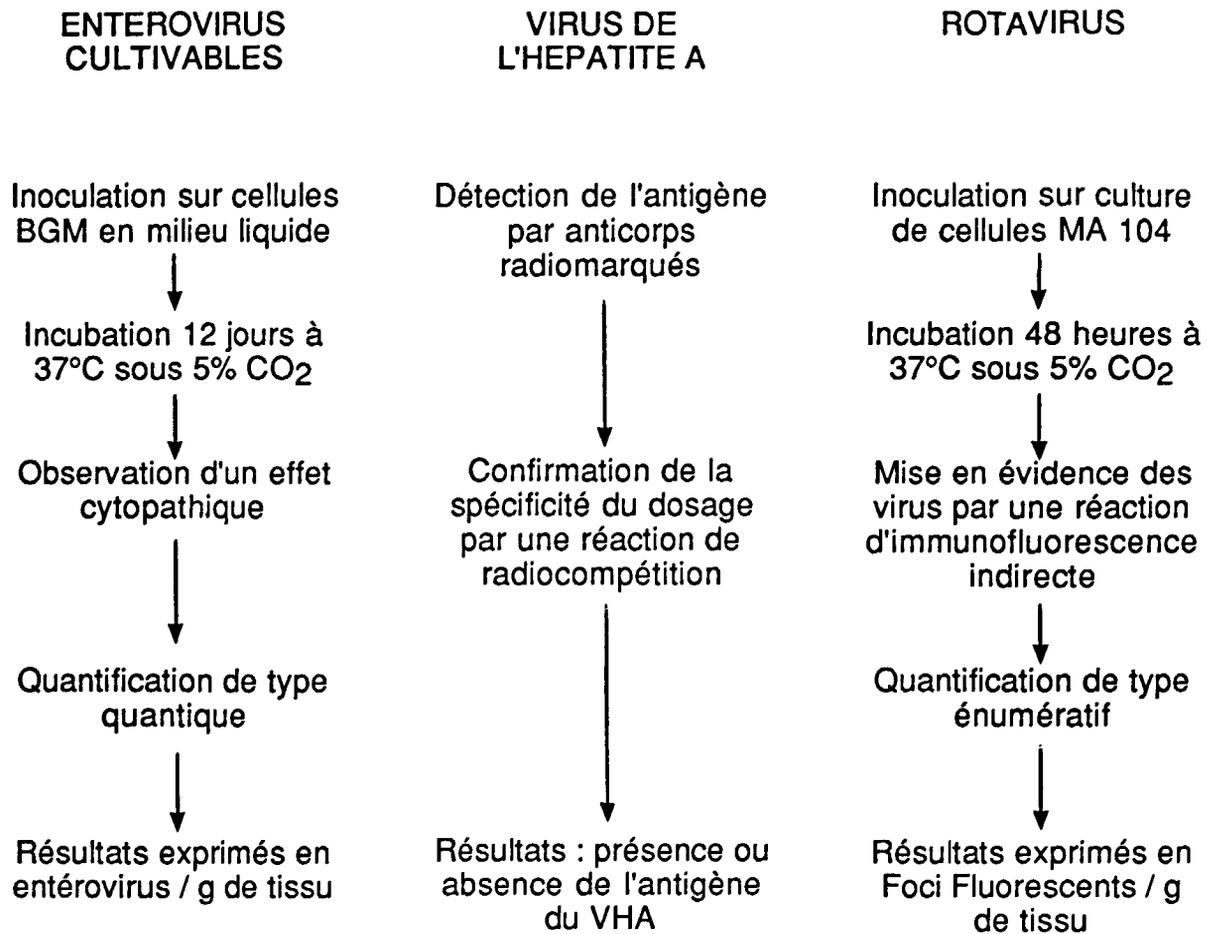


Figure 13 : Protocoles de recherche des virus

II - 8 : LYOPHILISATION

La lyophilisation consiste à déshydrater sous vide un produit préalablement congelé. L'eau libre et une partie de l'eau liée passant directement de l'état "glace" à l'état "vapeur" (sublimation).

Les expérimentations ont été réalisées dans un appareil type "USIFROID SMH 15" (figure 14)*

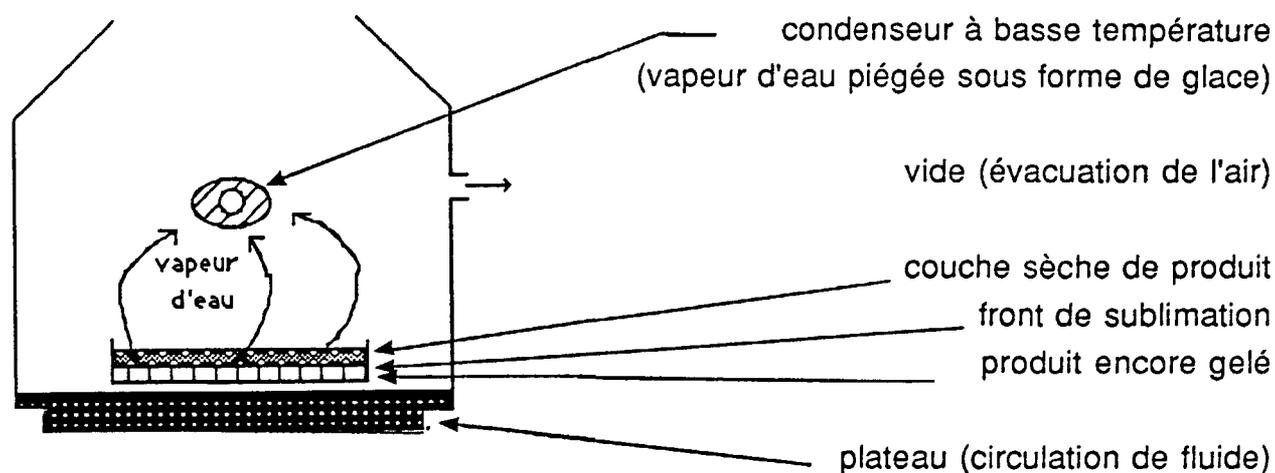


Figure 14 : Schéma d'un lyophilisateur

La lyophilisation est pratiquée sur des tissus d'huîtres non-broyés, qui sont congelés dans l'enceinte du lyophilisateur, par circulation d'un fluide réfrigérant dans le plateau. Lorsque la température a atteint -35°C environ, il est procédé à la mise sous vide.

La dessiccation est la période pendant laquelle toute l'eau congelée de l'aliment est sublimée. La température du produit remonte alors progressivement et se stabilise vers 10°C .

En fin de lyophilisation, le vide est cassé par entrée d'air et l'échantillon est récupéré.

La durée totale du traitement est d'environ 24 heures.

* ces expérimentations ont été réalisées au laboratoire du Professeur LABRUDE, à la Faculté de Pharmacie de Nancy

II - 9 : EPURATION DES HUITRES AU LABORATOIRE

II - 9 - 1 : Le pilote expérimental d'épuration

L'équipement comprend :

- 6 bacs de stabulation, de 3,5 litres de contenance, équipés de 6 supports pour les huîtres,
- 6 pompes permettant un débit d'eau modulable,
- 2 lampes U.V. de 15 watts,
- 2 lampes U.V. de 8 watts,
- des tubes en P.V.C. pour la circulation de l'eau en circuit fermé

Le principe de l'installation est schématisé sur la figure 15.

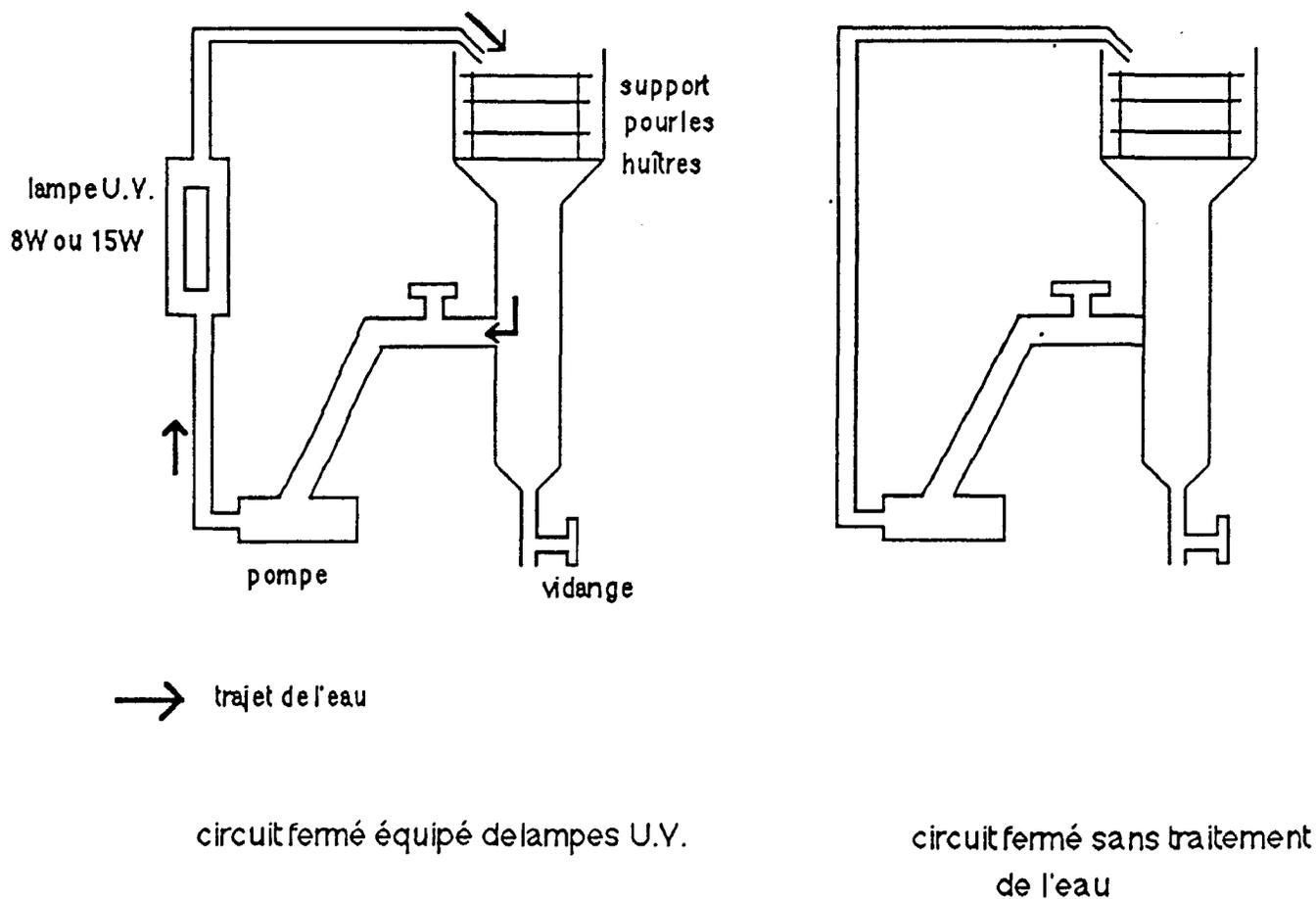


Figure 15 : Schéma de principe des pilotes d'épuration

II - 9 - 2 : La stérilisation de l'eau par les rayons U.V.

Le principe des appareils de stérilisation consiste à faire circuler l'eau à stériliser en couche mince autour d'un tube U.V., enfermé dans une gaine de verre pourvue d'un orifice d'entrée et d'un orifice de sortie.

Le tube U.V. de 15W est placé à l'intérieur d'une gaine de quartz, matériau perméable aux U.V. contrairement au verre. L'eau circule entre le tube de quartz et l'enveloppe de verre (figure 16). L'espace ménagé entre la gaine de quartz et le tube U.V. assure à ce dernier une bonne isolation thermique aux températures inférieures à 20° C.

Le tube 8W n'est pas équipé de gaine de quartz.

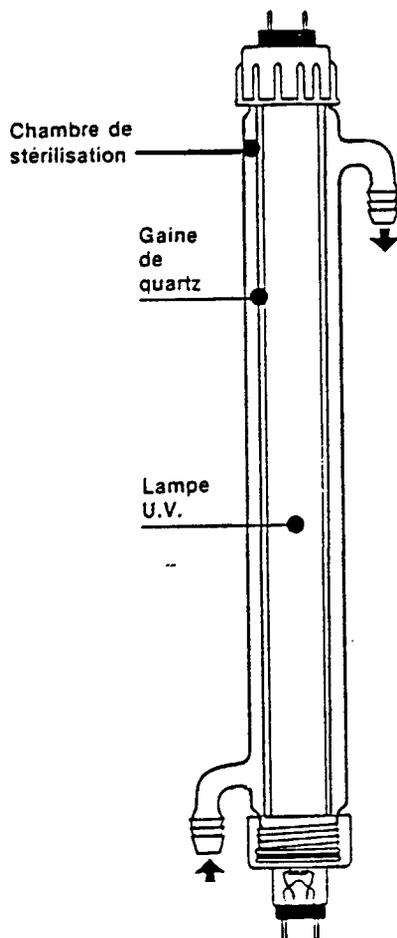


Figure 16 : Schéma de principe d'un appareil de stérilisation U.V. avec gaine de quartz (d'après TERVER - 1989)

2 débits de circulation d'eau sont proposés : 2 litres/minute (soit 120l/h) et 4 litres/minute (soit 240l/h).

II - 10 : CONCENTRATION DES ROTAVIRUS A PARTIR DE L'EAU

Lors d'un titrage de rotavirus dans l'eau de mer, un aliquot de 1 ou 2 ml peut être inoculé, après dilution, sur cultures cellulaires en plaques de microtitration. Toutefois, le seuil de détection est de l'ordre de 1 particule virale par ml. Aussi, lorsque la quantité de virus dans l'eau est supposée plus faible, il convient de procéder à une concentration des virus à partir d'un volume d'eau plus important.

La précipitation par le polyéthylène glycol (P.E.G.), est décrite pour la concentration du virus de l'hépatite A à partir d'une eau artificiellement contaminée (BIZIAGOS - 1989). Elle consiste à prélever 80 ml d'eau de mer et à l'additionner de 5% d'extrait de boeuf en poudre. Après homogénéisation, 20 ml d'une solution de P.E.G. 6000 à 50% (annexe 6) sont ajoutés (soit une concentration finale de 10% (p/v)). Le pH est ajusté à 7-7,4. L'échantillon est laissé une nuit à +4°C, le précipité formé est récupéré par une centrifugation à 10 000 g pendant 45 minutes à +4°C et remis en suspension dans 3 ml de PBS. La solution obtenue constitue le concentrat viral.

RESULTATS

CHAPITRE I : ETUDE METHODOLOGIQUE DES CONDITIONS DE MISE EN EVIDENCE DES VIRUS A PARTIR DES HUITRES

I - 1 : COMPARAISON DE DEUX METHODES D'EXTRACTION-CONCENTRATION DES VIRUS A PARTIR DES HUITRES

La première méthode utilisée est fondée sur l'élution des virus à partir des tissus à l'aide d'une solution de glycine-NaCl pH 10, suivie d'une concentration par floculation organique. La seconde méthode associe une élution par un tampon borate-3 % d'extrait de boeuf pH 9 à une double concentration par le polyéthylène glycol 6000 (P.E.G. 6000).

Les protocoles d'analyse sont présentés dans la partie "Matériel et Méthodes" chapitre II-2.

L'efficacité des deux méthodes d'extraction-concentration a été évaluée dans un premier temps à partir d'huîtres contaminées in-vivo, puis dans un deuxième temps, à partir de broyats artificiellement contaminés in-vitro.

I - 1 - 1 : Etude de deux méthodes d'extraction-concentration à partir d'huîtres artificiellement contaminées in-vivo.

Les huîtres sont artificiellement contaminées par un séjour d'une heure dans un bac de 12 litres d'eau de mer préalablement stérilisée, contenant une suspension d'algues (*Dunaliella primolecta*) sur lesquelles sont préalablement fixées des quantités variables de rotavirus simien SA 11.

A l'issue de la contamination, les huîtres sont prélevées, rincées à l'eau désionisée et soumises à l'analyse virologique.

Nous avons réalisé une série d'expérimentations en vue de comparer les rendements des deux méthodes, en fonction du titre viral initial de l'eau de mer.

- Résultats obtenus avec le protocole n° 1 (glycine + floculation organique) :

14 expérimentations ont été menées avec de l'eau de mer titrant entre 61 et 3800 rotavirus/ml. Les résultats de la récupération virale dans les huîtres sont rassemblés dans le tableau n° 12.

- Résultats obtenus avec le protocole n° 2 (borate + P.E.G.) :

9 expérimentations ont été réalisées avec de l'eau de mer titrant entre 61 et 5200 rotavirus/ml. Les résultats de la récupération virale dans les huîtres sont rassemblés dans le tableau n° 13.

Comparaison des résultats obtenus avec les deux méthodes d'extraction-concentration :

L'étude des résultats (tableaux 12 et 13) permet de constater que les quantités virales récupérées varient dans le même sens que la charge virale initiale de l'eau de mer.

On procède à une transformation logarithmique des valeurs.

- série de résultats obtenus avec la méthode "borate+PEG" :

effectif $n_1 = 9$, variance $s_1^2 = 0,5$, moyenne $m_1 = 2,6$

- série de résultats obtenus avec la méthode "glycine+floculation organique" :

effectif $n_2 = 14$, variance $s_2^2 = 0,4$, moyenne $m_2 = 1,9$

Un test de Student classique (comparaison des moyennes) est appliqué.

"t" théorique = $t_{0,05, v} = 2,08$ avec $v = n_1 + n_2 - 2 = 21$ degrés de liberté

La statistique

$$\frac{m_1 - m_2}{\sqrt{\frac{n_1 s_1^2 + n_2 s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}} \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} = 2,3 \text{ est supérieure au "t" théorique}$$

Ce test permet de mettre en évidence une différence statistique significative (au seuil de 5 %) entre les deux méthodes : **la méthode associant le tampon borate-3 % d'extrait de boeuf au PEG présente une efficacité qui est supérieure à celle de la méthode utilisant la solution de glycine et la floculation organique.** La première méthode est en outre plus facile à réaliser et moins drastique pour les virus, mais elle est de réalisation nettement plus longue.

TITRE VIRAL DE L'EAU DE MER (F.F. / ml)	RECUPERATION VIRALE AVEC LE PROTOCOLE D'EXTRACTION-CONCENTRATION : GLYCINE- NaCl + FLOCCULATION ORGANIQUE (F.F. / g de tissu)
$3,8.10^3$ $1,6.10^3$ * - 6.10^3 **	$2,9.10^2$ $0,8.10^2$ - $4,9.10^2$
10^3 $7,3.10^2$ - $1,3.10^3$	$3,2.10^3$ $2,2.10^3$ - $4,9.10^3$
$7,8.10^2$ $3,7.10^2$ - $1,2.10^3$	$4,7.10^2$ $1,9.10^2$ - $8,07.10^2$
$8,7.10^2$ $5,3.10^2$ - $1,2.10^3$	$3,8.10^1$ $1,4.10^1$ - $8,6.10^1$
$6,9.10^2$ $5,6.10^2$ - $8,3.10^2$	$1,04.10^2$ $0,9.10^2$ - $1,1.10^2$
$6,08.10^2$ $3,5.10^2$ - $8,6.10^2$	$1,4.10^2$ $0,8.10^2$ - $1,9.10^2$
$3,03.10^2$ $2,4.10^2$ - $3,6.10^2$	$3,06.10^2$ $1,03.10^2$ - 5.10^2
$2,09.10^2$ $1,4.10^2$ - $2,7.10^2$	2.10^2 $0,9.10^2$ - 3.10^2
$1,05.10^2$ $0,7.10^2$ - $1,4.10^2$	$1,4.10^2$ $6,5.10^1$ - $2,7.10^2$
$1,02.10^2$ $0,5.10^2$ - $1,4.10^2$	$4,8.10^1$ $0,04.10^1$ - $1,06.10^2$
$6,7.10^1$ $3,7.10^1$ - $9,6.10^1$	$5,3.10^1$ $2,2.10^1$ - $1,03.10^2$
$6,7.10^1$ $3,7.10^1$ - $9,6.10^1$	$5,1.10^1$ $2,1.10^1$ - $1,03.10^2$
$6,7.10^1$ $3,7.10^1$ - $9,6.10^1$	$1,13.10^1$ $0,02.10^1$ - $6,3.10^2$
$6,1.10^1$ $3,4.10^1$ - $8,8.10^1$	$0,5.10^1$ $0,01.10^1$ - 3.10^2

* LIMITE INFERIEURE DE CONFIANCE A 95%

** LIMITE SUPERIEURE DE CONFIANCE A 95%

Tableau 12. : Récupération virale en fonction du titre initial de l'eau de mer par la méthode "glycine + floculation organique"

TITRE VIRAL DE L'EAU DE MER (F.F. / ml)	RECUPERATION VIRALE AVEC LE PROTOCOLE D'EXTRACTION-CONCENTRATION : BORATE- 3% D'EXTRAIT DE BOEUF + 2 PRECIPITATIONS PAR P.E.G. 6000 (F.F. / g de tissu)
5,2.10 ³ 4,03.10 ³ * 6,4.10 ³ **	1,4.10 ³ 9,8.10 ² - 1,8 10 ³
9,4.10 ² 3,04 10 ² - 1,5 10 ³	5,5.10 ³ 3,9.10 ³ - 1,4.10 ⁴
8,7.10 ² 5,3.10 ² - 1,2.10 ³	1,2.10 ³ 9,04.10 ² - 1,6.10 ³
3,03.10 ² 2,4.10 ² - 3,6.10 ²	2,8.10 ² 1,4.10 ² - 4,2.10 ²
2,09.10 ² 1,4.10 ² - 2,7.10 ²	2,8.10 ¹ 0 - 5,6.10 ¹
1,05.10 ² 7,5.10 ¹ - 1,4.10 ² .	1,6.10 ³ 1,2.10 ³ - 1,9.10 ³
6,7.10 ¹ 3,7.10 ¹ - 9,6.10 ¹	3,1.10 ² 2.10 ² - 4,2.10 ²
6,7.10 ¹ 3,7.10 ¹ - 9,6.10 ¹	1,5.10 ² 8,9.10 ¹ - 2,1.10 ²
6,1.10 ¹ 3,4.10 ¹ - 8,8.10 ¹	4.10 ¹ 1,8.10 ¹ - 5,8.10 ¹

* LIMITE INFERIEURE DE CONFIANCE A 95%

** LIMITE SUPERIEURE DE CONFIANCE A 95%

Tableau 13 : Récupération virale en fonction du titre initial de l'eau de mer par la méthode "borate + P.E.G."

Afin de compléter ces observations, nous avons tenté d'appliquer ces méthodes d'analyse à une petite série de broyats artificiellement contaminés in-vitro. Ces expérimentations sont destinées à nous renseigner sur le rendement théorique des méthodes, en maîtrisant exactement la contamination initiale des tissus.

I - 1 - 2 : Etude des deux méthodes d'extraction-concentration à partir de broyats de tissus d'huîtres contaminés in-vitro

L'efficacité des 2 méthodes d'extraction-concentration (borate + PEG - glycine + floculation organique) est évaluée à partir de la contamination d'un broyat de tissus d'huîtres in-vitro par 1 ml d'une suspension de rotavirus simien SA 11 titrant de $3,3.10^3$ à $3,3.10^5$.

I - 1 - 2 - 1 : Méthodologie

30 à 50 g de tissus d'huîtres sont broyés à l'aide d'un appareil type "Waring-Blendor" pendant 5 minutes.

1 ml de suspension virale de titre connu est additionné à ce broyat. Le pH est ajusté à 5,5 à l'aide d'HCl 1N. Le mélange est agité pendant 2 heures à température ambiante, puis est soumis à une centrifugation à 1500 g pendant 15 minutes. Les virus non-fixés restent dans le surnageant. Le culot contenant les virus adsorbés est recueilli et soumis à l'analyse virologique.

I - 1 - 2 - 2 : Résultats

Résultats obtenus avec la méthode "borate + PEG" :

Les résultats sont présentés dans le tableau 14.

Au vu de ces premiers résultats, on constate que 8,7 à 25,4 % de la quantité virale initiale est retrouvée dans le surnageant après l'étape de contamination, ce qui indique que l'adsorption des virus sur les tissus broyés est incomplète. En outre, les rendements de récupération sont inconstants (2,1 à 66,4 %).

Masse du broyat	Quantité virale contaminante (F.F)	Virus non-fixés (virus dans le surnageant) (F.F)	Quantité virale récupérée à partir du culot (F.F)
30 g	$3,3.10^3$ ($1,6.10^3-5,02.10^3$)	$2,9.10^2$ ($2,4.10^2-3,5.10^2$) (8,7 %)	2.10^3 ($1,6.10^2-2,5.10^3$) (66,4 %)
44,5 g	$3,3.10^4$ ($1,6.10^4-5,02.10^4$)	$1,08.10^3$ ($2,7.10^2-1,5.10^3$) (3,2 %)	$1,3.10^3$ ($1,1.10^3-1,5.10^3$) (4 %)
45 g	$3,3.10^5$ ($1,6.10^5-5,02.10^5$)	$8,4.10^4$ ($6.10^4-1,1.10^5$) (25,4 %)	$5,2.10^3$ ($3,3.10^3-7.10^3$) (2,1 %)

Tableau 14 : Rendements de la méthode d'extraction concentration "borate + PEG" à partir de broyats contaminés in-vitro

Une modification des conditions d'adsorption est ensuite appliquée. Elle consiste à diluer au 1/10 les broyats de tissus dans de l'eau distillée avant inoculation de la suspension virale, de façon à faire chuter la conductivité du mélange.

Les résultats, obtenus avec cette modification du protocole de contamination, sont présentés dans le tableau 15.

Il apparaît que l'homogénéisation du mélange dilué dans l'eau distillée a considérablement amélioré l'adsorption des virus sur les tissus d'huîtres, puisque dans ces 2 cas sur 3, aucun virus n'est retrouvé dans le surnageant et dans le 3ème cas, la perte n'est que de 0,07 % de la quantité virale contaminante initiale. En ce qui concerne l'extraction-concentration des virus à partir des broyats contaminés, le rendement est très bon puisqu'il varie de 66,7 à plus de 100 %.

Les résultats obtenus démontrent l'efficacité de la méthode d'extraction-concentration "borate + PEG" appliquée à des broyats de tissus d'huîtres artificiellement contaminés in-vitro dans des conditions optimales.

Masse du broyat	Quantité virale contaminante (F.F)	Virus non-fixés (virus dans le surnageant) (F.F)	Quantité virale récupérée à partir du culot (F.F)
33 g	$3,3.10^3$ ($1,6.10^3$ - $5,02.10^3$)	0	$2,9.10^3$ ($1,8.10^3$ - $3,5.10^3$) (87,8 %)
25 g	$3,3.10^5$ ($1,6.10^5$ - $5,02.10^5$)	0	$4,2.10^5$ (4.10^5 - $4,5.10^5$) (>100 %)
42 g	$3,3.10^5$ ($1,6.10^5$ - $5,02.10^5$)	$2,4.10^2$ ($1,9.10^2$ - $2,8.10^2$) (0,07 %)	$2,2.10^5$ ($1,7.10^5$ - $2,4.10^5$) (66,7 %)

moyenne > 84,8 %

0 : inférieur à la limite de sensibilité

Tableau 15 : Rendements de la méthode d'extraction concentration "borate + PEG" à partir de broyats dilués au 1/10 et contaminés in-vitro

Résultats obtenus avec la méthode "glycine + floculation organique":

La contamination artificielle a été réalisée après dilution au 1/10 des broyats de tissus dans de l'eau distillée.

Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

Les rendements de récupération virale à partir de broyats artificiellement contaminés avec la méthode d'extraction-concentration "glycine + floculation organique" varient de 7,8 à 38,7 %. Ils sont nettement plus faibles que ceux observés avec la méthode "borate + PEG".

Masse de tissus	Quantité virale contaminante (F.F)	Virus non-fixés (virus dans le surnageant) (F.F)	Quantité virale récupérée (F.F)
41 g	$3,3 \cdot 10^3$ ($1,6 \cdot 10^3$ - $5,02 \cdot 10^3$)	$2,07 \cdot 10^2$ ($4,5 \cdot 10^1$ - $1,1 \cdot 10^3$) (6,2 %)	$1,2 \cdot 10^3$ ($6,3 \cdot 10^2$ - $2,1 \cdot 10^3$) (38,7 %)
42 g	$3,3 \cdot 10^4$ ($1,6 \cdot 10^4$ - $5,02 \cdot 10^4$)	$3,1 \cdot 10^3$ ($2,3 \cdot 10^3$ - $5 \cdot 10^3$) (9,3 %)	$6,8 \cdot 10^3$ ($4,6 \cdot 10^3$ - $9,6 \cdot 10^3$) (22,7 %)
50 g	$3,3 \cdot 10^5$ ($1,6 \cdot 10^5$ - $5,02 \cdot 10^5$)	0	$2,6 \cdot 10^4$ ($1,5 \cdot 10^3$ - $3,9 \cdot 10^3$) (7,8 %)

moyenne = 23 %

0 : inférieur à la limite de sensibilité

Tableau 16 : Rendements de la méthode d'extraction-concentration "glycine + floculation organique" à partir de broyats dilués au 1/10 et contaminés in-vitro

1 - 1 - 2 - 3 : Conclusion

La moyenne des pourcentages des rendements d'extraction-concentration des virus est de 23 % avec la méthode "glycine + floculation organique", et supérieure à 84,8 % avec la méthode "borate + PEG". **Ces quelques résultats confirment les observations précédentes, en faveur de la méthode "borate + PEG".**

Parallèlement à l'étude comparative des deux protocoles d'extraction-concentration, nous avons étudié l'influence potentielle sur le rendement de récupération virale de divers traitements associés à ces méthodes, notamment la congélation et la lyophilisation préalable.

I - 2 : INFLUENCE DE LA CONGELATION SUR LA RECUPERATION VIRALE

I - 2 - 1 : Congélation des tissus d'huîtres

Il nous a semblé intéressant de comparer les résultats obtenus lors d'analyses effectuées, d'une part à partir de tissus d'huîtres fraîchement prélevés et, d'autre part à partir des mêmes tissus après congélation de 7 jours à -20°C.

Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 17. L'interprétation est effectuée par comparaison des intervalles de confiance obtenus pour chacun des titres. Si les intervalles de confiance se recoupent, on admet qu'il n'y pas de différence significative entre les 2 résultats. S'ils ne se recoupent pas, il y a une différence significative.

méthode d'extraction- concentration	récupération virale dans les concentrats (F.F./g de tissu)		influence de la congélation sur le titre viral
	à l'analyse directe	après congélation	
glycine + floculation organique	$0,7 \cdot 10^1$ ($0,1 \cdot 10^{1*}$ - $1,7 \cdot 10^{1**}$)	$1,5 \cdot 10^1$ ($0,6 \cdot 10^1$ - $3,1 \cdot 10^1$)	N.S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$3,1 \cdot 10^2$ ($1,2 \cdot 10^2$ - $1,9 \cdot 10^3$)	$1,1 \cdot 10^3$ ($8,8 \cdot 10^2$ - $1,3 \cdot 10^3$)	N.S.
glycine + floculation organique	$5,3 \cdot 10^1$ ($2,2 \cdot 10^1$ - $1,03 \cdot 10^2$)	$1,1 \cdot 10^1$ ($0,02 \cdot 10^1$ - $6,3 \cdot 10^1$)	N.S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	0	$4 \cdot 10^1$ ($1,8 \cdot 10^1$ - $5,8 \cdot 10^1$)	S.
glycine + floculation organique	0	$0,5 \cdot 10^1$ ($0,01 \cdot 10^1$ - $3 \cdot 10^1$)	S.

*limite inférieure de confiance à 95%

0 : inférieur à la limite de sensibilité

**limite supérieure de confiance à 95%

N.S.: différence non significative

S. : différence significative

Tableau 17 : Comparaison des titres viraux obtenus à l'analyse directe et après congélation des tissus d'huîtres

Dans deux cas, la congélation des tissus avant analyse a permis la mise en évidence de virus non détectés lors de l'analyse immédiate. Dans les trois autres cas, la comparaison des quantités virales retrouvées ne permet pas de mettre en évidence une modification des taux de récupération virale après congélation.

La congélation des tissus, si elle n'augmente pas significativement la quantité de virus récupérés, semble permettre d'abaisser le seuil de sensibilité de la technique.

Dans ces conditions, l'association d'une congélation préalable aux techniques d'extraction-concentration précédemment étudiées peut être conseillée.

I - 2 - 2 : Congélation des concentrats d'huîtres

Des échantillons d'huîtres artificiellement contaminées in-vivo ont été soumis à l'extraction-concentration par les deux protocoles définis précédemment. Le concentrat obtenu a été divisé en deux parties égales. La première a été soumise à l'analyse immédiatement alors que la seconde était congelée à -20°C. pendant 7 jours puis soumise à l'analyse virologique, de façon à déterminer si la congélation des concentrats influençait le rendement de récupération des virus.

Résultats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 18.

Tous les résultats obtenus sont significativement différents.

Dans 6 cas sur 7, la récupération virale est significativement plus faible après congélation. Dans un seul cas, des virus ont été détectés après congélation alors que l'analyse s'était révélée négative avant congélation.

Ces résultats, en majorité plus faibles, sont sans doute dus à une modification de la texture du concentrat, ce qui aboutit, la plupart du temps, à une augmentation de la cytotoxicité.

Au vu de ces résultats, la congélation des concentrats ne doit pas être conseillée.

méthode d'extraction - concentration	récupération virale dans les concentrats (F.F./g de tissu)				Influence de la congélation sur le titre viral
	à l'analyse directe		après congélation		
		dilution non toxique		dilution non toxique	
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$4,3 \cdot 10^3$ ($3 \cdot 10^3$ *- $5,6 \cdot 10^3$ **)	1/10	$1,5 \cdot 10^2$ ($5,7 \cdot 10^1$ - $3,1 \cdot 10^2$)	1/10	S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$6,9 \cdot 10^2$ ($5 \cdot 10^2$ - $8,8 \cdot 10^2$)	1/2	$1,8 \cdot 10^2$ ($5,9 \cdot 10^1$ - $2,9 \cdot 10^2$)	1/5	S.
glycine + floculation organique	0	1/40	$1,6 \cdot 10^2$ ($7,3 \cdot 10^1$ - $3 \cdot 10^2$)	1/50	S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$2,4 \cdot 10^3$ ($1,7 \cdot 10^3$ - $3 \cdot 10^3$)	1/20	$1,2 \cdot 10^2$ ($5,7 \cdot 10^1$ - $2,1 \cdot 10^2$)	1/25	S.
glycine + floculation organique	$7 \cdot 10^3$ ($4,7 \cdot 10^3$ - $9,3 \cdot 10^3$)	1/30	$5,1 \cdot 10^1$ ($1 \cdot 10^1$ - $1,5 \cdot 10^2$)	1/50	S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$3,1 \cdot 10^3$ ($2,5 \cdot 10^3$ - $3,7 \cdot 10^3$)	1/30	$2,7 \cdot 10^1$ ($1,1 \cdot 10^1$ - $5,3 \cdot 10^1$)	1/30	S.
glycine + floculation organique	$1,2 \cdot 10^1$ ($0,03 \cdot 10^1$ - $6,8 \cdot 10^1$)	1/50	0	1/60	S.

*limite inférieure de confiance à 95%

**limite supérieure de confiance à 95%

N.S.: différence non significative

0 : inférieur à la limite de sensibilité

S. : différence significative

Tableau 18 : Comparaison des titres viraux obtenus
avant et après congélation des concentrats d'huîtres

I - 3 : INFLUENCE DE LA LYOPHILISATION SUR LA RECUPERATION VIRALE

Tout comme la congélation, l'utilisation du traitement par lyophilisation avait pour but, en modifiant la structure tissulaire, de favoriser l'extraction des virus.

La lyophilisation est pratiquée sur les tissus non-broyés d'un échantillon d'huîtres artificiellement contaminées in-vivo prélevées au hasard. Avant les analyses d'extraction-concentration des virus, les tissus sont réhydratés par un volume de PBS égal à la quantité d'eau perdue. (Nous avons pu évaluer, par comparaison des pesées avant et après lyophilisation, que les tissus d'huîtres étaient constitués à 94% d'eau).

Résultats

Les résultats sont exposés dans le tableau 19.

méthode d'extraction-concentration	récupération virale dans les concentrats (F.F./g de tissu)		influence de la lyophilisation sur le titre viral
	à l'analyse directe	après lyophilisation puis rehydratation	
glycine + floculation organique	$5,3 \cdot 10^1$ ($2,2 \cdot 10^1$ * - $1,03 \cdot 10^2$ **)	$5,1 \cdot 10^1$ ($2,1 \cdot 10^1$ - $1,03 \cdot 10^2$)	N.S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$1,6 \cdot 10^3$ ($1,2 \cdot 10^3$ - $1,9 \cdot 10^3$)	$1,5 \cdot 10^3$ ($1,1 \cdot 10^3$ - $1,9 \cdot 10^3$)	N.S.
glycine + floculation organique	$0,7 \cdot 10^1$ ($0,2 \cdot 10^1$ - $1,7 \cdot 10^1$)	$2,7 \cdot 10^3$ ($2 \cdot 10^3$ - $3,5 \cdot 10^3$)	S.
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	$3,1 \cdot 10^2$ ($2 \cdot 10^2$ - $4,2 \cdot 10^2$)	$1,5 \cdot 10^2$ ($8,9 \cdot 10^1$ - $2,1 \cdot 10^2$)	N.S.
glycine + floculation organique	0	0	N.S.

*limite inférieure de confiance à 95%

0 : inférieur à la limite de sensibilité

**limite supérieure de confiance à 95%

N.S.: différence non significative

S. : différence significative

Tableau 19 : Comparaison des titres viraux obtenus à l'analyse directe et après lyophilisation des tissus d'huîtres

Dans un cas, l'analyse effectuée avant ou après lyophilisation n'a pas permis l'isolement des virus. Dans une expérience, le titre viral est nettement supérieur après lyophilisation. Dans les trois autres cas, la récupération virale avant et après lyophilisation n'est pas significativement différente.

En fonction des premiers résultats obtenus, **le traitement par lyophilisation n'a pas été poursuivi car il n'apporte pas, sauf dans un cas, d'amélioration à la récupération virale.**

I - 4 : CONCLUSION

La congélation des concentrats et la lyophilisation des tissus de coquillages ne permettent pas d'améliorer les taux de récupération virale.

Par contre, on peut préconiser la congélation des tissus avant analyse. En effet, ce traitement semble abaisser le seuil d'efficacité des méthodes d'extraction-concentration.

Les deux protocoles d'analyse proposés donnent des résultats satisfaisants. Toutefois, de meilleurs rendements de récupération sont obtenus avec la méthode associant l'extraction par un tampon borate-3 % d'extrait de boeuf à deux précipitations par le P.E.G. 6000.

Au cours de ces différents essais, nous avons été gênés lors de la mise en évidence des virus sur cultures cellulaires par des phénomènes de cytotoxicité. En effet, les concentrats d'huîtres, surtout ceux obtenus après floculation organique, provoquent la destruction des tapis cellulaires, ce qui oblige à diluer fortement les inoculums.

Celà constitue un facteur limitant la précision de la quantification et par là-même la sensibilité de la méthode.

C'est pourquoi la suite de notre étude porte sur la mise au point de techniques de détoxification, appliquées aux concentrats de coquillages.

I - 5 : MISE AU POINT D'UN PROTOCOLE DE DETOXIFICATION DES CONCENTRATS PAR FILTRATION SUR GEL DE SEPHADEX LH 20

Nous avons appliqué aux concentrats d'huîtres une méthode de détoxification fondée sur une filtration à travers un gel de Sephadex LH 20 (cf "Matériel et Méthodes" chap.II - 3).

I - 5 - 1 : Détoxification par filtration sur Sephadex LH20

Le filtrat détoxifié est décontaminé puis inoculé pur ou dilué sur tapis cellulaires.

Résultats de la détoxification

Le tableau 20 rend compte de l'action détoxifiante de la filtration sur gel de Sephadex LH 20. Il apparaît que la filtration réduit la cytotoxicité des concentrats d'un facteur 2 à 10, et permet donc l'inoculation et la lecture de faibles dilutions. Dans un seul cas, un concentrat obtenu après précipitation par le PEG n'a pas été efficacement détoxifié après filtration.

méthode d'extraction- concentration	masse de tissus d'huîtres (g)	volume des concentrats à analyser (ml)	première dilution interprétable		diminution de toxicité d'un facteur
			sans filtration sur LH 20	après filtration sur LH 20	
glycine + floculation organique	52,7	48,8	1/10	1/2	5
	42	50	1/20	1/5	4
	31	33,8	1/20	1/10	2
	18	26,8	1/30	1/10	3
borate-3%extrait de boeuf + P.E.G. 6000	66,6	18,7	1/20	1/10	2
	52	34,8	1/5	1/5	1
	49,2	12,2	1/50	1/5	10
	22,6	11	1/10	1/2	5

Tableau 20 : Influence de la filtration sur la toxicité des concentrats

Ce protocole de détoxification a été établi, au départ, pour des concentrats représentant des échantillons d'environ 5 huîtres. Or, lors des études "sur le terrain", la quantité de coquillages par analyse doit être augmentée jusqu'à 10 huîtres, de façon à constituer un échantillon plus représentatif d'une contamination en milieu naturel.

La "texture" des concentrats obtenus est alors modifiée : si, dans le cas des concentrats obtenus après deux précipitations par le PEG 6000, cette modification n'influe pas sur le mode de détoxification, il n'en est pas de même pour les concentrats obtenus par floculation organique. Leur texture, beaucoup plus épaisse, entraîne un rapide colmatage du gel de Sephadex LH 20 et la détoxification par filtration n'est plus directement réalisable. Il a donc été nécessaire de modifier le protocole.

1 - 5 - 1 - 1 : *Modification du protocole de détoxification appliqué aux concentrats obtenus par floculation organique*

La modification du protocole consiste en une clarification préalable du concentrat, par centrifugation à pH 9, 1500 g et 4°C pendant 10 minutes.

Le surnageant obtenu contenant les virus est alors aisément filtré à travers le gel de Sephadex LH 20 et le filtrat est immédiatement amené à pH 7,2.

De façon à déterminer si la clarification préalable à pH 9 avait une influence sur la quantité de virus récupérés après détoxification, nous avons procédé à 5 essais au cours desquels des échantillons d'huîtres ont été soumis à une extraction-concentration selon la méthode "glycine+floculation organique". Chaque concentrat obtenu a ensuite été divisé en deux parties : La première a subi une détoxification directe par filtration sur gel de Sephadex LH 20, la seconde a d'abord été soumise à une clarification à pH 9 avant d'être filtrée sur Sephadex LH 20.

L'analyse des résultats rassemblés dans le tableau 21 a permis de déterminer l'influence de l'adjonction d'une clarification au protocole de détoxification sur la récupération virale:

Il apparaît dans 4 tests sur 5, que la clarification préalable ne provoque pas de réduction significative de la quantité de virus retrouvés. Dans un seul cas, la clarification du concentrat avant filtration fait significativement chuter le titre viral.

Récupération virale dans les concentrats (obtenus par flocul.organique) après détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH 20 (F.F./g de tissu)		Influence de la clarification sur la récupération virale
sans clarification préalable du concentrat	avec clarification préalable du concentrat	
4,7.10 ² (1,8.10 ² *-7,6.10 ² **)	2.10 ¹ (0-6.10 ¹)	S.
1,07.10 ² (1,8.10 ¹ -2,03.10 ²)	2,4.10 ¹ (0-5,5.10 ¹)	N.S.
2,07.10 ¹ (1,1.10 ¹ -3,5.10 ¹)	3,05.10 ¹ (1,3.10 ¹ -5,5.10 ¹)	N.S.
2,1.10 ¹ (1.10 ¹ -3,9.10 ¹)	1,7.10 ¹ (0,6.10 ¹ -3,5.10 ¹)	N.S.
2,8.10 ² (1,3.10 ² -4,3.10 ²)	3,4.10 ² (2,3.10 ² -4,5.10 ²)	N.S.

*limite inférieure de confiance à 95%

**limite supérieure de confiance à 95%

N.S.: différence non significative

S. : différence significative

Tableau 21 : Comparaison de la récupération virale après filtration , avec ou sans clarification préalable du concentrat

L'étape de clarification à pH 9 paraît donc pouvoir être ajoutée au protocole de détoxification des concentrats par floculation organique.

1 - 5 - 1 - 2 : Comparaison de la récupération virale avant et après détoxification

De façon à déterminer l'influence sur la récupération virale de la mise en oeuvre de la procédure de détoxification sur les concentrats, nous avons effectué une série d'expérimentations en utilisant les deux techniques d'extraction-concentration-détoxification différentes.

- Les concentrats obtenus par floculation organique sont divisés en deux parties : l'une est titrée directement, l'autre est soumise à une clarification à pH 9 puis à une détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH 20 avant titrage.

- Les concentrats obtenus par précipitation par le PEG 6000 sont divisés en deux parties : l'une est titrée directement, l'autre est détoxifiée par simple filtration (sans clarification préalable) sur gel de Sephadex LH 20 à pH 7,2.

Les résultats sont présentés dans le tableau 22.

En ce qui concerne les concentrats obtenus avec la première méthode (glycine+floculation organique), les résultats montrent qu'après filtration, leur cytotoxicité a chuté d'un facteur compris entre 4 et 10 dans 55 % des cas, inférieur à 4 dans 22 % des cas et supérieur à 10 dans 22 % des cas.

Il n'y a pas de différence significative du titre viral avant et après filtration dans 77 % des cas. Il y a une baisse significative dans 11 % des cas et une augmentation significative dans 11 % des cas.

En ce qui concerne les concentrats obtenus avec la deuxième méthode (borate+PEG 6000), les résultats montrent d'abord que la cytotoxicité initiale est nettement plus faible et ensuite qu'après filtration, la cytotoxicité a chuté d'un facteur compris entre 5 et 10 dans 33 % des concentrats, mais seulement d'un facteur compris entre 1 et 3 dans 66 % des cas.

De plus, si dans 22 % des cas il n'y a pas de différence significative du titre viral avant et après filtration, par contre, dans 77 % des cas, on constate une diminution statistiquement significative des quantités virales retrouvées après filtration sur gel de Sephadex.

En résumé, les concentrats obtenus par floculation organique présentent une toxicité élevée et doivent impérativement être soumis à une détoxification. La filtration sur gel de Sephadex LH 20 après clarification à pH 9 permet de réduire dans la majorité des cas, leur toxicité d'un facteur de 5 à 10, sans diminuer la sensibilité de la détection virale et en réduisant les intervalles de confiance des titres viraux.

Par contre, les concentrats obtenus après précipitation avec le PEG 6000 présentent une cytotoxicité nettement plus faible et la détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH 20 apporte moins d'améliorations puisque, d'une part la

RECUPERATION VIRALE (F.F./g) ET PREMIERE DILUTION INTERPRETABLE				influence de la filtration sur la récupération virale	réduction de toxicité d'un facteur
avant filtration	dilution	après filtration	dilution		
méthode "GLYCINE + FLOC. ORGANIQUE" :					
$2,9 \cdot 10^2$ ($1,1 \cdot 10^2$ - $6 \cdot 10^2$ **)	1/20	$3,4 \cdot 10^2$ ($2,3 \cdot 10^2$ - $4,5 \cdot 10^2$)	1/5	N.S	4
$1,4 \cdot 10^2$ ($6,5 \cdot 10^1$ - $2,7 \cdot 10^2$)	1/50	$0,75 \cdot 10^1$ ($0,2 \cdot 10^1$ - $1,7 \cdot 10^1$)	1/2	S.	25
$9,9 \cdot 10^1$ ($4,3 \cdot 10^1$ - $1,9 \cdot 10^2$)	1/40	$3,1 \cdot 10^2$ ($2,3 \cdot 10^2$ - $4 \cdot 10^2$)	1/5	S.	8
$9,2 \cdot 10^1$ ($4,3 \cdot 10^1$ - $1,4 \cdot 10^2$)	1/50	$8,9 \cdot 10^1$ ($2,8 \cdot 10^1$ - $1,5 \cdot 10^2$)	1/2	N.S	25
$5,3 \cdot 10^1$ ($2,2 \cdot 10^1$ - $1 \cdot 10^2$)	1/30	$1,2 \cdot 10^1$ ($0,4 \cdot 10^1$ - $2,7 \cdot 10^1$)	1/8	N.S	4
$5,1 \cdot 10^1$ ($2,1 \cdot 10^1$ - $1 \cdot 10^2$)	1/30	$5 \cdot 10^1$ ($3,5 \cdot 10^1$ - $6,8 \cdot 10^1$)	1/5	N.S	6
$4,8 \cdot 10^1$ ($0,04 \cdot 10^1$ - $1 \cdot 10^2$)	1/20	$2 \cdot 10^1$ ($0 - 6 \cdot 10^1$)	1/10	N.S	2
$3,8 \cdot 10^1$ ($1,1 \cdot 10^1$ - $8,6 \cdot 10^1$)	1/30	$3 \cdot 10^1$ ($1,3 \cdot 10^1$ - $5,5 \cdot 10^1$)	1/5	N.S	6
$1,6 \cdot 10^1$ ($0,3 \cdot 10^1$ - $4,8 \cdot 10^1$)	1/5	$1,7 \cdot 10^1$ ($0,6 \cdot 10^1$ - $3,5 \cdot 10^1$)	1/2	N.S	2,5
méthode "BORATE + P.E.G." :					
$5,5 \cdot 10^3$ ($3,9 \cdot 10^3$ - $1,4 \cdot 10^4$)	1/5	$2,7 \cdot 10^3$ ($2,1 \cdot 10^3$ - $3,2 \cdot 10^3$)	1/5	S.	1
$2,7 \cdot 10^3$ ($2,05 \cdot 10^3$ - $3,4 \cdot 10^3$)	1/5	$8,3 \cdot 10^2$ ($4,7 \cdot 10^2$ - $1,2 \cdot 10^3$)	1/2	S.	2,5
$1,4 \cdot 10^3$ ($9,8 \cdot 10^2$ - $1,8 \cdot 10^3$)	1/10	$4,4 \cdot 10^2$ ($3,2 \cdot 10^2$ - $5,7 \cdot 10^2$)	1/2	S.	5
$1,2 \cdot 10^3$ ($9,04 \cdot 10^2$ - $1,6 \cdot 10^3$)	1/20	$3,1 \cdot 10^1$ ($0,9 \cdot 10^1$ - $5,3 \cdot 10^1$)	1/2	S.	10
$3,1 \cdot 10^2$ ($2 \cdot 10^2$ - $4,2 \cdot 10^2$)	1/15	$4,2 \cdot 10^1$ ($2,2 \cdot 10^1$ - $6,2 \cdot 10^1$)	1/5	S.	3
$1,5 \cdot 10^2$ ($8,9 \cdot 10^1$ - $2,1 \cdot 10^2$)	1/10	$0,9 \cdot 10^1$ ($0,3 \cdot 10^1$ - $1,6 \cdot 10^1$)	1/5	S.	2
$2,8 \cdot 10^1$ ($0 - 5,6 \cdot 10^1$)	1/50	$0,8 \cdot 10^1$ ($0,2 \cdot 10^1$ - $1,4 \cdot 10^1$)	1/5	N.S	10
$0,4 \cdot 10^1$ ($0 - 1 \cdot 10^1$)	1/5	$0,07 \cdot 10^1$ ($0 - 2 \cdot 10^1$)	1/2	N.S	2,5
$0,2 \cdot 10^1$ ($0 - 0,8 \cdot 10^1$)	1/20	0	1/10	S.	2

*limite inférieure de confiance à 95%

**limite supérieure de confiance à 95%

N.S.: différence non significative

0 : inférieur à la limite de sensibilité

S. : différence significative

Tableau 22 : Récupération virale à partir des huîtres avant et après filtrations sur gel de Sephadex LH 20. selon les 2 méthodes d'analyse

toxicité est en général moins abaissée et d'autre part, les titres viraux obtenus après filtration sont significativement plus faibles que ceux obtenus pour les mêmes échantillons avant filtration sur Sephadex LH 20. Le seul avantage des traitements réside dans le fait qu'après détoxification il est possible d'inoculer sur les cultures cellulaires des concentrats purs (sans dilution) ce qui peut en cas de faible contamination des mollusques, permettre la mise en évidence des virus.

Parallèlement à l'étude de la filtration sur gel de Sephadex LH 20, nous avons testé deux autres traitements susceptibles de détoxifier les concentrats d'huîtres.

I - 5 - 2 : Essais d'autres traitements de détoxification

Ces essais ont seulement été réalisés à partir des concentrats obtenus par floculation organique.

Le premier traitement consiste à mélanger aux concentrats un volume égal de gel de Sephadex LH 20. Le second traitement consiste à mélanger aux concentrats du Sephadex G 50 en poudre dans la proportion de 0,5 g/ml de concentrat, selon la technique décrite pour la détoxification des concentrats d'eaux usées par ORAGUI et MARA (1989).

Le Sephadex G 50 est constitué de billes de dextran dont la porosité est de 25000 ; il retient en moyenne des substances, dont le poids moléculaire est supérieur à celles retenues par le LH 20, dont la porosité est de 4000.

Dans les deux cas, le mélange est homogénéisé quelques secondes, puis après sédimentation deux heures à température ambiante, le surnageant est prélevé et titré.

De façon à déterminer l'efficacité de ces traitements sur la détoxification des concentrats et leur influence sur la récupération virale, nous avons procédé à quelques expérimentations, au cours desquelles des échantillons d'huîtres, artificiellement contaminées in-vivo, ont été soumis à une extraction-concentration selon la méthode "glycine+floculation organique". Chaque concentrat a ensuite été fractionné en plusieurs parties, qui ont été soumises aux différents traitements de détoxification et titrés.

Le tableau 23 rassemble les résultats comparatifs obtenus sans détoxification, puis après filtration sur gel de Sephadex LH 20 (comme définie dans les paragraphes précédents) enfin, après simple mélange avec du Sephadex LH 20 d'une part, et du Sephadex G 50 d'autre part.

RECUPERATION VIRALE (F.F./ ml de concentrat)							
sans filtration	dilution non toxique	après filtration sur LH20	dilution non toxique	après mélange concentrat + LH20	dilution non toxique	après mélange concentrat + G50	dilution non toxique
$9,7 \cdot 10^2$ ($5 \cdot 10^2$ - $1,4 \cdot 10^3$)	1/50	$5,7 \cdot 10^2$ ($1,2 \cdot 10^2$ - $1,02 \cdot 10^3$)	1/10	$4,3 \cdot 10^2$ ($4 \cdot 10^1$ - $8,2 \cdot 10^2$)	1/10	N.D	1/15
$3,3 \cdot 10^2$ ($1,5 \cdot 10^2$ - $5 \cdot 10^2$)	1/50	$3,2 \cdot 10^2$ ($1 \cdot 10^2$ - $5,4 \cdot 10^2$)	1/2	$1,3 \cdot 10^3$ ($4,9 \cdot 10^2$ - $2,2 \cdot 10^3$)	1/15	/	/
$1,6 \cdot 10^2$ ($0,7 \cdot 10^2$ - $3,3 \cdot 10^2$)	1/40	$5,7 \cdot 10^2$ ($4,4 \cdot 10^2$ - $7,4 \cdot 10^2$)	1/5	$5,8 \cdot 10^2$ ($4,5 \cdot 10^2$ - $7,4 \cdot 10^2$)	1/15	$2,6 \cdot 10^2$ ($1,6 \cdot 10^2$ - $3,7 \cdot 10^2$)	1/8
$6,4 \cdot 10^1$ ($2,3 \cdot 10^1$ - $1,4 \cdot 10^2$)	1/30	$5,2 \cdot 10^1$ ($2,3 \cdot 10^1$ - $9,4 \cdot 10^1$)	1/2	$4,5 \cdot 10^1$ ($1,8 \cdot 10^1$ - $9,3 \cdot 10^1$)	1/15	$0,5 \cdot 10^1$ ($0,01 \cdot 10^1$ - $3,2 \cdot 10^1$)	1/20
$4,8 \cdot 10^1$ ($0,9 \cdot 10^1$ - $1,08 \cdot 10^1$)	1/60	$2,2 \cdot 10^1$ ($0,9 \cdot 10^1$ - $4,3 \cdot 10^1$)	1/5	$3,8 \cdot 10^1$ ($1,5 \cdot 10^1$ - $8 \cdot 10^1$)	1/15	/	/

*limite inférieure de confiance à 95%

**limite supérieure de confiance à 95%

/ : non-effectué

N.D : non détecté

Tableau 23 : Résultats comparatifs de différents traitements de détoxification, appliqués aux concentrats obtenus par floculation organique

L'analyse de ces résultats montre que :

- le traitement par mélange avec du Sephadex LH 20 provoque une réduction de cytotoxicité plus faible (dans 4 cas sur 5) que celle obtenue par filtration sur le même support. De plus, la récupération virale n'est pas significativement augmentée.
- Le traitement par mélange avec du Sephadex G 50 n'améliore ni la détoxification ni le rendement de récupération virale par rapport aux résultats obtenus par filtration sur gel de Sephadex LH 20.

I - 5 - 3 : Conclusion

La filtration sur gel de Sephadex LH 20 après clarification à pH 9 apparaît comme la meilleure méthode de détoxification des concentrats d'huîtres. Ceci est particulièrement net pour les concentrats obtenus après extraction-concentration par la méthode "glycine+floculation organique", pour lesquels la cytotoxicité est abaissée d'un facteur pouvant être compris entre 2 et 25.

Les résultats sont moins probants pour les concentrats obtenus après extraction-concentration avec la méthode "borate+PEG 6000". Dans ce cas en effet, la cytotoxicité est certes abaissée, mais dans des proportions plus faibles (d'un facteur souvent inférieur à 4) et de plus la récupération virale est significativement plus faible après filtration sur gel de Sephadex LH 20. Cependant, l'utilisation de cette technique devrait favoriser la mise en évidence de faibles contaminations virales chez les mollusques, car elle permet d'inoculer sur des cultures cellulaires les concentrats non dilués.

A l'issue de cette étude des conditions de mise en évidence des rotavirus à partir d'huîtres contaminées in-vivo et in-vitro, nous sommes en mesure de proposer une méthodologie adaptée à l'analyse virologique d'huîtres (Figure 17).

La deuxième partie de notre travail a consisté à évaluer les différentes méthodologies précédemment étudiées (2 méthodes d'extraction-concentration, congélation, détoxification) sur des huîtres naturellement contaminées par des virus en milieu marin, dans le but de confirmer ou d'infirmer les résultats obtenus en laboratoire.

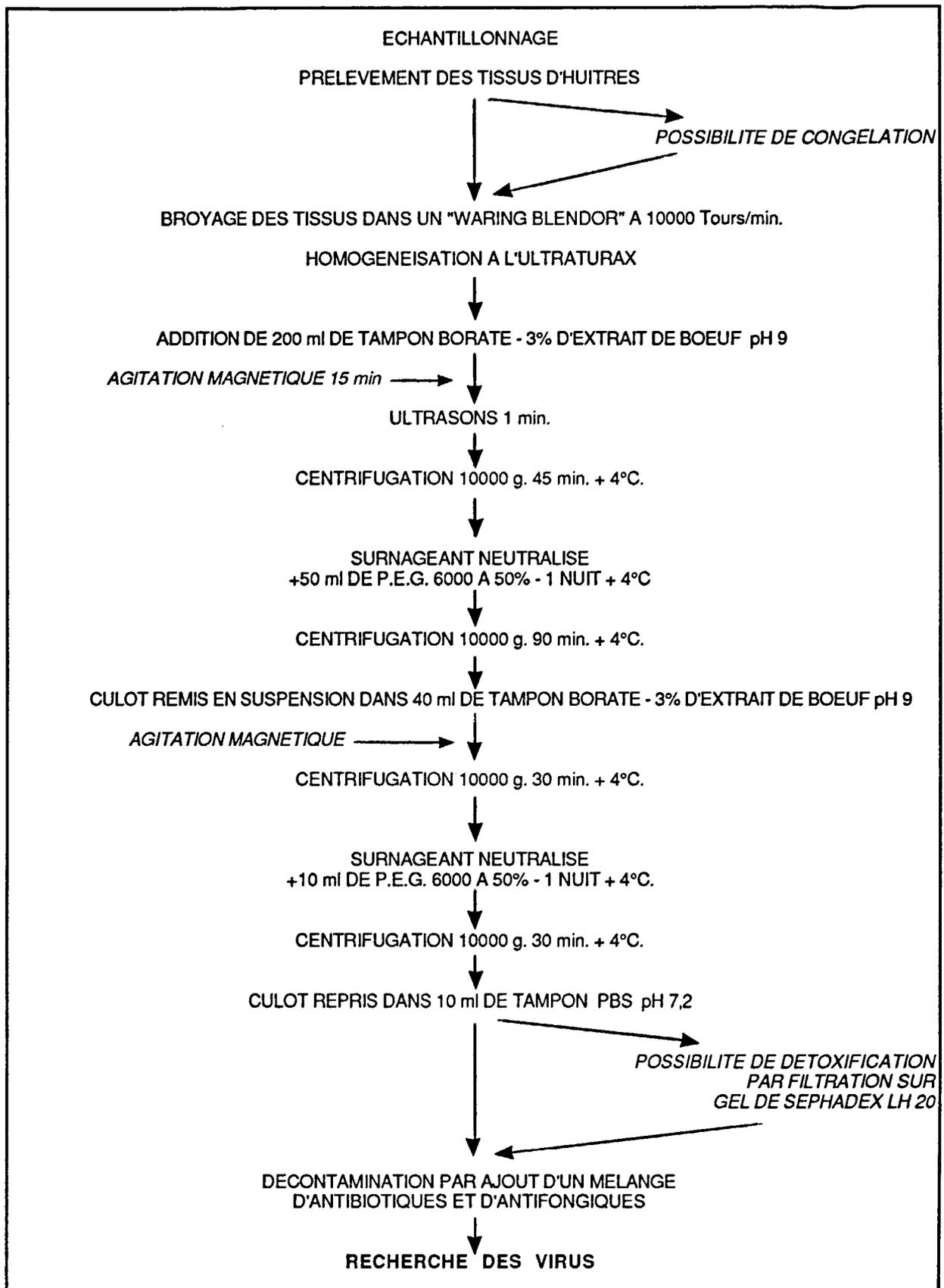


Figure 17.: Méthode préconisée pour l'analyse virologique des huîtres

CHAPITRE II : APPLICATION A LA DETERMINATION DE LA QUALITE SANITAIRE D'HUITRES ELEVEES EN ZONES CONTAMINEES (BAIE DE MORLAIX)

Parallèlement au travail de mise au point méthodologique, nous avons procédé, pendant un an, à des analyses mensuelles d'huîtres prélevées dans la baie de Morlaix, par l'IFREMER

II - 1 : ECHANTILLONNAGE

Des huîtres adultes ont été placées dans des zones de la baie de Morlaix plus ou moins fortement contaminées, d'une part avec des eaux urbaines en partie non traitées (rivière de Morlaix), d'autre part avec des rejets agricoles (rivière Dourduff).

- Désignation des lieux de prélèvement : (figure N° 18)

Point A : zone fortement contaminée/Dourduff en mer

Point B : zone moyennement contaminée/Carantec-Pors Treiz

Point D : installation conchylicole, type "bio", dans laquelle les huîtres sont placées pendant 72 heures en bassin d'eau de mer aérée en vue de leur épuration.

Quatre sortes d'échantillons ont été prélevés :

- Désignation des échantillons:

Ao : prélèvement effectué sur le point A le jour j_0 et conservé à +5°C pendant 3 jours

A1 : prélèvement effectué sur le point A le jour j_0+3 et expédié ce jour

B : prélèvement effectué sur le point B le jour j_0+3 et expédié ce jour

D : prélèvement effectué sur le point D le jour j_0+3 . Correspond au prélèvement Ao mis en bassin insubmersible aéré durant 72 heures.

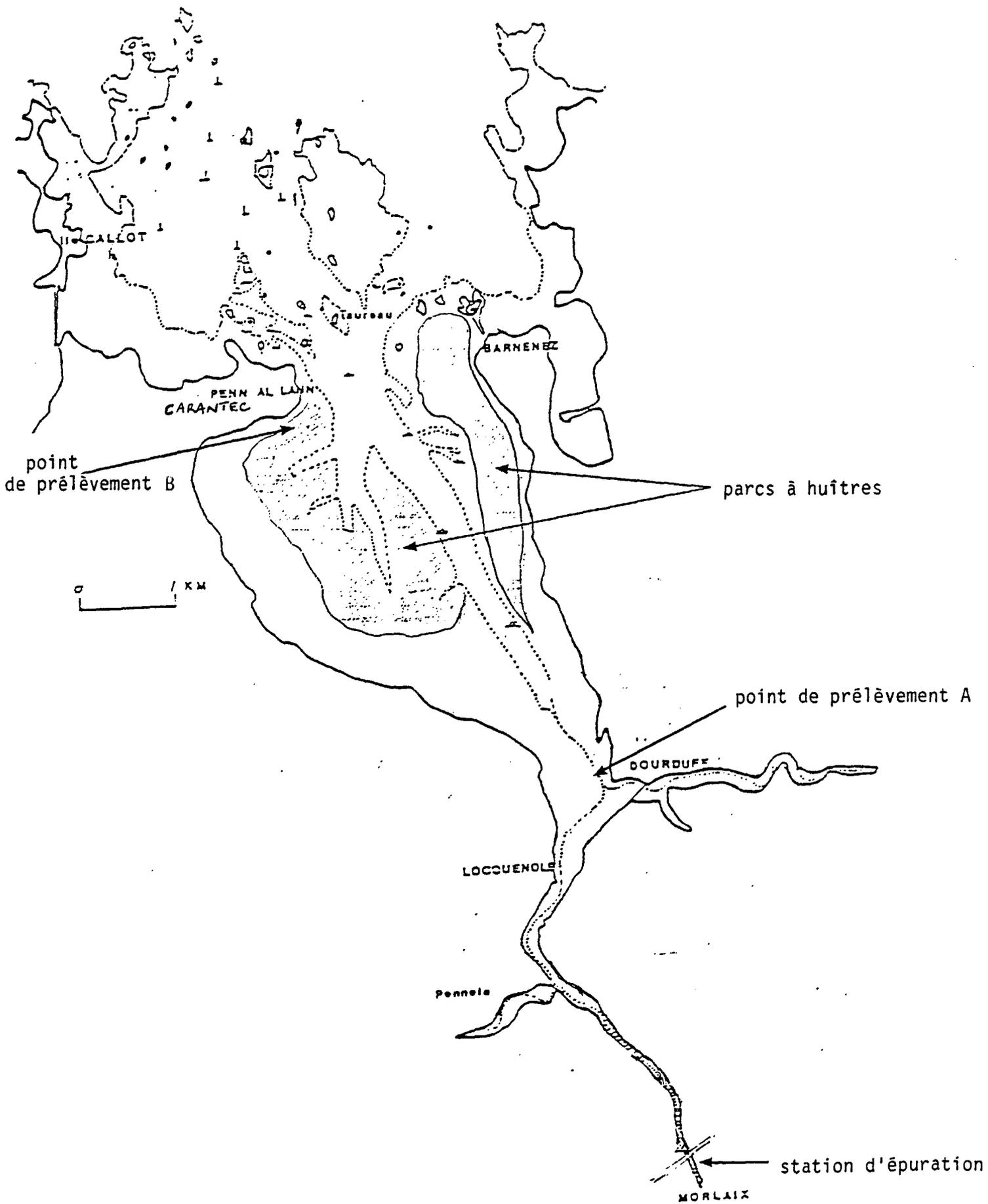


Figure 18 : Baie de Morlaix

Les échantillons sont envoyés par avion en caisson isotherme à +4°C et parviennent au laboratoire de Virologie (Nancy) dans les 24 heures suivant le ramassage.

II - 2 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES PRELEVEMENTS

Après extraction-concentration, nous avons recherché les rotavirus, les entérovirus cultivables et l'antigène du virus de l'hépatite A (VHA).

Les coliformes fécaux, les streptocoques fécaux et les salmonelles ont été recherchés parallèlement par le laboratoire I.F.R.E.MER de Concarneau.

II - 3 : TRAITEMENT DES PRELEVEMENTS

Chaque prélèvement est constitué d'une vingtaine d'huîtres.

A leur arrivée au laboratoire, les coquillages sont triés de façon à ne conserver que les huîtres vivantes. Ils sont répartis en deux lots et les tissus sont prélevés. La moitié des tissus subit l'analyse virologique immédiatement, dès réception, tandis que l'autre moitié est mise en congélation 7 jours à -20°C. A chaque échantillon sont appliquées deux méthodes d'extraction-concentrations (méthode "glycine+floculation organique" et méthode "borate+PEG") à partir d'un broyat commun.

Les concentrats obtenus ont été pour moitié soumis à une détoxification et pour moitié analysés directement.

Le protocole général suivi est résumé dans la figure 19.

II - 4 : RESULTAT DES ANALYSES MICROBIOLOGIQUES

II - 4 - 1 : Qualité microbiologique des huîtres provenant des zones conchyloles A et B (échantillons A1 et B)

Les résultats des analyses sont rassemblés dans le tableau 24.

Sur le plan virologique, on constate que sur 11 échantillons analysés 4 se sont révélés positifs. Tous provenaient de la zone A considérée comme insalubre.

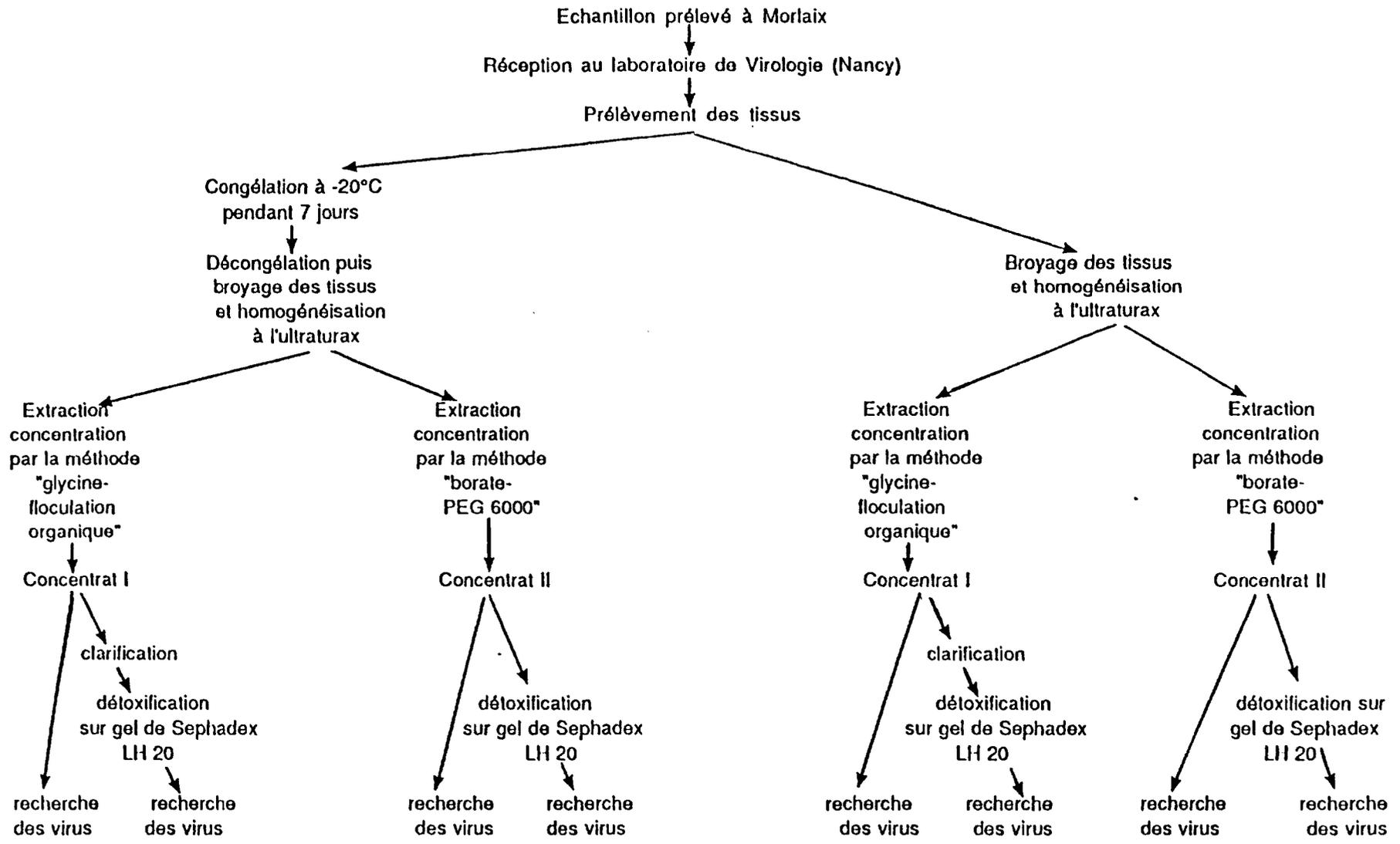


Figure 19 : Protocole général de l'analyse virologique appliquée aux échantillons de la baie de Morlaix

date du prélèvement	prélèvement	ROTAVIRUS (F.F./100 ml de broyat)	Ag du VHA	ENTEROVIRUS CULTIVABLES (/100 ml de broyat)	Colliformes fécaux (/100 ml de broyat)	Streptocoques fécaux (/100 ml de broyat)	Salmonelles (/25 g)
13 mars 1989	A1	0	-	0	258	1440	-
	B	0	-	0	5582	1440	-
17 avril 1989	A1	0	-	0	2790	2790	-
	B	0	-	0	<90	270	-
22 mai 1989	A1	246 (6-1370)	-	0	>72000	13800	+
	B	0	-	0	690	7200	-
5 juin 1989	A1	0	+	0	330	<90	-
3 juillet 1989	A1	0	+	0	2250	N.E	-
11 septembre 1989	A1	0	-	124 (68-295)	2790	220	-
9 octobre 1989	A1	0	-	0	7200	690	-
6 novembre 1989	A1	0	-	0	4500	3300	-

N.E : non-effectué

Tableau 24 : Résultats des analyses microbiologiques des huîtres (Echantillons A1 et B)

Dans ces conditions et en prenant en compte uniquement les prélèvements effectués sur la zone A, 4 échantillons sur 8 contenaient des virus ou des antigènes viraux.

L'échantillon du 22 mai 1989 contenait uniquement des rotavirus à la concentration de 246 F.F./100 ml de broyat de tissus.

Les échantillons du 5 juin et du 3 juillet 1989 renfermaient uniquement des antigènes du VHA.

L'échantillon prélevé le 11 septembre 1989 contenait des entérovirus à raison de 124 particules/100 ml de broyat de tissus.

Comparaison des charges virales et bactériennes

L'échantillon A1 du mois de mai, dans lequel des rotavirus ont pu être mis en évidence, étaient massivement "fécalisés" (72000 coliformes fécaux/100 ml) et positif en salmonelles.

Par contre, les échantillons prélevés en juin-juillet contenant de l'antigène du VHA et ceux prélevés en septembre renfermant des entérovirus, présentaient une contamination bactérienne moyenne (entre 2790 et 330 coliformes fécaux et entre 220 et 90 streptocoques fécaux/100 ml).

Au contraire, des échantillons présentant une contamination bactérienne du même ordre ou supérieure (prélèvements A d'avril, octobre, novembre et B de mars) se sont révélés négatifs sur le plan virologique.

Il apparaît qu'il n'existe pas de corrélation entre les résultats des analyses bactériologiques et virologiques des huîtres.

En ce qui concerne la recherche de l'antigène du VHA, nous remarquons 2 résultats positifs en juin et juillet, auxquels s'ajoutent 2 résultats positifs en Ao à la même époque (Tableau 25)

Il eut été intéressant de savoir si ces résultats correspondaient à une recrudescence de cas d'hépatite A à cette époque de l'année, parmi la population de la région de Morlaix. L'excrétion importante de particules virales dans les eaux usées aurait pu être à l'origine de la contamination des cours d'eau du bassin versant de la rivière de Morlaix, par là-même de la baie et atteindre la zone A1, proche des exploitations conchylicoles.

date du prélèvement	prélèvement	ROTAVIRUS (F.F./100 ml de broyat)	Ag du VHA	ENTEROVIRUS CULTIVABLES (/100 ml de broyat)	Coliformes fécaux (/100 ml de broyat)	Streptocoques fécaux (/100 ml de broyat)	Salmonelles (25 g)
13 mars 1989	Ao	0	-	0	258	2580	-
	D	0	-	0	<90	<90	-
17 avril 1989	Ao	17 (4-90)	-	0	7200	840	-
	D	0	-	0	<90	<90	-
22 mai 1989	Ao	0	-	0	4500	2790	+
	D	0	-	0	<90	<90	-
5 juin 1989	Ao	135 (3-750)	+	0	1290	270	-
	D	0	+	0	<90	<90	-
3 juillet 1989	Ao	0	+	0	>72000	N.E	+
	D	0	-	0	<90	<90	-
11 septembre 1989	Ao	0	-	200 (71-310)	108	690	+
	D	0	-	0	<90	<90	-
9 octobre 1989	Ao	0	-	0	<90	450	-
	D	0	-	0	<90	690	-
6 novembre 1989	Ao	0	-	0	13800	7200	+
	D	0	-	0	<90	450	-
4 décembre 1989	Ao	0	-	0	270	258	-
	D	0	-	0	N.E	N.E	-
22 janvier 1990	Ao	0	-	0	1290	<90	-
	D	0	-	0	<90	108	-
19 février 1990	Ao	0	-	10 (1-80)	2790	N.E	-
	D	0	-	0	<90	<90	-
19 mars 1990	Ao	0	-	0	1290	7200	-
	D	0	-	0	<90	<90	-

N.E : non-effectué

Tableau 25 : Résultats des analyses microbiologiques des huîtres, avant (éch. Ao) et après (éch. D) passage en bassin insubmersible de dégorgeant

Une enquête auprès des services sanitaires pourrait permettre de répondre à cette question. Malheureusement, aucune explication n'a pu être obtenue : en effet, à cette époque, l'hépatite A n'était déjà plus depuis 3 ans, une maladie à déclaration obligatoire et les cas d'infection n'étaient plus recensés.

II - 4 - 2 : Effet du séjour en bassin insubmersible sur la qualité microbiologique des huîtres

Des huîtres ont été prélevées dans la zone A et divisées en 2 échantillons.

L'un est conservé à +5°C pendant 3 jours (échantillon Ao) alors que le deuxième est placé en bassin insubmersible aéré pendant 3 jours (échantillon D).

Ces deux lots ont été analysés simultanément, de façon à ce que les résultats puissent être comparés et que soit déterminée l'influence du séjour des huîtres en bassin, sur leur qualité microbiologique.

Ces résultats sont rassemblés dans le tableau 25.

Nous pouvons constater que parmi les prélèvements, 5 lots étaient positifs avant épuration et qu'après épuration, 4 de ces lots ne contenaient plus de virus ou d'antigène du VHA. Par contre, dans un lot, contenant des rotavirus et du virus VHA avant traitement, il a pu être mis en évidence de l'antigène du VHA après séjour dans les bassins de dégorgement.

Dans ces conditions, il apparaît que le séjour, pendant 72 heures, dans un bassin insubmersible, a permis dans 4 cas sur 5 d'éliminer les virus des huîtres.

Cependant, dans 1 cas sur 5, ce traitement s'est révélé insuffisant, puisque l'antigène du VHA a été retrouvé dans les huîtres dépurées. **Cette technique ne présente pas une efficacité absolue pour l'élimination des virus**, alors que, sur le plan bactériologique, les normes de salubrité (300 coliformes fécaux/100 ml de broyat) sont atteintes dans 100 % des cas après traitement.

II - 4 - 3 : Etude de la variabilité des charges microbiennes des échantillons d'huîtres

Des lots d'huîtres ont été prélevés dans la zone A à trois jours d'intervalle, chaque mois, de mars à novembre 1989.

Le lot prélevé à jo (Ao), conservé à +5°C pendant 3 jours, et le lot prélevé à jo+3 (A1) ont été analysés simultanément à jo+4.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 26.

Nous constatons de très grandes variations du niveau de la contamination microbienne :

- d'une part entre les 16 échantillons prélevés au cours des 8 mois d'analyse:

Ainsi la teneur en coliformes fécaux varie de moins de 90 à plus de 72000 par 100 ml de broyat de tissus d'huître. De même, la concentration en streptocoques fécaux varie de 220 à 33000 par 100 ml de broyat.

Quant à la présence de virus, elle n'est observée que dans 8 échantillons sur 16; 2 contiennent des entérovirus, 3 de l'antigène du VHA seul, 2 des rotavirus seuls et 1 est contaminé à la fois par des rotavirus et du VHA.

- d'autre part, parmi les échantillons Ao et A1 prélevés à 3 jours d'intervalle:

Sur le plan bactériologique, ces variations inter-échantillons sont particulièrement marquées, par exemple, pour les échantillons Ao et A1 de juillet, septembre, octobre.

Sur le plan virologique, 3 couples de prélèvements Ao-A1 sont négatifs (mars, octobre, novembre), 2 sont positifs pour les mêmes virus, aussi bien en Ao qu'en A1 (juillet et septembre), 3 couples Ao-A1 donnent des résultats discordants :

-en avril, Ao contient des rotavirus et A1 prélevé 3 jours plus tard, au même endroit, est négatif.

-en mai, Ao est négatif alors que A1 recèle des rotavirus

-en juin, Ao et A1 sont positifs en antigène du VHA mais seul Ao contient des rotavirus.

On constate une grande variabilité dans la contamination microbienne de lots d'huîtres prélevés à 3 jours d'intervalle. Ce phénomène est probablement dû à des contaminations sporadiques et ponctuelles de l'eau environnante, le jour-même ou quelques jours avant, compte tenu du pouvoir d'accumulation des coquillages.

date du prélèvement	prélèvement	ROTAVIRUS (F.F./100 ml de broyat)	Ag du VHA	ENTEROVIRUS CULTIVABLES (/100 ml de broyat)	Coliformes fécaux (/100 ml de broyat)	Streptocoques fécaux (/100 ml de broyat)	Salmonelles (/25 g)
13 mars 1989	A0	0	-	0	258	2580	-
	A1	0	-	0	258	1440	-
17 avril 1989	A0	17 (4-90)	-	0	7200	840	-
	A1	0	-	0	2790	2790	-
22 mai 1989	A0	0	-	0	4500	2790	+
	A1	246 (6-1370)	-	0	>72000	13800	+
5 juin 1989	A0	135 (3-750)	+	0	1290	270	-
	A1	0	+	0	330	<90	-
3 juillet 1989	A0	0	+	0	>72000	N.E	+
	A1	0	+	0	2250	N.E	-
11 septembre 1989	A0	0	-	200 (71-310)	108	690	+
	A1	0	-	124 (68-295)	2790	220	-
9 octobre 1989	A0	0	-	0	<90	450	-
	A1	0	-	0	7200	690	-
6 novembre 1989	A0	0	-	0	13800	7200	+
	A1	0	-	0	4500	33000	-

N.E : non-effectué

Tableau 26 : Résultats des analyses microbiologiques des huîtres (échantillons A0 et A1)

Il est donc très difficile d'apprécier les charges bactériennes et virales moyennes des coquillages d'une zone conchylicole, à l'aide d'un échantillonnage aléatoire et ponctuel.

Cette constatation met en évidence la nécessité d'une étude portant sur la stratégie d'échantillonnage des coquillages, de façon à établir un modèle qui tiendrait compte de l'hétérogénéité des prélèvements et de la variabilité des résultats obtenus.

En conclusion, sur 36 échantillons analysés, 10 étaient positifs : 3 contenaient des rotavirus, 3 contenaient des entérovirus cultivables, 5 de l'antigène du VHA, dont 1 renfermait à la fois de l'antigène du VHA et des rotavirus.

Les résultats virologiques ont pu être comparés avec les résultats bactériologiques de ces mêmes échantillons. Il n'existe pas de corrélation entre les degrés de contamination bactériologique et virale des huîtres.

II - 5 : INFLUENCE DES METHODES D'ANALYSE

Au cours de cette étude, des méthodes d'analyse ont été comparées 2 à 2, à 3 niveaux :

- au niveau de la conservation des tissus d'huîtres (congélation / analyse directe)
- au niveau de l'extraction-concentration (méthode "glycine+floculation organique" et méthode "borate+PEG")
- au niveau de la détoxification (analyse directe ou après détoxification).

II - 5 - 1 : Influence de la congélation

Les tissus provenant d'un même lot d'huîtres ont été analysés soit directement, soit après congélation. Les résultats observés après congélation et ceux obtenus par analyse directe sont rassemblés dans le tableau 27, dans lequel seuls les résultats positifs obtenus par l'un ou l'autre protocole ont été retenus.

L'analyse du tableau de résultats permet de relever un certain nombre de points :

- sur 7 résultats positifs, aucun échantillon n'est positif à la fois par analyse directe et après congélation.
- l'analyse directe a permis 3 fois l'isolement de virus ou d'antigène
- l'analyse, après congélation, a permis l'isolement de virus ou d'antigène du VHA 4 fois
- pour les entérovirus cultivables et l'antigène du VHA, 2 sur 3 ont été isolés après congélation

VIRUS MIS EN EVIDENCE	ANALYSE DIRECTE SANS CONGELATION	ANALYSE APRES CONGELATION
<i>ROTAVIRUS</i>	+	-
<i>ENTEROVIRUS CULTIVABLES</i>	+ - -	- + +
<i>Antigène du VHA</i>	+ - -	- + +

Tableau 27 : Résultats de l'analyse des lots d'huîtres congelés et non-congelés

Par conséquent, il semble judicieux d'appliquer simultanément à chaque échantillon une analyse directe et une analyse après congélation, car le traitement par congélation appliqué aux tissus d'huîtres, permet de mettre en évidence des virus non-détectés à l'analyse directe et par là-même, d'augmenter la sensibilité de la méthode.

II - 5 - 2 : Influence de la méthode d'extraction-concentration

Chaque lot d'huître a été soumis aux 2 méthodes d'extraction-concentration ("borate+P.E.G." et "glycine+floculation organique"). Les résultats concernant uniquement les échantillons positifs sont indiqués dans le tableau 28.

La méthode "borate+PEG" s'est révélée la plus efficace puisqu'elle a permis la détection de virus dans 9 échantillons sur 11. Cette méthode semble particulièrement valable pour la recherche de l'antigène du virus VHA, puisqu'elle seule a permis sa mise en évidence.

Par contre, la méthode "glycine + floculation organique" n'a permis la mise en évidence de virus que dans 2 cas sur 11.

VIRUS MIS EN EVIDENCE	METHODE "BORATE+P.E.G."	METHODE "GLYCINE+FLOCCULATION ORGANIQUE"
<i>ROTAVIRUS</i>	-	+
	+	-
	+	-
<i>ENTEROVIRUS CULTIVABLES</i>	-	+
	+	-
	+	-
<i>Antigène du VHA</i>	+	-
	+	-
	+	-
	+	-
	+	-

Tableau 28 : Résultats de l'analyse des lots d'huîtres par les 2 méthodes d'extraction-concentration

En conclusion, il apparaît que la méthode "borate+PEG" est la plus efficace pour la mise en évidence d'antigènes viraux et de virus indigènes à partir d'échantillons d'huîtres.

II - 5 - 3 : Influence de la détoxification des concentrats

Le traitement de détoxification n'a été appliqué aux concentrats, que pour la recherche des rotavirus et entérovirus sur cultures cellulaires. Il est en effet inutile pour la recherche de l'antigène du VHA qui est réalisé par une technique immunologique, sans cultures cellulaires.

Ce traitement consiste à traiter les concentrats, quelle que soit leur origine par filtration sur gel de Sephadex LH 20.

Les résultats concernant uniquement les échantillons qui se sont révélés positifs, soit par analyse directe, soit après détoxification sont rassemblés dans le tableau 29.

VIRUS MIS EN EVIDENCE	ECHANTILLONS OBTENUS PAR :			
	Méthode "borate + P.E.G."		Méthode "glycine+floculation organique"	
	sans détoxification	après détoxification	sans détoxification	après détoxification
<i>ROTAVIRUS</i>	- -	+ +	+ -	+ +
<i>ENTEROVIRUS CULTIVABLES</i>	+ -	+ +	- -	+ +

Tableau 29 : Influence de la détoxification sur les résultats d'analyse

L'analyse des résultats montre que sans détoxification, seulement 2 échantillons sur 6 se sont révélés positifs, alors qu'après détoxification tous les échantillons sont positifs.

La détection virale est donc optimale après détoxification, quelle que soit l'origine du concentrat détoxifié (obtenu après floculation organique ou après précipitation par le PEG).

Dans le cas de l'analyse des huîtres de la baie de Morlaix, il apparaît, à posteriori, qu'il eut été possible d'alléger le protocole d'analyse en ne testant que les concentrats détoxifiés.

En conclusion, nous pouvons dire que les résultats obtenus à partir d'huîtres naturellement contaminées "sur le terrain", confirment les conclusions apportées à l'issue des mises au point méthodologiques (chapitre I) et la validité du protocole d'analyse que nous avons proposé.

En ce qui concerne le rôle de la détoxification par filtration sur Sephadex LH 20, cette étude de terrain confirme nettement la remarquable efficacité et la nécessité de son utilisation systématique pour l'analyse virologique des fruits de mer.

CHAPITRE III : EPURATION VIRALE DES HUITRES

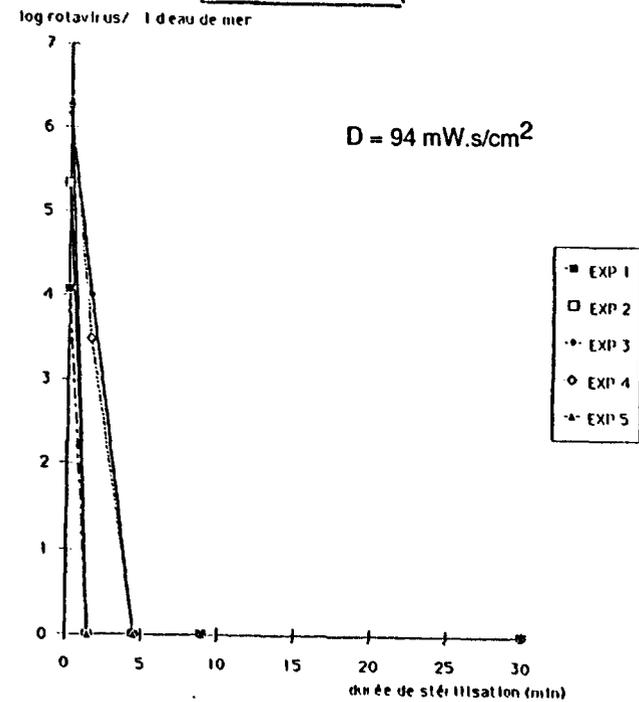
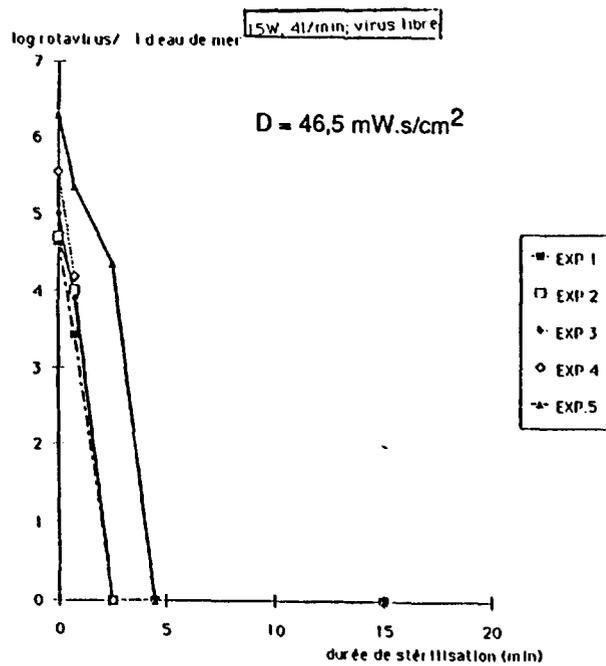
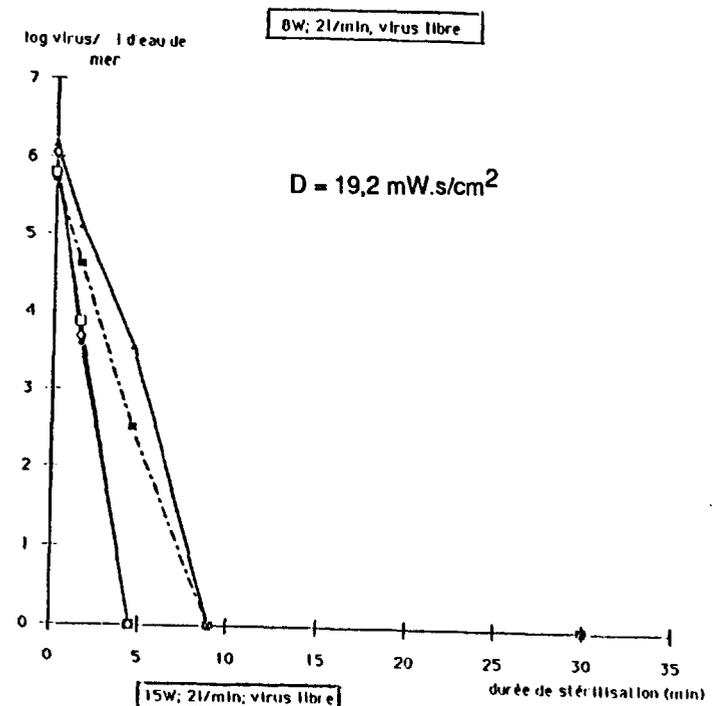
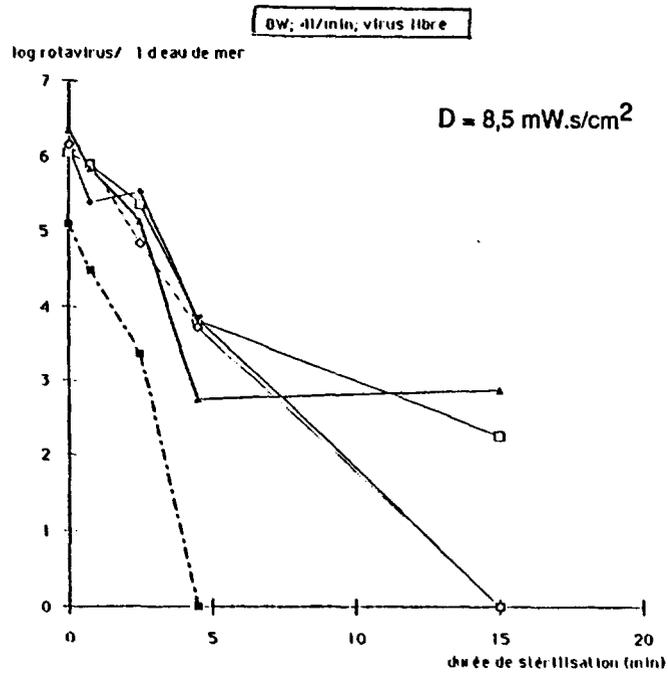
Le travail portant sur l'épuration des huîtres a été réalisé en 2 phases :

- une phase en laboratoire,
- une phase en installation pilote.

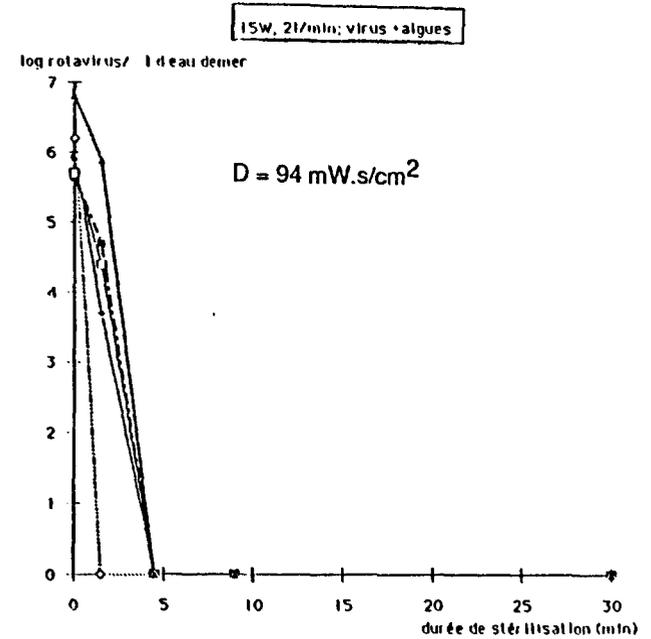
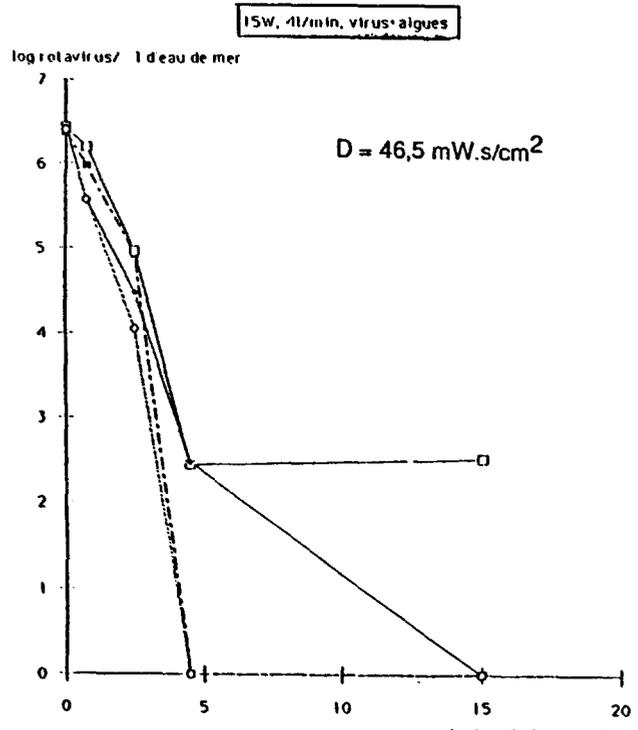
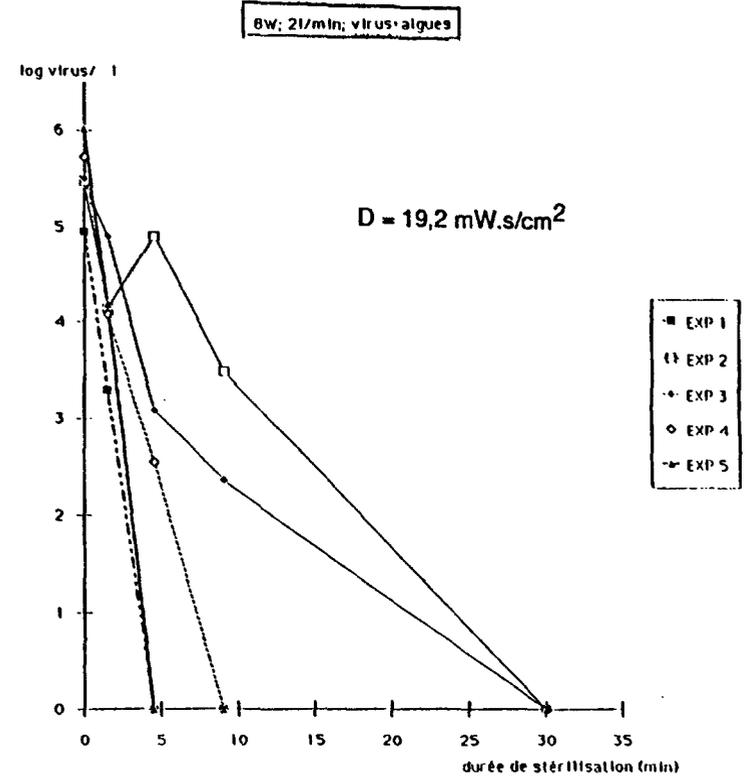
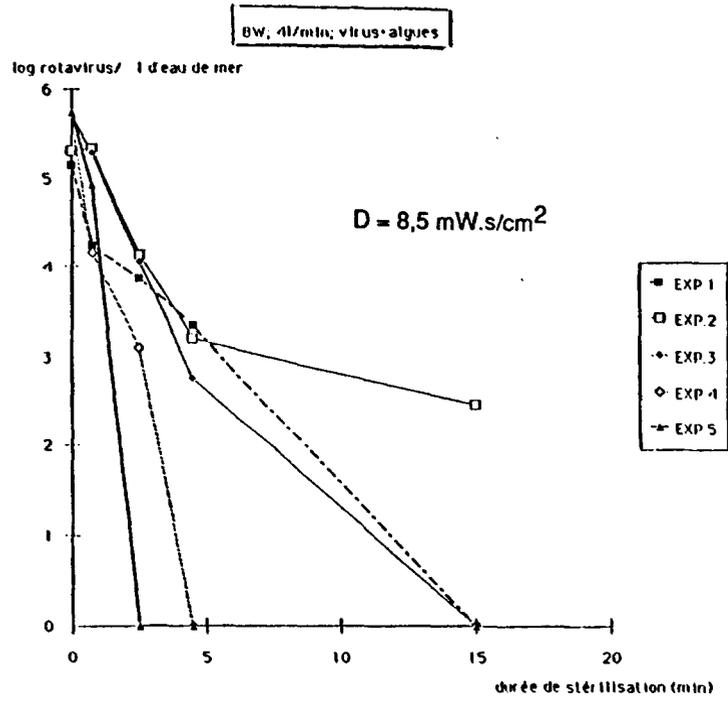
III - 1: ETUDE EXPERIMENTALE EN LABORATOIRE DE L'EPURATION VIRALE DES HUITRES

Cette étude a été réalisée à partir d'huîtres préalablement contaminées artificiellement in-vivo par du rotavirus simien SA 11 fixé sur des algues unicellulaires. Leur décontamination s'est effectuée dans un dispositif expérimental (photo 2) permettant l'épuration des huîtres selon 2 procédés :

Figures 21 à 24 : Action des U.V. sur les rotavirus libres.



Figures 25 à 28 : Action des U.V. sur les rotavirus fixés sur les algues



- soit dans un circuit fermé, où l'eau de mer subit un traitement en continu par les U.V.,
- soit dans un circuit semi-ouvert, où l'eau de mer non traitée est renouvelée toutes les 24 heures.

Photo 2 : Dispositif expérimental d'épuration

De façon à disposer d'un ensemble expérimental satisfaisant pour l'évaluation de l'efficacité des systèmes d'épuration, des expérimentations préliminaires se sont avérées nécessaires.

III - 1 - 1 : Etudes préliminaires

Pour déterminer la cinétique de décontamination d'huîtres dans des conditions satisfaisantes, il est nécessaire de disposer au départ d'huîtres massivement contaminées. C'est pourquoi dans un premier temps, nous avons cherché à déterminer quelle était la durée optimale de séjour des huîtres dans l'eau contenant les rotavirus, pour obtenir une contamination maximale des mollusques.

Dans un deuxième temps, il a été nécessaire de choisir et de tester une méthode d'analyse permettant de mesurer la quantité virale présente dans l'eau de mer pendant le déroulement des opérations d'épuration.

Enfin, le troisième point envisagé a été l'étude de l'action des rayons U.V. sur les rotavirus dans l'eau de mer.

III - 1 - 1 - 1 : Détermination de la durée optimale de contamination des huîtres par les rotavirus

Pour tester l'efficacité d'une méthode de décontamination, il est nécessaire de pouvoir disposer d'un lot de coquillages massivement contaminés au départ.

GAILLOT *et al.* (1988) avaient montré, dans notre laboratoire, que l'absorption d'une quantité maximale de poliovirus type 1 par les moules est obtenue après seulement 1 heure de séjour dans l'eau contaminée.

Il nous a cependant semblé nécessaire de déterminer, pour les rotavirus, quelle était la durée de séjour optimale pour obtenir une contamination maximale des huîtres.

9 expérimentations ont été réalisées afin de comparer les taux d'accumulation virale par des huîtres séjournant pendant 1, 4 et 8 heures dans de l'eau contaminée par différentes quantités de rotavirus fixés sur des algues *Dunaliella primolecta*.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau 30 et visualisés sur la figure 20.

A la lecture des résultats, il apparaît que le taux de contamination des huîtres est extrêmement variable d'une expérience à l'autre et qu'il n'est pas proportionnel à la concentration virale de l'eau de mer contaminante.

Le taux moyen de contamination virale semble à priori nettement plus élevé après 1 heure et 4 heures de séjour dans l'eau contenant les virus, qu'après 8 heures. La comparaison des résultats, par un test non-paramétrique (test de Wilcoxon), montre que les quantités virales retrouvées après 1 heure ne sont pas significativement plus élevées, que celles obtenues après 4 heures. En revanche,

les contaminations observées après 8 heures de séjour sont statistiquement plus faibles qu'après 1 heure

Expérience	Quantité de virus dans l'eau de mer F.F./ml	Quantités de virus (F.F.) / g de tissu		
		Après 1 heure	Après 4 heures	Après 8 heures
Exp. 1	15,3 (8,8-25,5)	0,9 (0,02-5,3)	1,1 (0,08-6,4)	N.D.
Exp. 2	26,6 (19,5-35,2)	131 (110-155)	60,7 (46,2-77,8)	3 (1-7)
Exp. 3	62,1 (28,5-95,6)	23 (15,1-33)	8,4 (4,8-13,4)	17,2 (11,3-24,7)
Exp. 4	74 (51-97)	22,4 (14,3-32,4)	10,4 (4,7-19,4)	10,3 (5,1-18,5)
Exp. 5	76 (65-88)	18,7 (12,3-27)	5,1 (1,8-18,4)	0,71 (0,01-3,9)
Exp. 6	143 (89-196)	12,4 (7,1-19,7)	19 (13,6-25,3)	58,3 (48,2-69,5)
Exp. 7	166 (107-219)	276 (178-380)	290 (215-392)	106 (66-203)
Exp. 8	278 (181-374)	78,2 (64,6-93,3)	50,8 (40-64)	9,2 (5,5-14,1)
Exp. 9	522 (429-626)	65,5 (53,4-79,2)	73,6 (61,1-87,5)	19,7 (14,4-26,1)
		m ₁ =69,7	m ₄ =57,6	m ₈ =24,9

Tableau 30 : Contamination virale après 1, 4 et 8 heures de séjour dans l'eau contaminée

En fonction de ces résultats, la durée de séjour de 1 heure dans le bac de contamination, permettant un taux de contamination optimal des huîtres tout en facilitant les conditions d'expérimentation, a été choisie pour la suite des travaux sur l'épuration des huîtres.

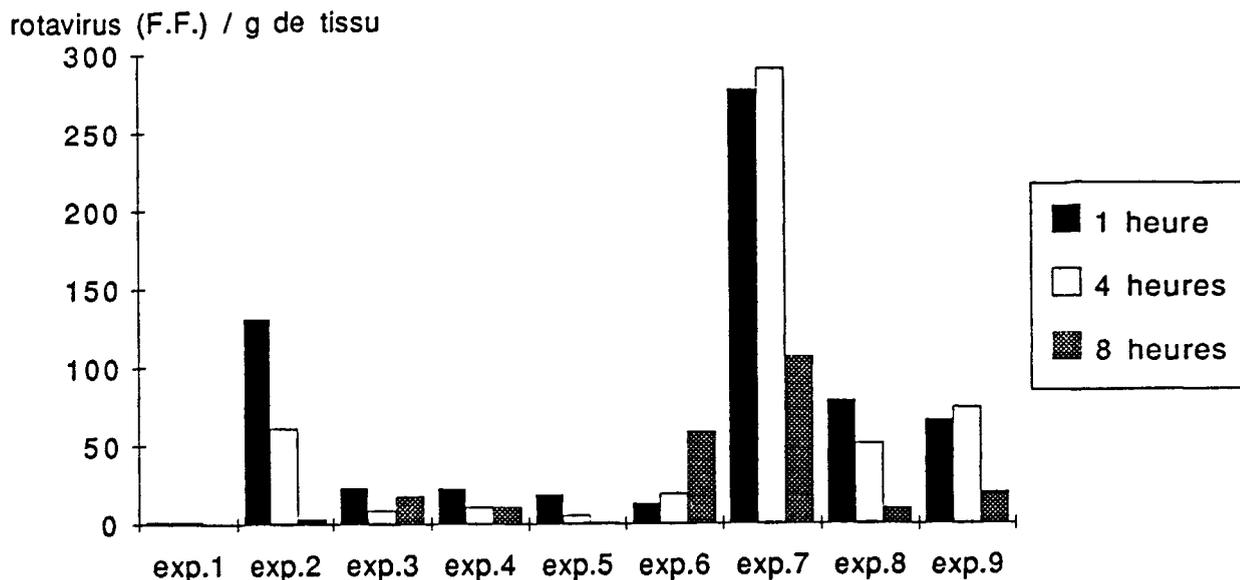


Figure 20 : Accumulation virale par les huîtres soumises à des taux de contamination croissants pendant 1 heure, 4 heures et 8 heures.

III - 1 - 1 - 2 : Définition de la méthodologie d'analyse virologique de l'eau de mer

Lorsque la détermination du titre viral d'un échantillon d'eau de mer est réalisée par titrage direct, le seuil de détection des rotavirus est de 1 particule virale par ml. Or, pour mener à bien l'évaluation des propriétés inactivantes des rayons ultra-violetts sur les rotavirus dans notre système expérimental, il est indispensable de travailler avec des concentrations virales beaucoup plus faibles.

Il est donc nécessaire de procéder à une concentration des rotavirus dans l'échantillon l'eau avant titrage pour abaisser le seuil de détection.

Plusieurs techniques de concentration des virus dans l'eau pouvaient être utilisées : adsorption-élution sur poudre de verre, ou sur fibre de verre chargée positivement ou négativement, ultrafiltration tangentielle, précipitation par floculation organique ou par le polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000).

Compte tenu du faible volume d'eau disponible pour l'analyse, nous avons choisi d'évaluer l'efficacité respective de la concentration par précipitation avec le

PEG 6000, et du titrage direct.

La méthodologie utilisée a consisté à contaminer artificiellement, avec 1 ml d'une suspension de rotavirus simien SA 11 de titre connu, des échantillons de 80 ml d'eau de mer. Après 15 minutes d'homogénéisation, le titre de l'eau de mer est déterminé par prélèvement direct d'un aliquot d'1 ml, et après concentration du volume restant par le PEG 6000.

Les titres viraux obtenus par inoculation directe, et après concentration par le PEG 6000, sont présentés dans le tableau 31.

On constate que dans 6 cas sur 8 (les derniers titrages n'étant pas comparables), le titre viral de l'eau de mer est plus élevé après concentration par le PEG 6000, que par prélèvement direct. De plus, à 3 reprises, cette méthode permet de mettre en évidence une quantité virale indétectable par titrage direct. Cependant la mise en oeuvre d'un test non-paramétrique (test du signe) montre qu'il n'y a pas de différence significative entre les deux séries de résultats.

Ainsi, cette méthode de concentration des virus par le PEG 6000 peut être appliquée lorsque les quantités virales présentes dans l'eau sont susceptibles d'être inférieures au seuil de détection par titrage d'une prise d'essai directe.

Toutefois, la relative lourdeur de sa mise en oeuvre en fait une méthode difficilement applicable systématiquement pour tout titrage de virus dans l'eau de mer.

III - 1 - 1 - 3 : Action des rayons U.V. sur les rotavirus dans l'eau de mer

L'efficacité des U.V. sur les rotavirus est évaluée dans le système expérimental décrit dans le chapitre."Matériel et Méthodes" :

Quantité de rotavirus (F.F) /ml d'eau de mer	
par titrage direct	après concentration par le PEG 6000
527 (434-631)	210 (146-278)
43,5 (30-60,6)	190 (136-246)
25 (15-38,2)	111 (79,2-143)
14,1 (2,3-30,2)	2 (0,08-9,1)
4 (0,9-7,2)	11 (1,7-20,5)
1 (0,05-6,3)	2,5 (0,06-14)
<1	5,08 (2,3-8,7)
<1	3,7 (1,8-6,9)
<1	0,2 (0,006-1,6)

Tableau 31 : Comparaison du titre viral de l'eau de mer obtenu par titrage direct et après concentration par le PEG 6000

- avec 2 lampes 8W et 15W,
- avec 2 débits applicables 2l/min et 4l/min,
(soit 4 doses germicides différentes)
- sur des rotavirus libres et fixés sur des algues unicellulaires (*Dunaliella primolecta*)

3 litres d'eau de mer stérile, placés dans les circuits d'épuration équipés de lampes U.V., sont artificiellement contaminés par une suspension de rotavirus simien SA 11 de titre connu, de façon à obtenir une concentration finale théorique comprise entre 10^4 et 10^6 particules par litre.

Après 15 minutes de fonctionnement du circuit d'eau (homogénéisation de la contamination), sans branchement des lampes U.V., un aliquot de 10 ml est prélevé pour déterminer le titre viral initial de l'eau de mer par titrage direct.

Des prélèvements de 80 ml d'eau de mer sont ensuite effectués après 1, 3, 6 et 20 passages devant la lampe U.V. en fonctionnement. Les virus y sont concentrés par précipitation avec le PEG 6000 et le titrage est réalisé sur le concentrat.

Le tableau 32 indique les durées de stérilisation correspondant aux nombres de passages.

lampe	débit	dose U.V. (mW.s/cm ²)	durée de stérilisation	nombre de passages devant la lampe	durée réelle d'exposition aux U.V.
8W	2 l/min	19,2	1 min 30 4 min 30 9 min 30 min	1 3 6 20	2,3 s 6,9 s 14 s 46 s
	4 l/min	8,5	45 s 2 min 30 4 min 30 15 min	1 3 6 20	1,2 s 3,6 s 7,2 s 24 s
15W	2 l/min	94	1 min 30 4 min 30 9 min 30 min	1 3 6 20	17 s 51 s 1 min 40 5 min 40
	4 l/min	46,5	45 s 2 min 30 4 min 30 15 min	1 3 6 20	8,5 s 25,5 s 51 s 2 min 50

Tableau 32 : Durées de stérilisation et nombre de passages correspondants

Pour chaque dose germicide testée, 5 essais sont effectués d'une part avec des virus libres, d'autre part avec des virus fixés sur les algues unicellulaires.

Action des U.V. sur les rotavirus libres

En annexe 9, sont rassemblées les valeurs du titre viral de l'eau en fonction du temps de stérilisation.

Les résultats sont exposés sur les figures 21 à 24.

Pour la dose germicide la plus faible ($8,5 \text{ mW.s/cm}^2$), l'inactivation des rotavirus présents initialement à une concentration de $10^5/l$ est très rapide et complète en moins de 5 minutes de traitement. En revanche, lorsque la quantité initiale est de l'ordre de $10^6/l$, la cinétique d'inactivation est moins rapide : pendant les 5 premières minutes, les pentes des droites d'inactivation sont superposables, comparables à celle observée avec une contamination initiale de 10^5 . Mais après 5 minutes, on constate un ralentissement du taux d'inactivation.

Dans 2 cas sur 5, la disparition des virus est incomplète après 15 minutes (persistance de $5 \cdot 10^2$ à 10^3 particules/l) alors que pour 2 autres expérimentations l'inactivation est totale en 15 minutes.

Pour la dose germicide de $19,2 \text{ mW.s/cm}^2$, les quantités virales initiales sont de l'ordre de 10^6 virus/l dans les 5 expérimentations. On constate une rapide inactivation: dans 2 cas, elle est complète dès 5 minutes et dans les 3 autres cas après 10 minutes de traitement.

Aux doses germicides de $46,5$ et 94 mW.s/cm^2 , les cinétiques d'inactivation sont très rapides, quelle que soit la contamination de départ. Après 5 minutes, aucun virus n'est détecté dans l'eau.

Action des U.V. sur les rotavirus fixés sur les algues

En annexe 10, sont rassemblées les valeurs du titre viral de l'eau en fonction du temps de stérilisation.

Les résultats sont exposés sur les figures 25 à 28.

A la dose germicide de $8,5 \text{ mW.s/cm}^2$, les cinétiques d'inactivation sont variables, malgré des contaminations de départ comparables pour les 5 expérimentations (environ $5 \cdot 10^5/l$).

Après 5 minutes de traitement, dans 2 cas sur 5, l'inactivation est complète alors que dans les 3 autres cas, la quantité de virus présente dans l'eau est encore de l'ordre de $10^3/l$. Elle décroît ensuite, et dans 2 cas sur 3, aucun virus n'est détecté après 15 minutes. Par contre dans 1 expérimentation, il reste encore 5.10^2 particules virales/l après 15 minutes.

A la dose germicide de $19,2 \text{ mW.s/cm}^2$, après 5 minutes, l'inactivation est complète dans 2 cas sur 5, malgré des contaminations de départ très différentes (10^5 et $10^6/l$). Dans les 3 autres cas, de contamination virale initiale de l'ordre de $5.10^5/l$, on retrouve encore après ce délai de 5 minutes, 5.10^2 à 10^5 particules virales/l. Après 10 minutes, 1 échantillon ne contient plus de virus alors que pour les 2 autres, la contamination est encore de 5.10^2 à 5.10^3 virus/l. Mais après 30 minutes, aucun virus n'est détecté dans ces échantillons.

A la dose germicide de $46,5 \text{ mW.s/cm}^2$, malgré les fortes contaminations de départ ($5.10^6/l$), les cinétiques d'inactivation sont très rapides et après 5 minutes, 2 prises d'essais sur 4 ne contiennent plus de virus. Les 2 autres renferment encore environ 5.10^2 particules/l. Après 15 minutes dans 1 cas, ce titre n'a subi aucune variation mais dans l'autre cas l'inactivation est totale.

A la dose germicide de 94 mW.s/cm^2 , quelle que soit la contamination de départ, l'inactivation des virus est très rapide et complète en 5 minutes de traitement.

En conclusion, il apparait, que quelle que soit la dose appliquée, et l'état des particules virales (libres ou fixées), la diminution du titre viral est supérieure ou égale à 99 % après 10 minutes de stérilisation, soit 6 à 12 passages devant les lampes U.V. Toutefois, l'inactivation des virus fixés sur des algues est plus lente, surtout pour les faibles irradiations.

La dose U.V. la plus efficace, pour obtenir une inactivation rapide et totale de rotavirus en concentration initiale de 10^5 à 10^6 par litre d'eau de mer, est 94 mW.s/cm^2 (soit la lampe de 15 W associée au débit de 2l/min).

Compte tenu du fait que le débit de 2 litres/minutes permet une bonne agitation et une aération efficace de l'eau des bacs de décontamination, sans entrainer de perturbation d'ordre mécanique pour les huîtres, **nous avons utilisé**

pour la suite de l'expérimentation une irradiation par la lampe de 15W avec un débit de 2l/minutes.

III - 1 - 2 : ETUDE DE LA CINETIQUE DE DECONTAMINATION DES HUITRES

La cinétique de décontamination est étudiée à partir d'huîtres contaminées par du rotavirus SA 11 selon le protocole précédemment décrit.

Avant chaque expérimentation, un lot de 4 à 5 huîtres (50 g) est prélevé et soumis à l'analyse virologique, dans le but d'évaluer le degré de contamination initiale des coquillages.

L'étude de la cinétique de décontamination des huîtres est ensuite réalisée en plaçant les huîtres :

- en circuit fermé (traitement de l'eau par les U.V.) pendant 24 heures et 72 heures,
- en circuit semi-ouvert (eau non traitée, mais renouvelée toutes les 24 heures) pendant 72 heures.

III - 1 - 2 - 1 : Décontamination des huîtres en circuit fermé pendant 24 heures

L'évolution du niveau de contamination virale des huîtres est observée par des prélèvements de lots de 4 à 5 huîtres après 1, 5, 10 et 24 heures de séjour dans le bac de décontamination.

5 expérimentations ont été réalisées, avec une contamination virale initiale des huîtres variant, selon les expérimentations, de 70 à 380 rotavirus par g de tissu.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 33 et exposés dans la figure 27.

titre viral initial F.F./g	contamination virale après 1 heure d'épuration F.F./g	contamination virale après 5 heures d'épuration F.F./g	contamination virale après 10 heures d'épuration F.F./g	contamination virale après 24 heures d'épuration F.F./g
380 (217-543)	/	62,3 (51-75,3)	44,7 (35,2-55,8)	47,2 (37,6-58,4)
316 (209-423)	114 (49,2-180)	103 (40,3-166)	137 (77-197)	0
162 (86-237)	183 (70,4-296)	111 (93,4-130)	0	0
143 (99,7-188)	5,6 (1,52-14,3)	0	0	0
69,1 (54-86,2)	87,7 (72,4-104)	26,3 (19-35,6)	39,7 (32,1-48,5)	0,48 (0,01-2,71)

0 : inférieur à la limite de sensibilité

/ : non-réalisé

Tableau 33 : Cinétique de décontamination des huîtres sur 24 heures,
en circuit fermé

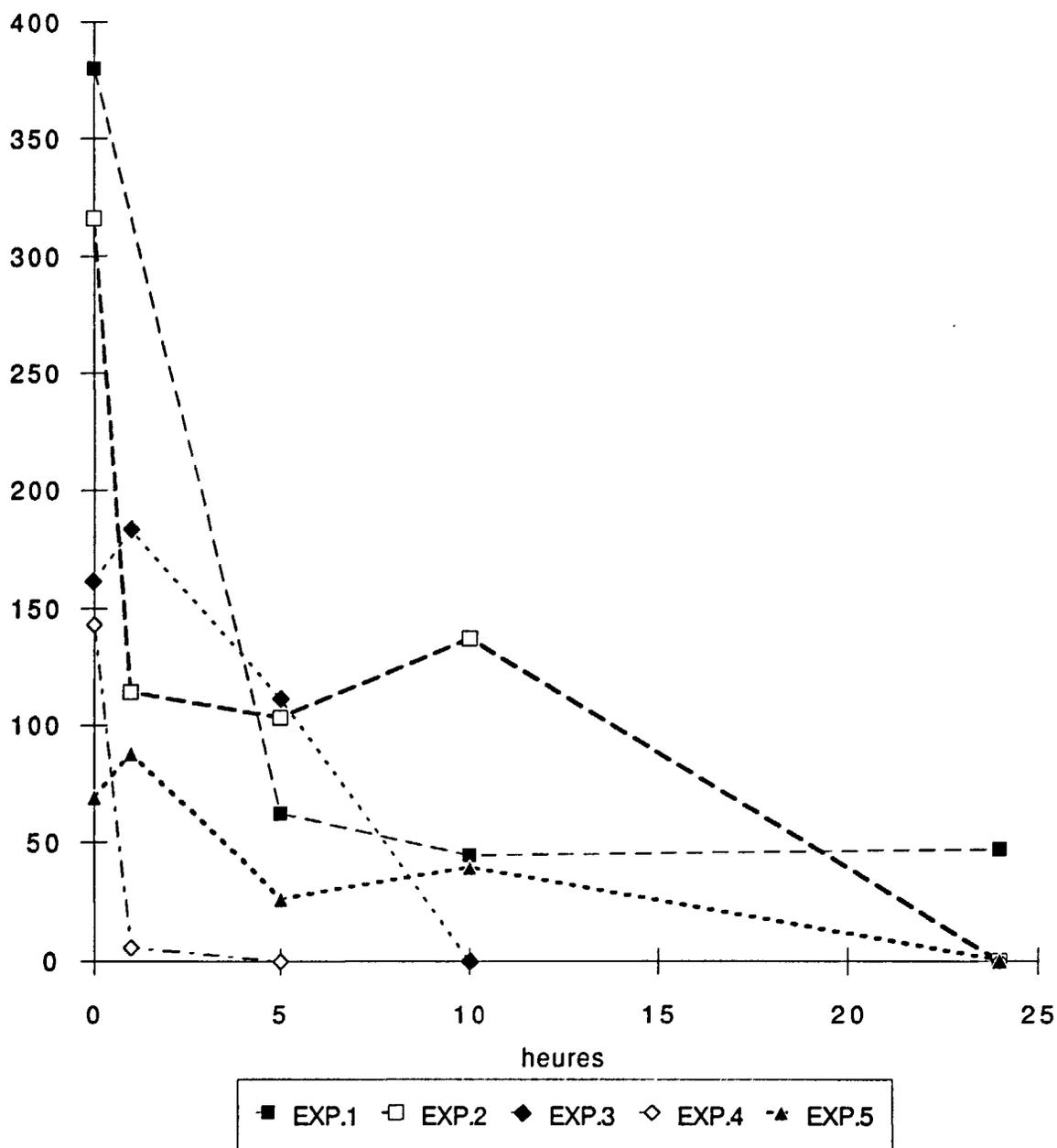
La décontamination s'amorce dès les premières heures de placement en eau traitée par les rayons U.V.

Cependant il apparait que dans 2 expérimentations sur 5, la décontamination est incomplète après 24 heures, aussi bien dans le cas d'un lot initialement fortement contaminé (380 virus/g), pour lequel il reste 47 particules virales / g après 24 heures, que dans celui du lot le moins contaminé (70 virus / g) dans lequel 0,48 virus a été isolé par g de tissu.

Dans ces conditions, 24 heures semblent une durée trop faible pour assurer, à coup sûr, l'élimination totale des rotavirus présents.

Figure 27 : Décontamination des huîtres pendant 24 heures en circuit fermé

Rotavirus / g de tissu



III - 1 - 2 - 2 : Décontamination des huîtres en circuit fermé pendant 72 heures

De façon à pouvoir poursuivre l'étude de la cinétique de décontamination après 24 heures des lots de 4 à 5 huîtres sont prélevés après 24, 48 et 72 heures de séjour dans le bac de décontamination. 9 expérimentations sont ainsi réalisées.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 34.

Quantité de rotavirus (F.F) / g de tissus d'huîtres			
H0	H24	H48	H72
275 (234-320)	34,4 (25-46)	0	0
164 (109-218)	0	0	0,62 (0,01-3,5)
65,5 (53,4-79,2)	0,66 (0,01-3,7)	0	0
33,6 (19,7-47,2)	0	0	6,02 (3,55-9,35)
33 (25,7-41,2)	0	0	0
4,6 (1,8-9,4)	0	0	0
4,4 (0,5-16)	0	1,53 (0,47-3,92)	0
1,2 (1,06-2,3)	0	0	0
<0,2	0	0	0

0 : Inférieur à la limite de sensibilité de la méthode

Tableau 34 : Décontamination des huîtres en circuit fermé pendant 72 heures

Les quantités initiales de rotavirus dans les tissus, avant leur placement en décontamination, varient de moins de 0,2 à 380 rotavirus par g de tissu.

Quantité de rotavirus (F.F) / g de tissus d'huîtres	
H ₀	H ₇₂
275 (234-320)	0
164 (109-218)	0
143 (99,7-188)	2,87 (0,06-16)
101 (58-144)	0
69,1 (54-86,2)	0
33,6 (19,7-47,2)	1,98 (0,4-5,75)
33 (25,7-41,2)	0
4,6 (1,8-9,4)	0
4,4 (0,5-16)	0
1,2 (1,06-2,3)	0
<0,2	0

0 : Inférieur à la limite de sensibilité de la méthode

Tableau 35 : Décontamination des huîtres en circuit semi-ouvert pendant 72 heures

Les quantités initiales de rotavirus dans les tissus varient de moins de 0,2 à 275/g.

Après 72 heures de décontamination, des virus sont retrouvés dans 2 échantillons à des taux de 1,98 à 2,87 F.F./g de tissu, soit un abattement de 94,2 % et de 98 %, par rapport à la quantité initiale de virus.

Il apparaît donc que sur le plan global ce mode d'épuration permet un abattement viral total dans 82 % des cas. Il est cependant en défaut dans 2 cas, où

Après 24 heures de décontamination, des virus sont retrouvés dans 2 lots sur 9, à des taux de 34,4 et 0,66 F.F. par g, soit un abattement de respectivement 88 % et 99 % de la quantité de départ.

Après 48 heures, 1 lot d'huître contient encore des virus. Le titre viral, pourtant peu élevé au départ (4,4 F.F./g) se situe encore à 1,53 F.F./g soit un abattement de seulement 66 %

Après 72 heures de décontamination, 2 prélèvements d'huîtres contiennent toujours des virus à des taux de 0,6 et 6,02 F.F./g, ce qui représente un abattement de 99,7 % et 82 % de la quantité initialement présente.

Dans 3 cas, la décontamination était apparemment complète après 24 heures, mais des virus ont cependant été isolés à des taux faibles mais réels soit après 48 heures, soit après 72 heures de traitement.

Cette dernière situation est à priori surprenante. Elle peut cependant s'expliquer par le fait que les quantités de virus retrouvées se situent aux environs du seuil de détection de la méthodologie utilisée.

De plus, il est probable qu'il existe des disparités entre les individus dans l'activité de filtration, donc de décontamination. Ainsi, la persistance de virus dans une seule huître du lot prélevé influence le résultat global de l'analyse.

En fait, sur un plan global, cette technique d'épuration permet une décontamination totale après 72 heures de traitement dans 77 % des cas, alors que dans 23 % des cas, l'abattement varie de 82 % à 99,7 %.

Cependant, si l'on considère que, en milieu naturel, la contamination des huîtres est toujours inférieure à 30 virus/g de tissu, ce protocole d'épuration apparaît très satisfaisant puisque dans toutes les expérimentations où le taux de contamination est inférieur à cette valeur, l'épuration est totale après 72 heures.

III - 1 - 2 - 3 : Décontamination des huîtres en circuit semi-ouvert pendant 72 heures

Comme pour l'étude des traitements précédents, des lots de 4 à 5 huîtres sont prélevés après 72 heures de séjour dans le bac de décontamination.

11 expérimentations ont été réalisées et les résultats sont rassemblés dans le tableau 35.

l'abattement atteint seulement 94 % et 98 % après 72 heures de décontamination.

Cependant en se plaçant dans des conditions de contamination naturelle pour lesquelles la quantité de virus est toujours inférieure à 30 et le plus souvent comprise entre 0,1 à 2 virus par g, ce protocole de décontamination est satisfaisant puisqu'il ne reste plus de virus dans les huîtres après 72 heures.

En conclusion, il apparaît que pour des taux de contamination virale très élevés, le placement des huîtres pendant 72 heures, soit en eau traitée par les U.V., soit en eau renouvelée toutes les 24 heures, permet une décontamination totale respectivement dans 77 % et 82 % des cas.

Pour des taux de contamination plus faibles, correspondant à des conditions existant dans le milieu naturel, la décontamination est totale dans 100 % des cas après 72 heures avec l'un ou l'autre des 2 procédés.

Il est cependant nécessaire d'insister sur le fait que en circuit fermé après 48 heures (durée préconisée habituellement pour l'épuration des coquillages) et même pour des huîtres faiblement contaminées, l'épuration n'est pas totale dans 1 cas sur 5.

III - 2 : ETUDE DE LA CONTAMINATION ET DE L'EPURATION DES HUITRES EN INSTALLATION PILOTE

Cette étude a été effectuée sur le site de la Tremblade avec les équipements pilote de la station IFREMER et avec l'aide des chercheurs de cette station. La contamination et la décontamination des huîtres en bassin pilote a été réalisée sur place, alors que les analyses virologiques ont été effectuées par nos soins à Nancy.

III - 2 - 1 : METHODOLOGIE

Les huîtres, placées dans une installation pilote, sont soumises à une

contamination in-vivo, puis à une épuration selon les 2 procédés précédemment expérimentés en laboratoire (eau traitée aux U.V. ou non-traitée et renouvelée toutes les 24 heures).

III - 2 - 1 - 1 : Contamination

Un bassin (10 x 1,30 x 1 = 13 m³) est rempli de 5 m³ d'eau de mer décantée. Celle-ci est contaminée par addition de 500 ml d'une suspension contenant 5.10⁹ rotavirus fixés sur des algues *Dunaliella primolecta* (cette suspension a été préparée dans notre laboratoire la veille des opérations de contamination et expédiée en express à basse température en emballage isotherme).

Après 15 minutes d'homogénéisation mécanique de l'eau ainsi contaminée, 100 ml sont prélevés dans le but de déterminer la quantité virale initiale effectivement présente dans l'eau du bassin au début de l'expérimentation.

2 paniers de 12 à 15 kg d'huîtres sont alors placés en 3 lieux différents à l'intérieur du bassin (soit au total 6 paniers) de façon à ce que les huîtres soient entièrement immergées. Le temps de séjour dans le bac de contamination est fixé à 1 heure.

A l'issue de ce séjour, 100 ml d'eau sont recueillis de façon à connaître le titre viral de l'eau de mer en fin d'expérience. De plus, 1 kg d'huîtres (soit environ 10 individus, correspondant à environ 100 g de tissu) est prélevé au niveau des 3 localisations dans le bassin. Pour chaque échantillon, les tissus et le liquide intervalvaire sont récupérés et congelés immédiatement à -80° C. Les deux échantillons d'eau sont envoyés le jour même de leur prélèvement en express, sous emballage isotherme à + 4° C en présence d'accumulateurs thermiques.

III - 2 - 1 - 2 : Epuration

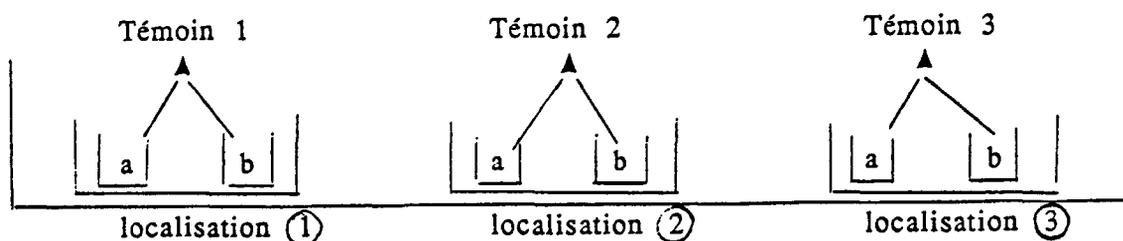
L'étape d'épuration a lieu dans 2 bacs de 1m³, dont un est équipé pour le traitement de l'eau par les U.V. (circuit fermé). Le débit d'eau circulante est calculé de façon à atteindre une dose germicide d'environ 90mW.s/cm²

Le second bac est rempli d'eau de mer décantée, qui est renouvelée intégralement toutes les 24 heures (circuit semi-ouvert).

Deux paniers d'huîtres contaminées sont prélevés aux 3 localisations de contamination (soit 6 paniers). Un panier provenant de chaque localisation est introduit dans le bac en circuit fermé équipé d'U.V (soit 3 paniers) (figure 28).

Les 3 autres paniers sont placés dans le circuit semi-ouvert.

CONTAMINATION



DECONTAMINATION

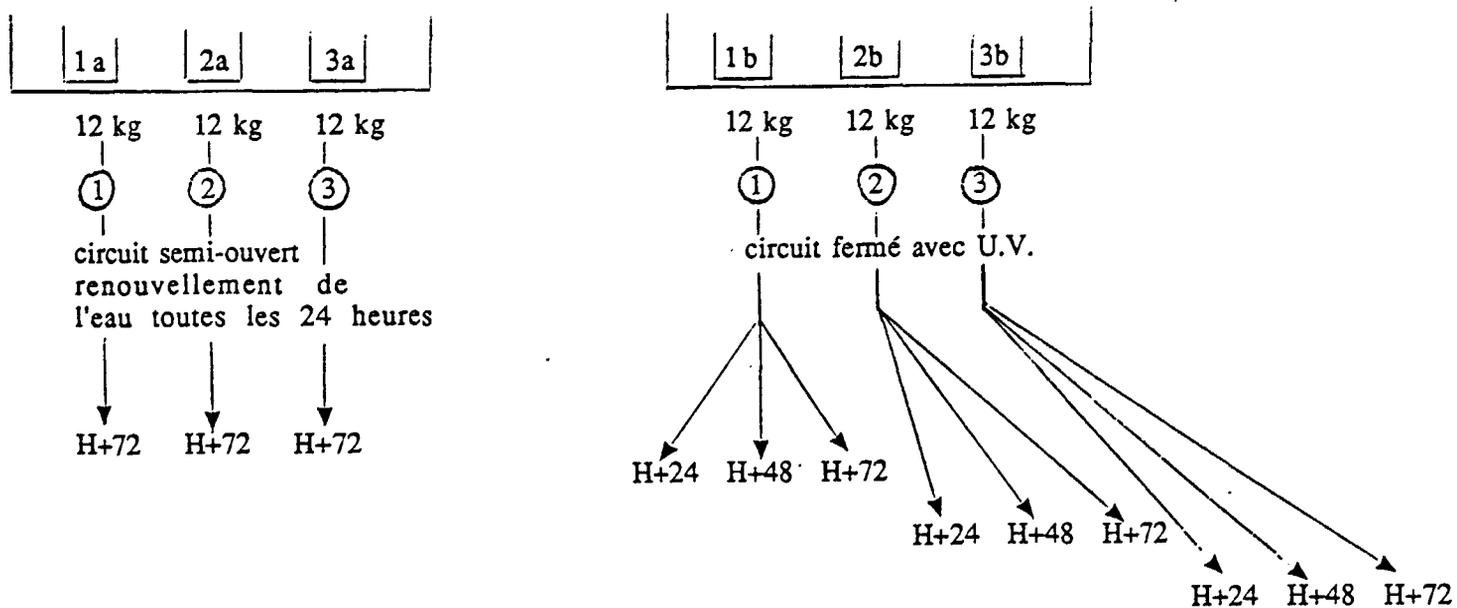


Figure 28 : Répartition des paniers d'huîtres pendant les expérimentations

Après 24, 48, et 72 heures de séjour, des échantillons de 1 kg d'huîtres sont prélevés à partir de chacun des 3 paniers placés dans le circuit fermé (traitement par U.V.).

Les tissus et le liquide intervalvaire de ces 9 échantillons sont récupérés et congelés immédiatement à -80°C .

De même, après 72 heures de séjour, des échantillons de 1 kg d'huîtres sont prélevés à partir de chacun des 3 paniers placés dans le circuit semi-ouvert (eau renouvelée).

Pour ces 3 échantillons les tissus et le liquide intervalvaire des huîtres sont récupérés et congelés immédiatement à -80°C .

Tous les échantillons d'huîtres sont envoyés à Nancy, à l'issue de l'expérimentation, à l'état congelé à -80°C en express, en emballage isotherme et sous carboglace.

III - 2 - 2 : Résultats

Deux expérimentations ont été réalisées le 22 mai et le 11 juin 1991. Les résultats de la première expérimentation n'ont pas pu être retenus, compte tenu d'une forte mortalité des coquillages. Seuls les résultats obtenus le 11 juin sont exploitables.

III - 2 - 2 - 1 : Niveau de contamination de l'eau

Le titre viral de l'eau a été déterminé par inoculation directe sur des cultures de cellules MA 104.

Le taux de virus dans l'eau de mer homogénéisée avant introduction des huîtres est de $1,08 \cdot 10^3$ F.F./ml (intervalles de confiance $7,6 \cdot 10^2 - 1,4 \cdot 10^3$ F.F./ml) et après le séjour des huîtres de $1,1 \cdot 10^2$ F.F./ml (intervalles de confiance $0,3 \cdot 10^2 - 1,8 \cdot 10^2$ /ml).

Le titre viral initial de l'eau de mer est élevé et la quantité globale retrouvée dans le bassin de contamination correspond à la quantité présente dans la suspension contaminante initiale. Il n'y a donc pas eu d'inactivation des particules virales ni pendant le transport, ni après leur introduction et leur homogénéisation dans l'eau de mer.

En revanche, le titre viral a chuté de 1 log dans le bassin après 1 heure de séjour des huîtres.

Cette perte peut s'expliquer soit par un début d'inactivation des particules virales dans l'eau de mer, soit par leur adsorption sur les parois du bassin ou sur les coquilles, mais aussi par leur ingestion par les mollusques.

III - 2 - 2 - 2 : Niveau de contamination des huîtres

L'isolement et le titrage des rotavirus à partir des tissus d'huîtres a été réalisé après extraction-concentration, selon le protocole "borate-PEG".

Chaque concentrat a été fractionné en 2 parties : la première partie a subi une analyse par inoculation directe, la seconde après traitement de détoxification par filtration sur gel de Sephadex LH 20.

Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 36.

	Récupération virale dans les concentrats (F.F./g de tissu)	
	sans détoxification	après détoxification
Témoin 1	N.D.	3,9 (0,09-21,8)
Témoin 2	96,8 (63,3-138,4)	366,2 (338-470)
Témoin 3	153,2 (108,4-209,4)	531,5 (448-629)

N.D. Non détecté

**Tableau 36 : Niveau de contamination virale des huîtres
selon leur localisation dans le bassin**

La contamination des huîtres varie de 3,9 à 531,5 rotavirus/g de tissu selon leur localisation dans le bassin. Elle apparaît donc très hétérogène. Ces huîtres

avaient toutes la même origine et aucune différence dans leur état physiologique n'a été mentionnée.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer cette variabilité :

- une mauvaise répartition des particules virales dans le bassin liée à la possibilité d'existence de zones où l'eau circulait mal ou était mal homogénéisée,
- une mauvaise circulation de l'eau à l'intérieur des paniers, empêchant un contact optimum des huîtres avec de l'eau contaminante,
- d'éventuelles différences dans l'activité de filtration des huîtres.

Par ailleurs, et sur le plan technique, les résultats obtenus après détoxification sont dans tous les cas significativement plus élevés (par comparaison des intervalles de confiance) que ceux obtenus sans détoxification. Cela confirme la nécessité de procéder à la détoxification de concentrats, surtout lorsqu'ils correspondent à une quantité initiale de tissus de l'ordre de 100 g.

III - 2 - 2 - 3 : Evaluation du degré d'épuration des huîtres

- Après traitement en circuit fermé :

9 échantillons ont été analysés : 3 après 24 heures, 3 après 48 heures, 3 après 72 heures de séjour en eau traitée par les U.V.

Chacun des concentrats a été inoculé sur cellules MA104 d'une part directement et d'autre part après traitement de détoxification par filtration sur sel de Sephadex LH 20.

Dans tous les cas, aucun virus n'a été isolé.

- Après traitement en circuit semi-ouvert :

3 échantillons ont été prélevés dans le bassin à circuit semi-ouvert, ont été traités et les concentrats obtenus ont été inoculés sur cellules MA 104 d'une part directement, d'autre part après détoxification.

Quelle que soit la technique utilisée, aucun virus n'a été isolé.

III - 2 - 3 : Conclusion

Il apparaît qu'au cours de ces expérimentations de décontamination, soit en circuit fermé, soit en circuit semi-ouvert et malgré un taux de contamination initial très élevé dans 2 cas sur 3, **aucune particule virale n'a pu être isolée des huîtres après 24 heures en circuit-fermé et après 72 heures en circuit ouvert.** Les résultats tendraient à prouver que ces deux protocoles d'épuration donnent des résultats satisfaisants. Cependant, ils devraient être confirmés par d'autres expérimentations, de façon à déterminer si en bassin de 1 m³, l'épuration a réellement un rendement supérieur à celui constaté au laboratoire, et si ces protocoles de décontamination, déjà utilisés pour l'épuration des fruits de mer et donnant de bons résultats sur le plan bactériologique, sont aussi satisfaisants sur le plan virologique.

CONCLUSION - DISCUSSION

CONCLUSION - DISCUSSION

Compte tenu du risque de transmission de maladies d'origine virale par l'intermédiaire des fruits de mer, il est indispensable de disposer de méthodes permettant d'évaluer aussi bien le niveau de contamination virale initiale des coquillages, que l'efficacité des méthodes de décontamination.

Notre travail est axé sur la contamination virale des fruits de mer et leur décontamination. Nous l'avons envisagé sous un double aspect : celui du risque infectieux et des moyens de détermination du risque théorique et celui de la capacité d'adhésion et de relargage des particules virales à partir des tissus de mollusques. Le risque théorique d'après PROST et BOUTIN (1989) découle de la présence ou de l'absence de micro-organismes dans le milieu. Il nécessite pour être apprécié de disposer de méthodologies d'analyses adéquates applicables en routine et dont le seuil de sensibilité soit suffisamment bas. Or, en virologie du milieu hydrique et plus particulièrement des fruits de mer, les méthodologies sont étroitement liées aux phénomènes d'adhésion.

Dans une première partie deux méthodes d'extraction-concentration des virus ont été comparées : l'une fait appel à une extraction par un tampon glycine suivie d'une concentration par floculation organique proposée par SCHWARTZBROD *et al.* (1989), et l'autre utilisant une extraction par un tampon borate associée à 2 précipitations par le P.E.G. 6000, préconisée par BIZIAGOS (1988).

Les résultats obtenus à partir d'huîtres (*Crassostrea gigas*) contaminées in-vivo par des rotavirus simien SA 11 fixés sur des algues unicellulaires (*Dunaliella primolecta*) montrent que la méthode "borate + PEG" présente une efficacité supérieure à celle de "glycine + floculation organique".

Des expérimentations réalisées in-vitro sur des broyats artificiellement contaminés ont permis de calculer les rendements de récupération. Ceux-ci varient de 23 % pour la méthode "glycine + floculation organique" à plus de 84,8 % pour la méthode "borate + PEG". Cette deuxième méthode apparaît donc, supérieure à la première tant du point de vue de l'efficacité que du rendement. Cependant, ceux-ci nous ont paru insuffisants, c'est pourquoi des essais d'amélioration des techniques

d'extraction-concentration ont été menées, d'une part pour augmenter leur efficacité, d'autre part pour diminuer la cytotoxicité des concentrats obtenus. L'amélioration de l'efficacité a été tentée en procédant soit à la congélation soit à la lyophilisation des échantillons.

La congélation à - 20°C des tissus avant analyse a abaissé le seuil de détection des virus dans certains échantillons. Par contre, la congélation des concentrats ne permet pas d'améliorer l'efficacité des méthodes d'extraction-concentration et au contraire, diminue la quantité de virus récupérés. En ce qui concerne la lyophilisation des tissus, elle n'apporte aucune amélioration au protocole.

Au cours de toutes les expérimentations effectuées, de très fréquents et importants phénomènes de toxicité ont été observés après inoculation des concentrats sur des cellules. Cette toxicité oblige à diluer considérablement les inoculums, ce qui diminue la sensibilité du protocole d'analyse. Notre objectif a donc comporté l'élaboration d'un protocole de détoxification. Celui-ci a été fondé sur la filtration des concentrats sur gel de Sephadex LH 20. Cette méthode a donné d'excellents résultats, puisqu'elle permet de réduire la cytotoxicité des concentrats d'un facteur de 2 à 10 dans la plupart des cas.

De plus, nous avons montré qu'une clarification effectuée à pH 9, précédant la filtration, permet de traiter des concentrats plus denses, sans diminuer le taux de récupération virale tout en réduisant la toxicité d'un facteur pouvant atteindre 25. En revanche, des essais effectués avec le Sephadex G50 se sont révélés négatifs, contrairement aux résultats rapportés par Oragui et Mara (1989) pour des concentrats d'eau.

Ces études méthodologiques nous ont permis de proposer un protocole d'extraction-concentration fondé sur l'association d'un broyage fins des tissus des mollusques, d'un traitement par ultrasons suivie d'une élution par une solution borate - 3% d'extrait de boeuf pH 9 couplée à une détoxification sur gel de Sephadex LH 20 avant inoculation sur cultures cellulaires.

Dans un deuxième temps, nous avons déterminé la qualité sanitaire d'huîtres élevées en zone maritime contaminée dans la baie de Morlaix. Cette étude, réalisée sur 36 échantillons, d'une part avec le protocole sélectionné, d'autre part avec les autres techniques expérimentales précédentes, a permis de tirer deux types de conclusions.

D'abord sur le plan méthodologique, l'analyse d'huîtres contaminées naturellement a, en tous points, confirmé les résultats obtenus lors de l'étude expérimentale en laboratoire. Elle a notamment permis de montrer que le protocole proposé était adapté à la recherche, non seulement des rotavirus humains, mais aussi des virus entériques cultivables ainsi que de l'antigène du virus de l'hépatite A.

Ensuite sur le plan de la qualité sanitaire, les analyses ont permis l'isolement de virus dans 28 % des cas. 10 échantillons sur 36 étaient positifs : 3 contenaient des rotavirus, 3 contenaient des entérovirus cultivables, 5 de l'antigène du virus de l'hépatite A, dont 1 renfermait à la fois du VHA et des rotavirus.

Ces résultats virologiques ont pu être comparés aux résultats bactériologiques et il est apparu qu'il n'existe pas de corrélation entre les niveaux de contamination bactériologique et virale des huîtres.

Il s'avère donc que, au vu de nos résultats et comme le préconisent de nombreux auteurs (GERBA *et al* - 1980 ; GRABOW *et al* - 1989 ; HAVELAAR - 1987), l'utilisation du seul critère bactériologique pour la détermination de la qualité sanitaire des huîtres est insuffisant et que des travaux portant sur la détermination d'un indicateur de contamination virale doivent être impérativement poursuivis.

La troisième partie du travail a porté sur l'étude expérimentale des cinétiques d'épuration des huîtres. Cette étude a été menée d'une part en laboratoire, d'autre part en pilote industriel.

L'étude en laboratoire, qui a d'abord nécessité la mise au point d'un dispositif expérimental original, a permis d'envisager les phénomènes d'épuration d'une part en circuit fermé (dans lequel l'eau est soumise en permanence aux rayons U.V) et d'autre part dans un circuit semi-ouvert (dans lequel l'eau est renouvelée toutes les 24 heures).

Dans un premier temps, nous avons pu montrer que dans l'eau de mer avec des rotavirus libres et pour des doses germicides d'U.V. de 46 et 94 mW.s/cm², les cinétiques d'inactivation sont très rapides, quelle que soit la contamination de départ. En effet, après 5 minutes aucun rotavirus n'est détecté dans l'eau.

Par contre, avec des rotavirus fixés sur des algues, seule la dose germicide de 94 mW.s/cm^2 permet une cinétique d'inactivation rapide et conduit à l'élimination de la totalité des rotavirus en moins de 5 minutes de traitement.

En ce qui concerne la cinétique de décontamination des huîtres, celle-ci a été étudiée avec des huîtres artificiellement contaminées in-vivo. En circuit fermé, il apparaît que la décontamination s'amorce dès les premières heures de placement en eau traitée par les U.V.

Sur un plan théorique, une période moyenne de 24 heures paraît suffisante pour obtenir l'épuration des huîtres. Cependant, après ce délai, dans 2 cas sur 5, nous avons encore isolé des virus dans les huîtres.

L'expérimentation menée sur 72 heures, montre que pour des fortes concentrations virales, l'épuration n'est pas toujours totale. En revanche, pour les contaminations faibles, correspondant à celles retrouvées habituellement dans le milieu naturel, l'épuration est totale après 72 heures en circuit fermé.

En ce qui concerne le processus de décontamination en circuit semi-ouvert pendant 72 heures, il apparaît que ce mode d'épuration ne permet un abattement viral total que dans 82 % des cas.

Cependant, pour des niveaux observés dans l'environnement, le protocole est satisfaisant puisque 100 % des virus sont éliminés dans tous les lots d'huîtres. Donc, aussi bien en circuit fermé qu'en circuit ouvert, lorsque les huîtres présentent des taux de contamination du niveau de ceux rencontrés en milieu naturel, la décontamination est totale dans 100 % des cas après 72 heures de séjour.

Les conclusions obtenues en laboratoire ont été confrontées à des opérations de décontamination effectuées sur le terrain en pilote semi-industriel. Ces opérations ont été réalisées à partir de 6 paniers de 15 kg d'huîtres artificiellement contaminées dans des bassins de 5m^3 d'eau de mer. L'analyse de la bioaccumulation des rotavirus dans les huîtres incorporés dans ce bassin a mis en exergue que la contamination des huîtres étaient extrêmement hétérogène, bien que celles-ci aient la même origine, le même âge et le même état physiologique et que l'eau soit agitée en permanence dans le bassin.

En circuit fermé comme en circuit semi-ouvert, tous les échantillons prélevés après 24, 48 et 72 heures se sont révélés négatifs. Il apparaît donc qu'au cours des décontaminations en installation pilote semi-industriel, les cinétiques d'inactivation des rotavirus présents dans les huîtres sont très rapides.

A l'issue de ce travail nous disposons d'un outil analytique performant pour la virologie des fruits de mer.

L'étude effectuée sur le modèle expérimental huîtres/rotavirus a permis d'explorer les cinétiques de bioaccumulation, de relargage et d'inactivation virale.

D'un point de vue prospectif cette étude devrait être élargie à d'autres modèles de virus et de coquillages et poursuivie afin de préciser les mécanismes intimes qui régissent les relations entre la particule virale et le mollusque ; car seule la compréhension de tous ces mécanismes permettra d'envisager une technologie d'épuration efficace.

Enfin d'un point de vue sanitaire, devrait être envisagée la détermination du risque réel lié à la consommation des fruits de mer.

ANNEXES

Annexe 1Milieu de culture des algues unicellulairessolution 1 :

Na ₂ , EDTA	45 g
H ₃ BO ₃	33,6 g
NaNO ₃	100 g
Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O	20 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0,36 g
FeCl ₃ , 6H ₂ O	1,3 g
Traces de métaux	1 ml
eau distillée	q.s.p. 1 litre

Stérilisation par filtration à 0,45 µm

Traces de métaux :

ZnCl ₂	2,1 g
CoCl ₂ , 6H ₂ O	2 g
(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ , 4H ₂ O	0,9 g
CuSO ₄ , 5H ₂ O	2 g
eau distillée	q.s.p. 100 ml

Solution 2 :

vitamine B ₁	200 mg
vitamine B ₁₂	10 mg
eau distillée	q.s.p. 1000 ml

Stérilisation par filtration à 0,45 µm

Conservation à +4°C

Annexe 2**Milieu essentiel minimum (M.E.M.) avec sels de Earle****Acides aminés :**

	mg/l
L-arginine. HCl	126,0
L-cystine	24,0
L-glutamine	292,0
L-histidine.HCl.H ₂ O	42,0
L-isoleucine	52,5
L-leucine	52,4
L-lysine HCl	73,0
L-méthionine	15,0
L-phénylalanine	33,0
L-thréonine	48,0
L-tryptophane	10,0
L-tyrosine	36,0
L-valine	47,0

Vitamines :

Acide folique	1,0
Choline chlorure	1,0
I-inositol	2,0
Nicotinamide	1,0
D-Ca-pantothenate	1,0
Pyridoxal HCl	1,0
Riboflavine	0,1
Thiamine HCl	1,0

Solution saline équilibrée de Earle :

NaCl	6800
KCl	400
CaCl ₂ , 2H ₂ O	266
MgSO ₄ , 7H ₂ O	200
NaHCO ₃	2200
glucose	1000
rouge de phénol	10

Le milieu M.E.M. (réf.0011 EUROBIO) ne contient pas de NaHCO₃.
Cet ingrédient doit être ajouté juste avant l'emploi.

Annexe 3 :Solution stock d'antibiotiques :

Pénicilline	1 million d'unités
Streptomisine	1 g
Eau désionisée stérile	q.s.p. 100 ml

La solution est conservée à -20°C

Annexe 4 :Solution de trypsine-versène :

1) Solution de P.B.S. modifié (Phosphate Buffer Saline), sans Ca²⁺, sans Mg²⁺

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ , 12H ₂ O	2,57 g
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Eau distillée	q.s.p. 1000 ml

solution à pH 7,2

Stérilisation par autoclavage (120°C ; 20 mn)

2) Solution de NaHCO₃ à 14 g/litre dans eau distillée

3) Mélanger dans le rapport :

P.B.S. modifié	90%
Sol. Bicarbonate	10%

Stérilisation du mélange par autoclavage (120°C ; 20 mn)

- Dissoudre

La trypsine (Difco 1:250)	3 g/litre
Le complexant Titriplex III (versène-EDTA)	0,8 g/litre

- Stériliser par filtration à 0,22 µm

- Conserver à +4°C

Annexe 5 :Solution d'antibiotiques pour la décontamination des concentrats :

Néomycine	1,5 g
Pénicilline	10 millions d'unités
Streptomycine	10 g
Eau désionisée stérile	q.s.p. 100 ml

Solution d'antifongique

fungizone : Amphotéricine B	50 mg
Eau désionisée stérile	q.s.p. 250 ml

Annexe 6 :Solutions éluantes :tampon glycine pH 10

glycine 0,1M	7,5 g
NaCl	9 g
Eau désionisée	q.s.p. 1000 ml
Solution de NaOH 10N	q.s.p. pH 10

tampon borate-3% d'extrait de boeuf pH 9

H ₃ BO ₃ 0,1M	6,1 g
KCl 0,1M	7,4 g
Solution de NaOH 10N	q.s.p. pH 9
Eau désionisée	q.s.p. 1000 ml
+ Extrait de boeuf en poudre (Oxoid L29)	30 g
Solution de NaOH 1N	q.s.p. pH 9

Stérilisation des solutions par autoclavage (120°C ; 20 mn)

Conservation à +4°C

Annexe 7 :Solution de P.E.G. 6000 à 50 % (p/v)

Tampon P.B.S.	90 ml
NaCl	12 g
P.E.G. 6000	80 g

Ajouter progressivement le P.E.G. dans le P.B.S., car il se dissout difficilement et mélanger jusqu'à ce que la solution soit limpide.
Compléter le volume à 160 ml final par du P.B.S.

Stérilisation du mélange par autoclavage (120°C ; 20 mn)

Conserver à +4°C

Annexe 8 :Solution de lavage : P.B.S. modifié

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na ₂ HPO ₄ , 2 H ₂ O	1,15 g (ou Na ₂ HPO ₄ , 12 H ₂ O 2,57 g)
KH ₂ PO ₄	0,2 g
Eau désionisée q.s.p.	1000 ml

solution à pH 7,2

Stérilisation du mélange par autoclavage (120°C ; 20 mn)

Conserver à +4°C

Annexe 9 :**virus libre :****8W - 2l/min. D = 19,2 mW.s/cm²**

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./l)				
0	$5,3 \cdot 10^5$	$6,4 \cdot 10^5$	$1,03 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$
1 min.30	$4,2 \cdot 10^4$	$7,6 \cdot 10^3$	$3,9 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	$1,3 \cdot 10^5$
4 min. 30	$3,2 \cdot 10^2$	ILD	ILD	ILD	$3,8 \cdot 10^3$
9 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
30 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD

15W - 2/min. D = 94 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./l)				
0	$1,2 \cdot 10^4$	$2,1 \cdot 10^5$	$1,4 \cdot 10^6$	$1,9 \cdot 10^6$	$2,06 \cdot 10^6$
1 min.30	ILD	ILD	$8 \cdot 10^3$	$3,03 \cdot 10^3$	ILD
4 min. 30	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
9 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
30 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD

8W - 4l/min. D = 8,5 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./l)				
0	$1,2 \cdot 10^5$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,3 \cdot 10^6$	$1,4 \cdot 10^6$	$2,2 \cdot 10^6$
45 s	$3 \cdot 10^4$	$7,8 \cdot 10^5$	$2,5 \cdot 10^5$	$8,1 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$
2 min. 30	$2,4 \cdot 10^3$	$2,3 \cdot 10^5$	$3,4 \cdot 10^5$	$6,8 \cdot 10^4$	$1,3 \cdot 10^5$
4 min. 30	ILD	$6,8 \cdot 10^3$	$7,2 \cdot 10^3$	$5,4 \cdot 10^3$	$5,6 \cdot 10^2$
15 min.	ILD	$1,8 \cdot 10^2$	ILD	ILD	$7,5 \cdot 10^2$

15W - 4/min. D = 46,5 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5	exp.6
	(F.F./I)					
0	4,2.10 ⁴	5,03.10 ⁴	9,9.10 ⁴	1,02.10 ⁵	3,5.10 ⁵	1,9.10 ⁶
45 s	2,6.10 ³	8,07.10 ³	8,2.10 ³	2,5.10 ⁴	1,5.10 ⁴	2,2.10 ⁵
2 min. 30	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD	2,2.10 ⁴
4 min. 30	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
15 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD

ILD : Inférieur à la Limite de Détection

Annexe 10 :

virus fixés sur les algues :

8W - 2l/min. D = 19,2 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./I)				
0	3,08.10 ⁵	9,1.10 ⁴	3,1.10 ⁵	1,04.10 ⁶	5,2.10 ⁵
1 min.30	1,3.10 ⁴	2.10 ³	8,3.10 ⁴	1,5.10 ⁴	1,2.10 ⁴
4 min. 30	8,8.10 ⁴	ILD	1,2.10 ³	ILD	3,5.10 ²
9 min.	3,2.10 ³	ILD	2,3.10 ²	ILD	ILD
30 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD

15W - 2/min. D = 94 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./I)				
0	4,3.10 ⁵	5.10 ⁵	7,9.10 ⁵	1,7.10 ⁶	6,6.10 ⁶
1 min.30	5.10 ⁴	2,5.10 ⁴	5.10 ³	ILD	7,6.10 ⁵
4 min. 30	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
9 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD
30 min.	ILD	ILD	ILD	ILD	ILD

8W - 4l/min. D = 8,5 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4	exp.5
	(F.F./l)				
0	1,4.10 ⁵	2,02.10 ⁵	4,9.10 ⁵	5.10 ⁵	5,4.10 ⁵
45 s	1,8.10 ⁴	2,1.10 ⁵	1,8.10 ⁵	1,4.10 ⁴	8,4.10 ⁴
2 min. 30	7,2.10 ³	1,4.10 ⁴	1,1.10 ⁴	1,2.10 ³	ILD
4 min. 30	2,2.10 ³	1,6.10 ³	6.10 ²	ILD	ILD
15 min.	ILD	3.10 ²	ILD	ILD	ILD

15W - 4l/min. D = 46,5 mW.s/cm²

temps de stérilisation	exp.1	exp.2	exp.3	exp.4
	(F.F./l)			
0	2,3.10 ⁶	2,7.10 ⁶	2,6.10 ⁶	2,5.10 ⁶
45 s	9,3.10 ⁵	1,5.10 ⁶	3,7.10 ⁵	3,7.10 ⁵
2 min. 30	8,3.10 ⁴	9,1.10 ⁴	2,8.10 ⁴	1,1.10 ⁴
4 min. 30	ILD	2,8.10 ²	3.10 ²	ILD
15 min.	ILD	3,3.10 ²	ILD	ILD

ILD : Inférieur à la Limite de Détection

BIBLIOGRAPHIE

BIBLIOGRAPHIE

AGBALIKA F. (1986)

Contribution à l'étude du virus de l'hépatite A (VHA) dans les eaux : techniques de concentration et de mise en évidence par immunoenzymologie
DEA - Alimentation - Nutrition - NANCY. 32 p.

ALBERT M. (1989)

Extraction des virus entériques des boues résiduaires et des sédiments
Thèse de Doctorat de l'Université de METZ. 181 p.

ATHA D.H., INGHAM K.C. (1981)

Mechanism of precipitation of proteins by polyethylene glycols
J. Biol. Chem., 256 : 12108-12117.

AUDIC J.M. (1990)

Evolution des technologies d'élimination des micro-organismes
La mer et les rejets urbains - Bendor, 13-15 juin 1990
IFREMER, Actes de colloques 11 : 133-148.

BARON D. (1985)

Recherche des virus hydriques humains dans l'environnement marin (eaux, sédiments, mollusques) et épidémiologie des viroses transmises par les coquillages (mise au point bibliographique)
Thèse de doctorat en pharmacie - PARIS V - 83 p.

BARON D. (1985)

Les virus humains dans l'environnement hydrique
Dans : MAURIN J. - Virologie Médicale - Edit. FLAMMARION - PARIS.

BARON D. (1986)

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

BEAUMONT A., CASSIER P. (1973)

Biologie animale : des Protozoaires aux Métazoaires épithélioneuriens - Tome 1
DUNOD - Edit. BORDAS - PARIS.

BEDFORD A.J., WILLIAMS G., BELLAMY A.R. (1978)

Virus accumulation by the rock oyster *Crassostrea glomerata*
Appl. Environ. Microbiol., 35 : 1012-1018.

BEMISS J.A., LOGAN M.M., SAMPLE J.D., RICHARDS G.P. (1989)

A method for the enumeration of poliovirus in selected molluscan shellfish
J. Virol. Meth., 26 : 209-218.

BENTON W.H., HURST C.J. (1990)

Sequential inoculation as an adjunct in enteric virus plaque enumeration
Wat. Res., 24 : 905-909.

- BERIL C., BOHER S., SCHWARTZBROD L. (1991)
 Detoxification by Sephadex LH 20 sea-food concentrates for rotavirus assay
 Wat. Sci. Tech., 24 : 417-421.
- BERIL C., SCHWARTZBROD L. (1989)
 Détection des rotavirus dans les moules
 Microbiol. Alim. Nut, 7: 175-182.
- BIZIAGOS E. (1989)
 Virus de l'hépatite A : méthodes d'études dans les milieux hydriques. Effet de
 substances antivirales sur la multiplication in vitro.
 Thèse de doctorat de l'Université Claude-Bernard, LYON I. 170 p.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M., AGBALIKA F., LAVERAN
 H.,DELOINCE R. (1987)
 Concentration of HAV
 Wat. Res.,21 : 683-686.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M., DELOINCE R. (1989)
 Hepatitis A virus concentration from experimentally contaminated distilled, tap,
 waste and seawater
 Wat. Sci. Tech., 21 : 255-258.
- BLACKWELL J.H., CLIVER D.O., CALLIS J.J., HEIDELBAUGH N.D., LARKIN E.P.,
 MC KERCHER P.D, THAYER D.W. (1985)
 Food borne viruses : their importance and need for research
 J. Food Prot., 48 : 717-723.
- BLOCK J.C., SCHWARTZBROD L. (1982)
Analyse virologique des eaux
 Edit. LAVOISIER, Tec et Doc - PARIS.
- BLOCK J.C.,SCHWARTZBROD L. (1989)
Viruses in water systems
 Edit. V.C.H. ; NEW-YORK.
- BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R., JOFRE J. (1988)
 Occurrence of enteroviruses in marine sediment along the coast of Barcelona,
 Spain
 Can. J. Microbiol., 34 : 921-924.
- BOSCH A., LUCENA F., JOFRE J. (1986)
 Fate of human enteric viruses (rotaviruses and enteroviruses) in sewage after
 primary sedimentation
 Wat. Sci. Tech., 18 : 47-52.
- BOSCH A.,PINTO R.M., BLANCH A.R., JOFRE J. (1989)
 Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures
 Wat. Res., 22 : 343-348.

- BOSCH A., SHIELDS P.A. (1987)
Survival of hepatitis A virus and poliovirus in seawater and marine sediment
Abstr. Ann. Mtg. Am. Soc. Microbiol. : 295
- BOSCH A., TARTERA C., GAJARDO R., DIEZ J.M., JOFRE J. (1989)
Comparative resistance of bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* to inactivation by chlorination or ultraviolet radiation
Wat. Sci. Tech., 21 : 221-226.
- BOUE H., CHANTON R. (1962)
Zoologie I. Invertébrés (2ème édition)
Edit. G. DOIN et Cie - PARIS.
- BUISSON D.H., FLETCHER G.C., BEGG C.W. (1981)
Bacterial depuration of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand
N.Z.J. Sci., 24 : 253-262.
- Bulletin épidémiologique hebdomadaire (1989)
Maladie due à des mollusques testacés - Surveillance en Angleterre et au Pays de Galles : 1941-1987
Bull. Epid. Hebdo., 7 : 27
- CANZONIER W.J. (1971)
Accumulation and elimination of coliphage S-13 by the hard clam
Appl. Microbiol., 21 : 1024-1031.
- CHAMPSAUR H. (1985)
Virus et diarrhée
Dans : MAURIN J. - Virologie Médicale - Edit. FLAMMARION - PARIS.
- CHAMROUX S., GUICHAOUA G. (1988)
Rôle du sédiment dans l'entretien et la conservation de la pollution par les germes fécaux en zone littorale
Océanis, 14 : 45-49.
- CHANG S.K., BERG G., BUSH K.A., STEVENSON R.F., CLARKE N.A., KLABER P.W. (1958)
Application of the "most probable number" method for estimating concentrations of animal viruses by the tissue culture technique
Virology, 6 : 27-42.
- CHANG J.C.H., OSSOFF S.F., LOBE D.C., DORFMAN M.H., DUMAIS C.M., QUALLS R.G., JOHNSONS D. (1985)
U.V. inactivation of pathogenic and indicator microorganisms
Appl. Environ. Microbiol., 49 : 1361-1365.
- CHONMAITREE T., FORD C., SANDERS C., LUCIA H.L. (1988)
Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses
J.Clin.Microbiol., 26 : 2576-2580.

- CLIVER D.O., ELLENDER R.D., SOBSEY M.D. (1983)
Methods for detecting viruses in foods : background and general principles
J. Food Prot., 46 : 248-259.
- COEURDACIER J.L. (1986)
Réserves d'eau de mer et dégorgeoirs
Equinoxe, 8 : 6-11.
- COLLOMB J. (1991)
Approche moléculaire et physico-chimique de la détection du coronavirus entérique bovin dans l'environnement
Thèse de doctorat de l'Université de NANCY I. 228 p.
- COOK D. W., ELLENDER R.D. (1986)
Relaying to decrease the concentration of oyster-associated pathogens
J. Food Prot., 49 : 196-202.
- CORNAGLIA E.M., BARRANDEGUY M.E., FITJMAN N., SCHUDEL A.A. (1989)
Enzymelinked immunosorbent assay, immunofluorescence test and electrophoretic analysis of rotaviral RNA in the diagnosis and characterization of the bovine rotavirus
Rev. Lat. Am. Microbiol., 31 : 59-62.
- CROCI L., DE FELIP G., GIZZARELLI S., TOTI L., AGRIGENTO S., AMATO C., LOMBARDI F., NOVELLO F., SANTORO R. (1984)
Methodology for the determination of polioviruses in edible lamellibranch mollusc
Microbiol. Alim. Nut., 2 : 85-90.
- DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S., WRIGHT B.A. (1989)
Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluent in selected Puertorican communities
Appl. Environ. Microbiol., 55 : 503-506.
- DEGRANGE J.M. (1981)
Aspect sanitaire du procédé dit de dégorgement des huîtres
Thèse de doctorat en pharmacie - BORDEAUX. 84 p.
- DEINHARDT F., GUST I.D. (1983)
L'hépatite virale
Bull. OMS, 61 : 199-232.
- DELATTRE J.M., DELESMONT R. (1981)
L'analyse de coquillages peut-elle servir au contrôle microbiologique du littoral ?
Rev. Int. Océanogr. Méd., 63-64 : 11-16.
- DENIS F.A., BRISOU J.F. (1976)
Contamination virale des fruits de mer : étude portant sur l'analyse de 15 000 coquillages
Bull. Acad. Méd., 160 : 18-22.

- DENIS F.A., DUPUIS T., DENIS N.A., BRISOU J.F. (1977)
Survie dans l'eau de mer de 20 souches de virus à ADN et ARN
J. Fr. Hydrol., 8 : 25-36.
- DI GIROLAMO R., LISTON J., MATCHES J. (1970)
Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters
Appl. Microbiol., 20 : 58-63.
- DI GIROLAMO R., LISTON J., MATCHES J. (1975)
Uptake and elimination of poliovirus by west coast oysters
Appl. Microbiol., 29 : 260-264.
- DI GIROLAMO R., LISTON J., MATCHES J. (1977)
Ionic bonding, the mechanism of viral uptake by shellfish mucus
Appl. Environ. Microbiol. 33 : 19-25.
- DIMITROV D.H., GRAHAM D.Y., ESTES M.K. (1985)
Detection of rotavirus by nucleic acid hybridization with cloned DNA of simian rotavirus SA11 genes
J. Inf. Dis., 152 : 293-300.
- ELLENDER R.D., MAPP J.B., MIDDLEBROOKS B.L. COOK D.W., CAKE E.W. (1980)
Natural enterovirus and faecal coliform contamination of gulf coast oysters
J. Food Prot., 43 : 105-110.
- ESTES M.K., GRAHAM D.Y., GERBA C.P., SMITH E.M. (1979)
Simian rotavirus SA 11 replication in cell cultures
J. Virol., 3 : 810-815.
- EYLES M.J. (1980)
Accumulation and elimination of viruses by oysters
Food Technol. Aust., 32 : 89-91.
- EYLES M.J., DAVEY G.R., HUNTLEY E.J. (1981)
Demonstration of a viral contamination of oysters responsible for an outbreak of viral gastroenteritis
J. Food Prot., 44 : 294-296.
- FARRAH S.R., GOYAL S.M., GERBA C.P., WALLIS C., MELNICK J.L. (1977)
Concentration of enteroviruses from estuarine water
Appl. Environ. Microbiol., 33 : 1192-1196.
- FATTAL B., VASL R.J., KATZENELSON E., SHUVAL H.I. (1983)
Survival of bacterial indicator organisms and enteric viruses in the mediterranean coastal waters of Tel-Aviv
Wat. Res., 17 : 397-402.
- FINANCE C., VILLEVAL F., BLOCK J.C., SCHWARTZBROD L. (1981)
Improved methods for virological analysis of food
Appl. Environ. Microbiol., 42 : 176-179.

- FLEHMIG B. (1980)
Hepatitis A virus in cell culture. I- Propagation of different hepatitis A virus isolates in a fetal rhesus monkey cell line (Frhk-4)
Med. Microbiol. Immunol., 168 : 239-248.
- FUGATE K.J., CLIVER D.O., HATCH M.T. (1975)
Enteroviruses and potential bacterial indicators in gulf coast oysters
J. Milk Food Technol., 38 : 100-104.
- FUJIOKA R.S., DOW M.A., YONEYAMA B.S. (1986)
Comparative disinfection of indicator bacteria and poliovirus by chlorine dioxide
Wat. Sci. Tech., 18 : 125-132.
- FUJIOKA R.S., LOH P.C., LAU L.S. (1980)
Survival of human enteroviruses in the Hawaiian ocean environment : evidence for virus inactivating microorganisms
Appl. Environ. Microbiol., 39 : 1105-1110.
- GAILLOT D. (1986)
Etude de la contamination expérimentale des moules par le virus poliomyélitique
Thèse de doctorat en pharmacie - NANCY. 118 p.
- GAILLOT D., TERVER D., FINANCE C. SCHWARTZBROD L. (1988)
Improved method for contamination of mussels by poliovirus
Int. J. Food Microbiol., 6 : 333-339.
- GAUTHIER M., PIETRI C. (1989)
Devenir des bactéries et virus entériques en mer
Dans "Micro-organismes dans les écosystèmes océaniques"
M. BIANCHI, D. MARTY, J.C. BERTRAND, P. CAUMETTE, M. GAUTHIER
Edit. MASSON - PARIS.
- GENTHE B., IDEMA G.K., KFIR R., GRABOW W.O.K. (1991)
Detection of rotavirus in south african waters: a comparison of a cytoimmunolabelling technique with commercially available immunoassays
Wat. Sci. Tech., 24 : 241-244.
- GERBA C.P. (1988)
Viral disease transmission by seafoods
Food Technol., 3 : 99-103.
- GERBA C. P., GOYAL S.M. (1978)
Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish : a review
J. Food Prot., 41 : 743-754.
- GERBA C. P., GOYAL S.M., LECH I., BOGDAN G.F. (1980)
Bacterial indicators and environmental factors as related to contamination of oysters by enteroviruses
J. Food Prot., 43 : 99-101.

- GERBA C.P., MARGOLIN A.B., HEWLETT M.J. (1989)
Application of gene probes to virus detection in water
Wat. Sci. Tech., 21 : 147-154.
- GILL O.N., CUBITT W.D., MC SWIGGAN D.A., WATNEY B.M., BARTLETT C.L.R. (1983)
Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses
Br. Med. J., 287 : 1532-1534.
- GIRONES R., JOFRE J.T., BOSCH A., (1989) (a)
Natural inactivation of enteric viruses in seawater
J. Environ. Qual., 18 : 34-39.
- GIRONES R., JOFRE J.T., BOSCH A., (1989) (b)
Isolation of marine bacteria with antiviral properties
Can. J. Microbiol., 35 : 1015-1021.
- GOH K.T., CHAN L., DING J.L., OON C.J. (1984)
An epidemic of cockles associated hepatitis A in Singapore
W.H.O. Bull. 62 : 893-897.
- GOYAL S.M., GERBA C.P., MELNICK J.L. (1979)
Human enteroviruses in oysters and their overlaying waters
Appl. Environ. Microbiol., 37 : 572-581.
- GRABOW W.O.K. (1986)
Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water
Wat. Sci. Tech., 18 : 159-165.
- GRABOW W.O.K., GAUSS-MULLER V., PROZECKY O.W., DEINHARDT F. (1983)
Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals
Appl. Environ. Microbiol., 46 : 619-624.
- GRABOW W.O.K., IDEMA G.K., COUBROUGH P., BATEMAN B.W., (1989)
Selection of indicator systems for human viruses in polluted seawater shellfish
Wat., Sci. Tech., 21 : 111-117.
- GROHMANN G.S., MURPHY A.M., CHRISTOPHER P.J., AUTY E., GREENBERG H.B. (1981)
Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters
Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., 59 : 219-228.
- GUNN R.A., JANOWSKI H.T., LIEB S., PRATHER E.C., GREENBERG H.B. (1982)
Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption
Am. J. Epidemiol., 115 : 348-351.

- GUZEWICH J.J., MORSE D.L. (1986)
Sources of shellfish in outbreaks of probable viral gastroenteritis : implications for control
J. Food Prot., 49 : 389-394.
- HARRIS G.D., ADAMS V.D., SORENSEN D.L., CURTIS M.S. (1987)
Ultraviolet inactivation of selected bacteria and viruses with photoreactivation of the bacteria
Wat. Res., 21 : 687-692.
- HAVELAAR A.H. (1987)
Bacteriophages as model organisms in water treatment
Microbiol. Sci., 4 : 362-364.
- HELLER D., GILL O.N., RAYNHAM E., KIRKLAND T., ZADICK P.M., STANWELL SMITH R. (1986)
An outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters
Br. Med. J., 292 : 1726-1727.
- HERBOLD K., FLEHMIG B., BOTZENHART K. (1989)
Comparison of ozone inactivation in flowing water of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicators organisms
Appl. Environ. Microbiol., 55 : 2949-2953.
- HOFF J.C., BECKER R.C. (1969)
The accumulation and elimination of crude and clarified poliovirus suspensions by shellfish
Am. J. Epidemiol., 90 : 53-61.
- HUGUES B. (1981)
Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie. Application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique
Thèse de doctorat de l'Université de METZ. 285 p.
- HUGUES B., BOUGIS M.A., PLISSIER M., ANDRE M., LAURENT D., PAGRIARDINI A. (1979)
Evaluation de la contamination virale marine après rejet d'un effluent par un émissaire en mer
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 169 : 253-264.
- HUNT D.A. (1980)
Microbiological standards for shellfish growing areas. What do they mean ?
J. Food Prot., 43 : 127-128.
- HURST C.J. (1990)
Virological analysis of environmental water samples
Dans "Methods for the investigation and prevention of waterborne disease outbreaks"
EPA/600/1-90/005 a.

- HURST C.J., GERBA C.P. (1980)
Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water
Appl. Environ. Microbiol., 39 : 1-5.
- IDEMA G.K., BATEMAN B.W., KFIR R., GRABOW W.O.K. (1991)
A comparison of methods for the isolation of a wide range of viruses from shellfish
Wat. Sci. Tech., 24 : 427-430.
- JANSONS J., BUCENS M.R. (1986)
Concentration of rotavirus by ultrafiltration
Wat. Res., 20 : 79-83.
- JIANG X., ESTES M.K., METCALF T.G., MELNICK J.L. (1986)
Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization with c DNA probes
Appl. Environ. Microbiol., 52 : 711-717.
- JOFRE J., BLASI M., BOSCH A., LUCENA F. (1989)
Occurrence of bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* and other viruses in polluted marine sediments
Wat. Sci. Tech., 21 : 15-19.
- JOFRE J., BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R., TARTERA C., (1986)
Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water
Wat. Sci. Tech., 18 : 167-173.
- JOHNSON K.M., COOPER R.C., STRAUBE D.C. (1981)
Procedure for recovery of enteroviruses from the japanese cockle *Tapes japonica*
Appl. Environ. Microbiol., 41 : 932-935.
- Journal officiel du 23 novembre 1976
arrêté du 12 octobre 1976 sur les normes de salubrité des zones conchylicoles.
- Journal officiel des Communautés Européennes du 10 novembre 1979
Directive du conseil du 30 octobre 1979 relative à la qualité requise des eaux conchylicoles 79/923/CEE.
- Journal officiel des Communautés Européennes du 24 septembre 1991
Directive du conseil du 15-07-91 fixant les règles sanitaires régissant la production et la mise sur le marché de mollusques bivalves vivants. 91/492/CEE.
- KATZENELSON E., FATTAL B., HOSTOVESKY H. (1976)
Organic flocculation: an efficient second step concentration method for the detection of viruses in tap water
Appl. Environ. Microbiol., 32 : 638-639.
- KAWAMURA K., KANEKO M., HIRATA T., TAGUCHI K. (1986)
Microbial indicators for the efficiency of disinfection processes
Wat. Sci. Tech., 18 : 175-184.

- KESWICK B.H., SATTERWHITE T.K., JOHNSON P.C., DUPONT H.L., SECOR S.L., BITSURA J.A., GARY W., HOFF J.C. (1985)
Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine
Appl. Environ. Microbiol., 50 : 261-264.
- KOSTENBADER K.D., CLIVER D.O. (1972)
Polyelectrolyte flocculation as an aid to recovery of enteroviruses from oysters
Appl. Microbiol., 24 : 540-543.
- LANDRY E.F., VAUGHN J.M., VICALÉ T.J. (1980)
Modified procedure for extraction of poliovirus from naturally infected oysters using Cat-floc and beef extract
J. Food Prot., 43 : 91-94.
- LANDRY E.F., VAUGHN J.M., VICALÉ T.J., MANN R. (1982)
Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated poliovirus in oysters
Appl. Environ. Microbiol., 44 : 1362-1369.
- LANDRY E.F., VAUGHN J.M., VICALÉ T.J., MANN R. (1983)
Accumulation of sediment-associated viruses in shellfish
Appl. Environ. Microbiol., 45 : 238-247.
- LARKIN E.P., METCALF T.G. (1980)
Cooperative study of methods for the recovery of enteric viruses from shellfish
J. Food Prot., 43 : 84-86.
- LEE J.C., LEE L.L.Y. (1981)
Preferential solvent interactions between proteins and polyethylene glycols
J. Biol. Chem., 256 : 625-631.
- LEWIS G., LOUIT M.W., AUSTIN F.J. (1986)
Enteroviruses in mussels and marine sediments and depuration of naturally accumulated viruses by green lipped mussels (*Perna canaliculus*)
N. Zeal. J. Mar. Freshwat. Res., 20 : 431-437.
- LEWIS G.A., METCALF T.G. (1988)
Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses including hepatitis A virus and human rotaviruses from oysters, water and sediment samples
Appl. Environ. Microbiol., 54 : 1983-1988.
- LIEW P., GERBA C.P. (1980)
Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment
Appl. Environ. Microbiol., 40 : 305-308.
- LINCO S.J., GROHMANN G.S. (1980)
The Darwin outbreak of oyster associated viral gastroenteritis
Med. J. Aust., 1 : 211-213.

- LIU O.C., SERAICHEKAS H.R., MURPHY B.L. (1967)
Viral depuration of the Northern quahaug
Appl. Microbiol., 15 : 307-315.
- LUBET P. (1978)
Nutrition des lamellibranches (huîtres, moules)
Océanis, 4 : 23-54.
- LUCENA F., FINANCE C., JOFRE J., SANCHO J., SCHWARTZBROD L. (1982)
Viral pollution determination of superficial waters (river water and seawater from the urban area of Barcelona, Spain)
Wat. Res., 16 : 173-177.
- MACKOWIAK P.A., CARAWAY C.T., PORTNOY B.L. (1976)
Oyster associated hepatitis : lessons from the Louisiana experience
Am. J. Epidemiol., 103 : 181-191.
- MARGOLIN A.B., HEWLETT M.J., GERBA C.P. (1991)
The application of a poliovirus c DNA probe for the detection of enteroviruses in water
Wat. Sci. Tech., 24 : 277-280.
- MARTEIL L. (1976)
La conchyliculture française : 2ème partie : biologie de l'huître et de la moule
Edit ISTM - NANTES
- MARTEIL L. (1979)
La conchyliculture française : 3ème partie : l'ostréiculture et la mytiliculture
Revue des travaux de l'Institut des Pêches Maritimes, 43 : 5-130.
- MARTINS M.T., SOARES L.A., MARQUES E., MOLINA A.G. (1983)
Human enteric viruses isolated from effluents of sewage treatment plants in Sao Paulo, Brazil
Wat. Sci. Tech., 15 : 69-73.
- MAURIN J., DEMILLAC R. (1981)
Application de la méthode d'adsorption-élution sur poudre de verre à la mise en évidence des virus hydriques présents dans les rejets de stations d'épuration et dans les eaux superficielles de la région rennaise
Tech. Sci. Munic., 81 : 147-150.
- METCALF T.G., ECKERSON D., MOULTON E., LARKIN E.P. (1980) (a)
Uptake and depletion of particulate associated polioviruses by the soft shell clam
J. Food Prot., 43 : 87-88.
- METCALF T.G., MOULTON E., ECKERSON D. (1980) (b)
Improved method and test strategy for recovery of enteric viruses from shellfish
Appl. Environ. Microbiol., 39 : 141-152.

- METCALF T.G., MULLIN B., ECKERSON D., MOULTON E., LARKIN E.P. (1979)
Bioaccumulation and depuration of enteroviruses by the soft shelled clam, *Mya arenaria*
Appl. Environ. Microbiol., 38 : 275-282.
- METCALF T.G., STILES W.C. (1965)
The accumulation of enteric viruses by the oyster *Crassostrea virginica*
J. Infect. Dis, 115 : 68-76.
- METCALF T.G., STILES W.C. (1968)
Viral pollution of shellfish in estuary waters
J. Sanit. Eng. Div. Am. Soc. Cir. Eng., 94 : 595-608.
- MESQUITA M.M.F. (1988)
Effects of seawater contamination level and exposure period on the bacterial and viral accumulation and elimination processes by *Mytilus edulis*
Wat. Sci. Tech., 20 : 265-270.
- MITCHELL J.R., PRESNELL M.W., AKIN E., CUMMINS J.M., LIU O.C. (1966)
Accumulation and elimination of poliovirus by the eastern oyster
Amer. J. Epid., 84 : 40-50.
- MOREL M. (1989)
Purification des moules dans de l'eau de mer désinfectée aux U.V.
Rapport IFREMER - DRV/CRSU 89-028 - BOULOGNE SUR MER.
- MORINET F., FERCHAL F., COLIMON R., PEROL Y. (1984)
Comparaison de six techniques pour la détection de rotavirus humains dans les selles
Eur. J. Clin. Microbiol., 43 : 136-140.
- MORSE D.L., GUZEWICH J.J., HANRAHAN J.P., STRICOF R., SHAYEGANI M., DEIBEL R., GRABAU J.C., NOWAK N.A., HERRMAN J.E., CUKOR G., BLACKLOW N.R. (1986)
Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis - Role of Norwalk virus
N. Engl. J. Med., 314 : 678-681.
- MURPHY A.M., GROHMANN G.S., CHRISTOPHER P.J., LOPEZ W.A., DAVEY G.R., MILLSOM R.H. (1979)
An australian wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus
Med. J. Aust., 2 : 329-333.
- NOZAWA C.M., LAMPE E., VAZ M.G.S., VON HUBINGER M.G. (1989)
Human rotavirus detection in infantile acute diarrhoea. I - A comparative study of immunodiffusion in agarose gel (ID) and electron microscopy (EM)
Rev. Lat. amer. Microbiol., 31 : 63-66.
- OHARA H., NARUTO H., WATANABE N., EBISAWA I. (1983)
An outbreak of hepatitis A caused by consumption of raw oysters
J. Hyg. Camb., 91 : 163-165.

- O'MAHONY M., GOOCH C.D., SMYTH D.A., THRUSSELL A.J. BARTLETT C.L.R., NOAH N.D. (1983)
Epidemic hepatitis A from cockles
Lancet, *j* : 518-520.
- ORAGUI J.I., MARA D.D. (1989)
Simple method for the detoxification of wastewater ultrafiltration concentrates for rotavirus assay by indirect immunofluorescence
Appl. Environ. Microbiol., 55 : 401-405.
- PAILLARD H, SIBONY J. (1986)
Désinfection des eaux résiduaires
Océanis, 12 : 491-509.
- PATTI A.M., AULICINO F.A., DE FILLIPIS P., GABRIELI R., VOLTERRA L., PANA A. (1990)
Identification of enteroviruses isolated from seawater : indirect immunofluorescence (IIF)
Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 66 : 595-600.
- PATTI A.M., SANTI A.L., GABRIELI R., FIAMMA S., CAULETTI M., PANA A. (1987)
Hepatitis A virus and poliovirus 1 inactivation in estuarine water
Wat. Res., 21 : 1335-1338.
- PAYMENT P., TREMBLAY M., TRUDEL M. (1985)
Relative resistance to chlorine of poliovirus and coxsackie virus isolated from environmental sources and drinking water
Appl. Environ. Microbiol., 49 : 981-983.
- PAYMENT P., TRUDEL M. (1985)
Immunoperoxidase method with human immune serum globuline for broad-spectrum detection of cultivable viruses in environmental sample
Appl. Environ. Microbiol., 50 : 1308-1310.
- PAYMENT P., TRUDEL M. (1989)
Manuel de techniques virologiques
Edit. Ellipses - PARIS.
- PERKINS F.O., HAVEN D.S., MORALES-ALAMO R., RHODES M.W. (1980)
Uptake and elimination of bacteria in shellfish
J. Food Prot., 48 : 124-126.
- PHILIPSON L., ALBERTSSON P.A., FRICK G. (1960)
The purification and concentration of viruses by aqueous polymer phase systems
Virology, 11 : 553-571.
- PIETRI C., MUNRO J. (1989)
Recherche de la contamination virale des coquillages
Rapport contrat INSERM-IFREMER - n° 875580385

- PIETRI C., PUEL D., CRANCE J.M., PASSAGOT J., BIZIAGOS E., DELOINCE R. (1987)
Contrôle sanitaire des coquillages: étude préliminaire sur les méthodologies de détection du virus de l'hépatite A
J. Fr. Hydrol., 18 : 157-165.
- POGGI R. (1986) (a)
Epidémiologie en zone littorale
Océanis, 12 : 439-448.
- POGGI R. (1986) (b)
Qualités requises des eaux conchylicoles et organisation de leur surveillance
T.S.M. - L'eau, 11 : 530-538.
- POGGI R. (1990)
Impacts sanitaires des contaminations microbiologiques
La mer et les rejets urbains - Bendor, 13-15 juin 1990
IFREMER, Actes de colloques 11 : 115-132.
- POWER U.F., COLLINS J.K. (1989)
Differential depuration of poliovirus, *Escherichia coli*, and a coliphage by the common mussel, *Mytilus edulis*
Appl. Environ. Microbiol., 55 : 1386-1390.
- POWER U.F., COLLINS J.K. (1990)
Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration
Appl. Environ. Microbiol., 56 : 803-807.
- PROST A., BOUTIN P. (1989)
Le risque infectieux lors de l'utilisation d'eaux usées en agriculture
T.S.M. - L'eau, 1 : 25-33
- PURCELL R.H., WONG D.C., MORITSUGU Y., DIENSTAG J.L., ROUTENBERG J.A., BOGGS J.D. (1976)
A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody
J. Immuno., 116 : 349-356
- QUERO A.M., DAIREAUX M.A., FONTANGES R., BEAURY M.Y., LAINE G. (1984)
Détermination de l'activité virucide des antiseptiques par une méthode de filtration sur gel
Path. Biol., 32 : 636-639.
- RAO V.C., METCALF T.G., MELNICK J.L. (1986) (a)
Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters
Appl. Environ. Microbiol. 52 : 484-488.
- RAO V.C., METCALF T.G., MELNICK J.L. (1986) (b)
Human viruses in sediments, sludges, and soils
W.H.O. Bull. , 64 : 1-14.

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

RICHARDS G.P. (1985)
Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United-States :
requisite for development of viral guidelines
J. Food Prot., 48 : 815-823.

RICHARDS G.P. (1988)
Microbial purification of shellfish : a review of depuration and relaying
J. Food Prot., 51 : 218-251.

RICHARDS G.P., GOLDMINTZ D., GREEN D.L., BABINCHAK J.A. (1982)
Rapid methods for extraction and concentration of poliovirus from oyster tissues
J. Virol. Meth., 5 : 285-291.

ROY D., ENGELBRECHT R.S., CHIAN E.S.K. (1982)
Comparative inactivation of six enteroviruses by ozone
J. Am. Water Works Assoc., 74 : 660-664.

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

SCHWARTZBROD L. (1984)
Epidémiologie des maladies virales à transport hydrique
Microbiol. Alim. Nut., 2 : 217-231.

SCHWARTZBROD L. (coordinateur) (1991)
Virologie des milieux hydriques
Edit. LAVOISIER, Tec et Doc - PARIS.

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

SCHWARTZBROD L., GAILLOT D., TERVER D., FINANCE C. (1987)
Contamination virale des moules : étude expérimentale en aquarium
Sci. Aliments, 7 : 307-312.

SCHWARTZBROD L., JEHL-PIETRI C., BOHER S., HUGUES B., ALBERT M., BERIL
C. (1990)
Les contaminations par les virus
La mer et les rejets urbains - Bendor, 13-15 juin 1990
IFREMER, Actes de colloques, 11 : 101-114.

- SCHWARTZBROD L., LUCENA F., FINANCE C. (1979)
Etude quantitative de la population virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires
J. Fr. Hydrol., 10 : 7-20.
- SCHWARTZBROD L., MONTANIE H., LAMBERT V. (1989)
Comparison of two methods for virus recovery from mussels and oysters
Wat. Sci. Tech., 21 : 291-293.
- SCHWARTZBROD L., VILLEVAL F., FINANCE C., BLOCK J.C., SCHWARTZBROD J., JORET J.C., CAUMARTIN V., FOLIGUET J.M. (1981)
Etude de la qualité virale et bactérienne des aliments
Compte rendu contrat DGRST n° 79.7.0227 - décembre 81, 40 p .
- SHEAR C.L., GOTTLIEB M.S. (1980)
Shellfish borne disease control in the United States : a commentary
Med. Hypotheses, 6 : 315-327.
- SCOTTI P.D., FLETCHER G.C., BUISSON D.H., FREDERICKSEN S. (1983)
Virus depuration of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*) in New Zealand
N. Z. J. Sci., 26 : 9-13.
- SIMMONDS R.S., LOUITIT M.W., AUSTIN F.J. (1983)
Enteric viruses in New Zealand wastewaters
N. Z. J. Sci., 26 : 437-441.
- SLADE J.S. (1982)
Virus removal by a modern sewage treatment works
Dans "Viruses and disinfection of water and wastewater"
Edit. M. Butler , University of Surrey Press, Surrey, G.B.
- SMITH E.M., GERBA C.P. (1982)
Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage
Appl. Environ. Microbiol., 43 : 1440-1450.
- SMITH E.M., GERBA C.P., MELNICK J.L. (1978)
Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment
Appl. Environ. Microbiol., 35 : 685-689.
- SOBSEY M. (1989)
Inactivation of health related microorganisms in water by disinfection processes
Wat. Sci. Tech., 21 : 179-195.
- SOBSEY M.D. , DAVIS A. L., RULLMAN V.A. (1987)
Persistence of hepatitis A virus and other viruses in depurated eastern oysters
Proc. Oceans 87, Halifax, Nova Scotia, 5 : 1740-1745.
- SOBSEY M.D., HACKNEY C.R., CARRICK R.J., RAY B., SPECK M.L. (1980)
Occurrence of enteric bacteria and viruses in oysters
J. Food Prot., 43 : 111-113.

- SPEIRS J.I., PONTE FRACT R.D., HARWIG J. (1987)
Methods for recovering poliovirus and rotavirus from oysters
Appl. Environ. Microbiol., 53 : 2666-2670.
- STEINMANN J. (1977)
Detection of viruses in water of the Baltic sea
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 164 : 492-497.
- STRAPPE P. (1991)
Rotavirus detection - a problem that needs concentration
Wat. Sci. Tech., 24 : 221-223.
- SULLIVAN R., PEELER J.T. (1982)
Evaluation of a method for recovery of virus from oysters
J. Food. Prot., 45 : 636-637.
- SULLIVAN R., PEELER J.T., TIERNEY J.T., LARKIN E.P. (1984)
Evaluation of a method for recovering poliovirus 1 from 100-gram oyster samples
J. Food Prot., 47 : 108-110.
- TERVER D. (1989)
Manuel d'aquariologie : 1. l'aquarium - eau douce, eau de mer
Réalisations Editoriales Pédagogiques - PARIS.
- TIERNEY J.T., FASSOLITIS A., VAN DONSEL D., RAO V.C., SULLIVAN R., LARKIN E.P. (1980)
Glass wool hydroextraction method for recovery of human enteroviruses from shellfish
J. Food Prot., 43 : 102-104.
- TIERNEY J.T., SULLIVAN R., PEELER J.T., LARKIN E.P. (1982)
Persistence of polioviruses in shellstock and shucked oysters stored at refrigeration temperature
J. Food Prot., 45 : 1135-1137.
- TIERNEY J.T., SULLIVAN R., PEELER J.T., LARKIN E.P. (1985)
Detection of low numbers of poliovirus 1 in oysters : collaborative study
J. Assoc. Off. Anal. Chem., 68 : 884-890.
- TOWNSEND COLE M., KILGEN M.B., HACKNEY C.R. (1986)
Evaluation of methods for extraction of enteric virus from Louisiana oysters
J. Food Prot., 49 : 592-595.
- VAUGHN J.M., CHEN Y.S., LINDBURG K., MORALES D. (1987)
Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone
Appl. Environ. Microbiol., 53 : 2218-2221.
- VAUGHN J.M., LANDRY E.F., THOMAS M.Z., VICALE T.J., PENELLO W.F. (1979)
Survey of human enterovirus occurrence in fresh and marine surface waters on Long-Island
Appl. Environ. Microbiol., 38 : 290-296.

- VAUGHN J.M., LANDRY E.F., VICALÉ T.J., DAHL M.C. (1979)
Modified procedure for the recovery of naturally accumulated poliovirus from oysters
Appl. Environ. Microbiol., 38 : 594-598.
- VAUGHN J.M., LANDRY E.F., VICALÉ T.J., DAHL M.C. (1980)
Isolation of naturally occurring enteroviruses from a variety of shellfish species residing in Long-Island and New Jersey marine embayments
J. Food Prot., 43 : 95-98.
- VOGT R.L., SATKIN F. (1986)
Clam associated gastroenteritis
N. Engl. J. Med., 315 : 582-583.
- WAIT D.A., HACKNEY C.R., CARRICK R.J., LOVELACE G., SOBSEY M.D (1983)
Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams
J. Food Prot., 46 : 493-496.
- WEST P.A., WILLIAMS R.F. (1988)
Modification of an american public health association (APHA) procedure for virological examination of pacific oysters (*Crassostrea gigas*)
Edit. A.P.H.A. , Virology methods for oysters. 16 p.
- WYSHAK G., DETRE K. (1972)
Estimating the number of organisms in quantal assays
Appl. Microbiol., 23 : 784-790.
- YAO G.B. (1989)
Chemical and natural history of hepatitis A in an epidemic in Shangaï 1988
International symposium on viral hepatitis and liver disease - Houston

**ETUDE DE LA CONTAMINATION
VIRALE DES SEDIMENTS MARINS
EN ZONE DE MYTILICULTURE**

RECHERCHE DE LA CONTAMINATION VIRALE DES SEDIMENTS MARINS EN ZONE DE MYTILICULTURE

INTRODUCTION

Les sédiments marins et fluviaux constituent un important réservoir de virus pathogènes pour l'homme. En effet, les virus entériques présents dans l'eau sont dans plus de 90 % des cas adsorbés ou associés avec des particules en suspension ou de la matière organique. Cette association a deux conséquences pratiques essentielles : d'une part elle a un effet de protection sur les particules virales vis à vis des agressions extérieures, d'autre part elle provoque la sédimentation rapide des virus qui s'accumulent dans la couche superficielle qui est facilement mobilisable. En cas de turbulences (marées, courants, passage de bateaux etc...), la plus grande partie de cette micro-couche passe rapidement en suspension, surtout dans la zone côtière de faible profondeur. Dans ces conditions, après leur remise en suspension, les particules virales sont susceptibles d'être transportées à distance vers des zones présumées non polluées telles que les zones conchylicoles au niveau desquelles elles pourront être ingérées par des mollusques.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Le travail a pour objectif en liaison avec le programme "Modélisation de la qualité bactériologique des eaux de zones conchylicoles" initié par IFREMER, de tenter de déterminer le niveau de contamination virale (virus entériques) des eaux et des sédiments fluviaux et marins en amont ou au niveau de zones conchylicoles.

MATERIEL ET METHODES

1. - Site d'études et lieux de prélèvements

L'étude a été réalisée sur la région Ouest-Cotentin comprise entre le Havre de Geffosses au nord et Granville au sud. Les points de prélèvements sont indiqués sur le figure n°1 pour les sédiments et sur la figure n°2 pour les eaux.

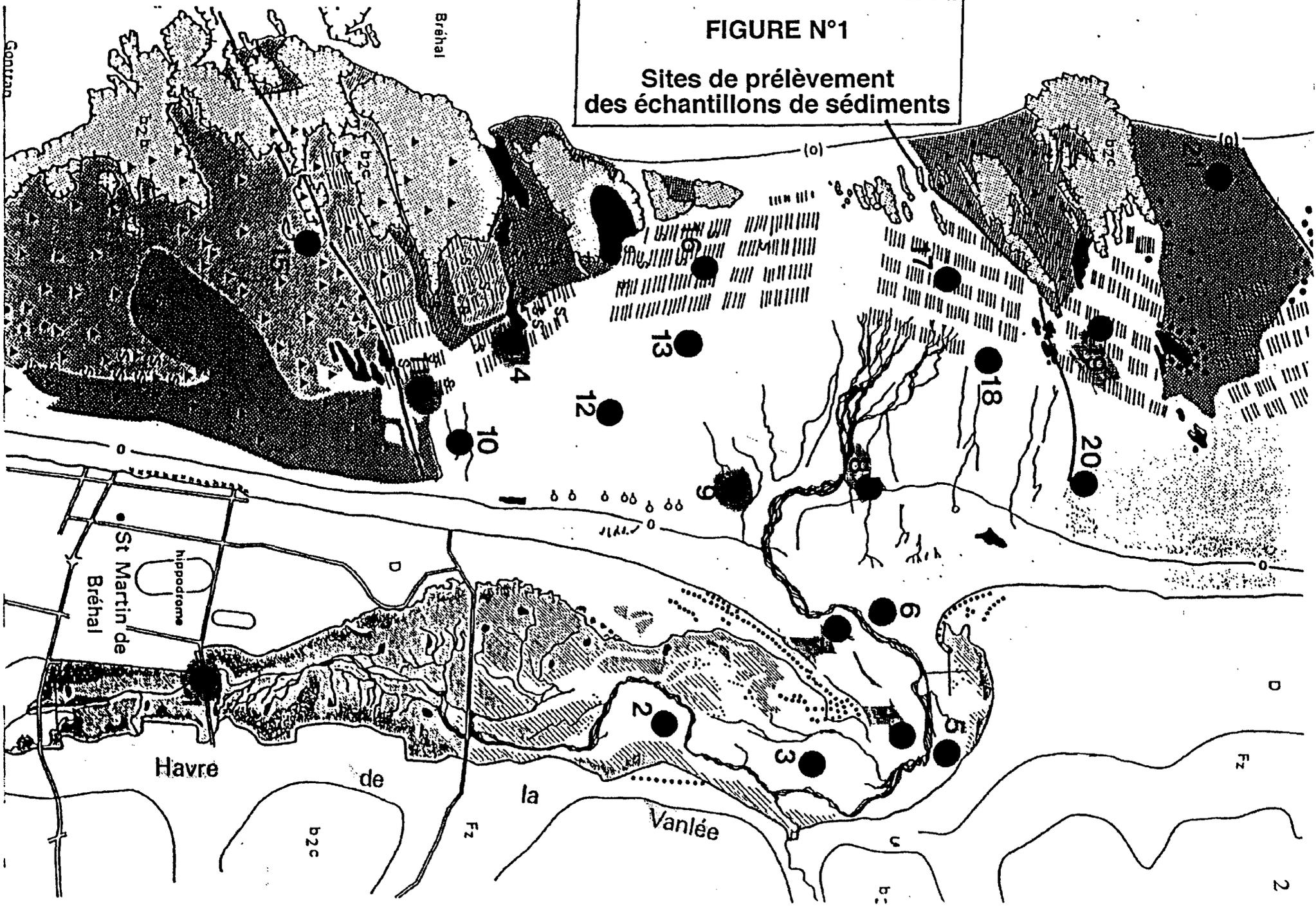
2. - Echantillonnage

L'analyse a été réalisée sur :

- 12 échantillons de sédiments de 1 kg prélevés dans des bocaux stériles et adressés en containers isothermes à +4° C au Laboratoire de Virologie qui les a réceptionnés sous 24 heures.

Le tableau 1 indique les points et les dates de prélèvements des échantillons de sédiments.

FIGURE N°1
Sites de prélèvement
des échantillons de sédiments



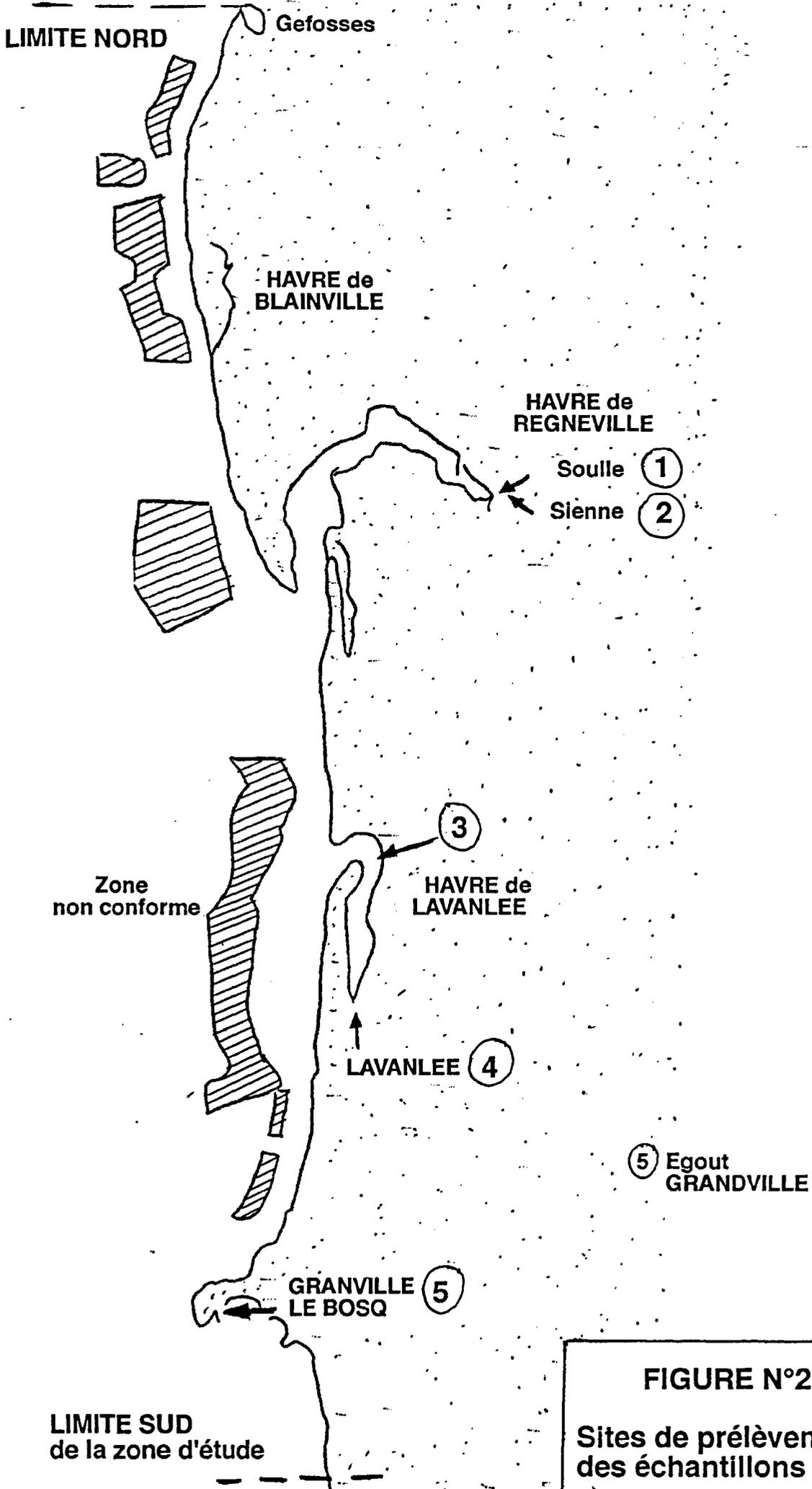


FIGURE N°2
Sites de prélèvement
des échantillons d'eau

Lieu de prélèvement	Date d'arrivée des prélèvements au laboratoire
Point 1	17/10/90 et 06/12/90
Point 3	06/12/90
Point 4	05/12/90
Point 7	05/12/90
Point 8	05/12/90
Point 9	17/10/90
Point 11	17/10/90
Point 14	17/10/90 et 06/12/90
Point 16	06/12/90
Point 19	05/12/90

Tableau n°1 : Localisation et date de prélèvement des échantillons de sédiments

- 20 échantillons de 20 à 25 litres d'eau prélevés dans des bidons plastiques stériles et adressés au laboratoire qui les a reçus sous 24 heures.

Le tableau 2 indique les points et les dates de prélèvement des échantillons d'eaux.

Lieu de prélèvement	Date d'arrivée des prélèvements au laboratoire
Point 1	03, 04, 09, 10 /04/91
Point 2	03, 04, 09, 10 /04/91
Point 3	03, 04, 09, 10 /04/91
Point 4	03, 04, 09, 10 /04/91
Point 5	03, 04, 09, 10 /04/91

Tableau n°2 : Localisation et date de prélèvements des échantillons d'eaux

3. - Technique de récupération des virus entériques à partir des sédiments

Le protocole (ALBERT, 1989) utilisé pour obtenir les virus sous un faible volume à partir de l'échantillon, comporte d'abord une extraction-élution des virus associés aux particules des sédiments, par agitation avec un tampon alcalin, associée à une sonication, ensuite une concentration par précipitation avec le Polyéthylène-glycol 6000 (PEG 6000) comme cela est résumé dans la figure 3. Pour chaque échantillon l'extraction a été réalisée à partir de 3 prises d'essai de 100 g. Les 3 extraits obtenus ont ensuite été rassemblés et l'ensemble a été concentré par action du PEG 6000.

4. - Technique de concentration des virus entériques à partir des eaux

Les virus présents dans l'échantillon d'eau ont été concentrés en mettant en oeuvre une technique d'adsorption-élution sur laine de verre décrite en 1988 par VILAGINES et al. Dans un premier temps, l'échantillon d'eau est filtrée sur une cartouche (Sartorius ref. : SM 16223) contenant 5g de laine de verre (Saint-Gobain réf. : Rantigny 725). Cette laine de verre, tassée de manière à obtenir un poids spécifique de $0,4 \text{ g/cm}^3$ a été préalablement rincée séquentiellement par 10 ml de HCl 1N, 10 ml d'eau déminéralisée, 10 ml de NaOH 1N et 40 ml d'eau déminéralisée. Dans un deuxième temps, les virus adsorbés ont été élués avec un tampon borate 0,05 M de pH 9,5 contenant 3 % d'extrait de boeuf et additionné de rouge de phénol. Les 25 premiers ml d'éluant sont recueillis et constituent le concentrat viral. Les volumes concentrés varient de 16 à 20 litres.

5. - Traitement des concentrats

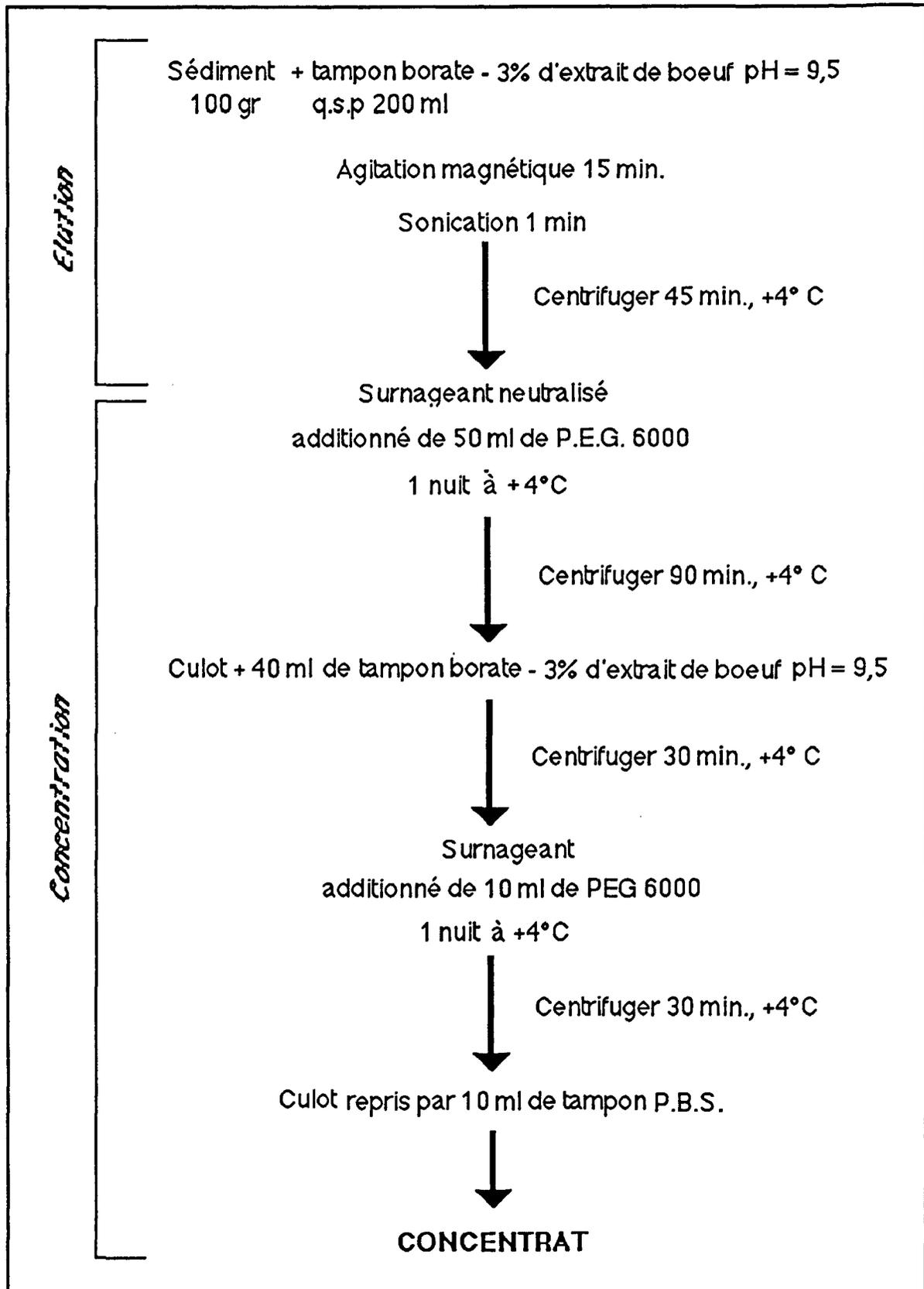
Les concentrats viraux provenant de sédiments ou d'échantillons d'eaux ont subi un traitement de décontamination de façon à éliminer les bactéries et les fungi présents susceptibles de provoquer la destruction des cultures cellulaires. Pour ce faire il est ajouté un mélange d'antibiotiques (réf. : BLOCK et SCHWARTZBROD, 1989) à raison de 0,1 ml/ml de concentrat ainsi qu'une solution de fungizone à 250 $\mu\text{g/ml}$ à raison de 0,02 ml/ml de concentrat.

6. - Mise en évidence des virus

La mise en évidence des virus entériques cultivables a été réalisée par inoculation sur des cultures de cellules MA 104 sous couverture gélosée et en présence de colorant vital de façon à pouvoir réaliser simultanément l'isolement et l'éventuelle quantification des particules virales présentes. Les concentrats ont étéensemencés à l'état pur et dilués au 1/2 et la période d'incubation à 37° C et d'observation des cultures cellulaires a été de 10 jours.

FIGURE N°3

Protocole de récupération des virus à partir des sédiments



RESULTATS

1. - Analyse des sédiments marins

A partir des 36 prises d'essai de 100 grammes analysées correspondant aux 12 échantillons aucun virus entérique cultivable n'a pu être isolé.

2. - Analyse des eaux

Les résultats de l'analyse des eaux sont rapportés dans le tableau n°3.

On constate que des virus entériques cultivables ont été isolés uniquement dans 3 échantillons correspondant au point de prélèvement n°5. Ils contiennent respectivement 21,8 - 18,5 et 19,2 UFP dans 20 litres d'eau.

Le point 5 correspond au point de rejet des eaux usées de Granville et la présence de virus entériques à ce niveau est tout à fait normale puisque les eaux usées constituent le réceptacle des fèces humaines. Cependant, il faut noter que la densité virale de ces échantillons est faible. Aucune particule n'a été décelée dans les 16 échantillons d'eaux de surface étudiées.

CONCLUSION

Contrairement à l'hypothèse de travail de départ, aucun virus entérique n'a pu être isolé des échantillons de sédiments. Des virus entériques ont bien été mis en évidence dans les eaux usées de la ville de GRANVILLE mais aucune particule virale n'a été observée dans les eaux de surface.

Deux hypothèses peuvent être faites pour expliquer ces résultats

- soit, l'apport contaminant continental est faible (eaux de surface négatives) et par voie de conséquence, le niveau de contamination virale des sédiments est sans aucun doute très faible,
- soit la sensibilité des techniques d'extraction-concentration et de mise en évidence des virus dans les échantillons de sédiments est trop faible pour pouvoir déceler de petites quantités de virus.

Tableau n°3

Résultats des analyses virologiques des eaux

Date de réception des prélèvements	N° de l'échantillon	Quantité de virus entériques cultivables (UFP/20 litres)
03/04/91	1	ND*
	2	ND
	3	ND
	4	ND
	5	21,8 UFP
04/04/91	1	ND
	2	ND
	3	ND
	4	ND
	5	18,5 UFP
09/04/91	1	ND
	2	ND
	3	ND
	4	ND
	5	19,2 UFP
10/04/91	1	ND
	2	ND
	3	ND
	4	ND
	5	ND

ND : Non Détecté

BIBLIOGRAPHIE

ALBERT M. (1989)

Extraction des virus entériques des boues résiduaires et des sédiments.
Thèse Doct. Université de Metz, 181 p.

BLOCK J.C. and SCHWARTZBROD L. (1989)

Virus in water systems.
VCH edt. New-York, 136 p.

VILAGINES P., SARRETTE B., VILAGINES R. (1988)

Détection en continu du poliovirus dans les eaux de distribution publique.
C.R. Acad. Sci. Paris, 307, 171-176.