

Purification virale des coquillages

Phase 1 : Etude préliminaire

Février 2001

G. Brest, M. Monnier, Comité National de la Conchyliculture,
M. Pompey, M.P. Caprais, C. Le Mennec, P. Le Cann, S. Le Guyader,
L. Haugarreau, S. Parnaudeau, F. Loisy, DEL/MIC, IFREMER
J.C. Le Saux, IFREMER, DEL/LC/Concarneau
Y. Madec, Ets Conchylicole, S.A. Prat Ar Coum.



Contrat DAGL, Convention 2001- 44-70, article 20, 28 Février 2001, relative à l'évaluation des principes de la purification des coquillages pour l'élimination des virus entériques.

Ifremer

Cnc
COMITÉ NATIONAL DE
LA CONCHYLICULTURE

PRAT-AR-COUM



INTRODUCTION.....	3
1. ETAT DE L'ART.....	5
1.1. GÉNÉRALITÉS.....	5
1.2. PARAMÈTRES IMPLIQUÉS DANS LA PURIFICATION.....	7
<i>La contamination.....</i>	7
<i>La séquestration.....</i>	8
1.3. EFFICACITÉ DE LA PURIFICATION.....	9
1.3.1. <i>Rôle de certains paramètres sur l'efficacité du relargage.....</i>	9
1.3.2. <i>Etudes en laboratoire sur l'efficacité virale de la purification.....</i>	10
1.3.3. <i>Etudes en bassins professionnels ou en vraie grandeur.....</i>	10
1.4. HACCP ET CONCLUSION.....	14
2. MÉTHODE DE RECHERCHE DES VIRUS.....	15
2.1 LE BACTÉRIOPHAGE, INDICATEUR VIRAL.....	15
2.2. RECHERCHE DES CALICIVIRUS (VIRUS DITS DE "NORWALK") VIRUS DES GASTRO-ENTÉRITES.....	17
3. ETABLISSEMENT CONCHYLICOLE, SA PRAT AR COUM : ÉVALUATION DE L'EXISTANT .	20
3. 1. LOCALISATION.....	20
3.2. DESCRIPTIF DE LA STATION DE PURIFICATION EXISTANTE.....	21
3.3. NOTIFICATION DES PARAMÈTRES DANS UNE DÉMARCHE HCCP DE PURIFICATION.....	22
1. <i>Huîtres.....</i>	23
2. <i>Eaux.....</i>	23
3.4. CALIBRATION HYDRAULIQUE.....	24
3.5. VÉRIFICATION DU PIÉGEAGE DES VIRUS PAR LE FILTRE À SILEX ET DE L'EFFICACITÉ DES UV.....	25
3.5.1. <i>Caractéristiques techniques du filtre.....</i>	25
3.5.2. <i>Opération de lavage du 4 avril 2000.....</i>	26
3.5.3 <i>Vérification de l'efficacité des UV sur les bactériophages.....</i>	27
3.6. CALIBRATION AVEC DES COQUILLAGES ARTIFICIELLEMENT CONTAMINÉS EN BACTÉRIOPHAGES.....	28
3.7. EXPÉRIMENTATION SUR ÉCHANTILLONS NATURELS.....	30
4. ELABORATION D'UN PILOTE DE PURIFICATION CONCHYLICOLE.....	34
4.1. CARACTÉRISTIQUES TECHNIQUES.....	35
4.2. MATÉRIEL ÉQUIPANT LE BASSIN I.....	37
4.3. AMÉNAGEMENTS RÉALISÉS, ANNÉE 2000.....	38
5. CONCLUSION.....	39
ANNEXE I : BIBLIOGRAPHIE.....	40

Introduction

Ce travail s'insère dans un programme général appelé "Virus-Safe Seafood" dont l'objectif principal est de fournir des moyens rapides et efficaces pour évaluer, tout au long de la chaîne de production des coquillages, la contamination par des virus d'origine humaine, et de proposer une technologie innovante pour le contrôle de la qualité du produit et des procédés de purification. L'objectif final est d'assurer la sécurité alimentaire des produits de la mer.

Le problème de la contamination des coquillages est couramment sous-diagnostiqué et mal géré, bien que des études épidémiologiques ont relié des maladies virales (gastro-entérites et hépatite A) avec la consommation de coquillages répondant aux normes bactériologiques. Protéger le consommateur implique une action basée sur la spécificité du produit. Le coquillage est un aliment "unique", du fait des caractéristiques de l'animal (alimentation par filtration) et de la manière dont on le consomme (très peu cuit ou cru pour les huîtres). Cet animal est élevé en mer et l'environnement hydrique est la principale source de contamination. Il concentre les contaminants et, parmi eux, les virus entériques d'origine humaine qui sont capables de persister très longtemps dans les chairs de l'animal. Si une contamination virale intervient dans la zone de production, le coquillage peut être contaminé. Comme il a été démontré que les indicateurs bactériens ne sont pas corrélés à la présence de virus, la législation actuelle s'avère inefficace pour protéger le consommateur. Même si la législation européenne recommande la purification de coquillages contaminés par des bactéries fécales, l'action de la purification vis à vis des virus reste encore à démontrer. Une protection efficace du consommateur doit prendre en compte d'une part la contamination des zones de production (apports de virus à la côte et qualité de l'eau des parcs conchylicoles) et, d'autre part l'élimination des virus par les systèmes de purification : la chaîne de production à contrôler dans ce cas particulier, concerne la production sur parcs et la purification. Ces éléments sont pris en compte dans la construction et l'organisation du projet "Virus-Safe Seafood".

Une collaboration entre des partenaires de différents horizons a été établie de façon à rassembler les compétences nécessaires pour réaliser le projet. L'expérience de chercheurs et de producteurs impliqués dans cette étude sont complémentaires pour atteindre les trois objectifs suivants :

1. *La détermination des apports viraux et de la contamination des coquillages*
2. *L'évaluation de la persistance des entérovirus dans l'environnement*
3. *L'optimisation de la purification des coquillages*

Ce troisième objectif intéresse la Convention CNC/DGAL. Le travail consiste à :

- 3.1 Etudier l'efficacité des procédés existants avec des huîtres artificiellement contaminées,
- 3.2 Evaluer différents paramètres permettant d'améliorer la purification,
- 3.3 Appliquer, après validation le procédé sur des huîtres naturellement contaminées,
- 3.4 Evaluer la pertinence des indicateurs de contamination fécale (*E. coli* et bactériophages) vis-à-vis de la persistance ou de l'élimination des virus.

Cet ensemble d'étude doit procurer des outils capables d'évaluer la pertinence des normes européennes, de réduire le risque dû à la consommation des coquillages et de procurer à la conchyliculture un développement durable par l'obtention de données clefs concernant la décontamination des produits mis sur le marché.

Le programme "Virus Safe Seafood" est mené en collaboration avec l'INRA, l'Université de Barcelone (Espagne) les RIVM et le RIVO (Hollande), le SCIID (Suède), l'Université de Houston (USA) et le CNC. Il est cofinancé par la DGXII-5^{ième} PCRD (Contrat QLK1-CT-1999-00634).

L'objectif 3 est cofinancé par la Direction Générale de l'Alimentation et fait l'objet d'un travail collaboratif entre l'IFREMER, le CNC et les Ets Prat ar Coum. Le rapport de février 2001, correspond à la partie 3.1, il s'agit d'une étude préliminaire comprenant :

- Un résumé de l'état de l'art sur la purification virale des coquillages.
- L'évaluation d'un système professionnel existant.
- La conception et la construction d'un pilote.

1. Etat de l'art

1.1. Généralités

Afin de s'assurer de la qualité du produit, les zones de production conchylicole sont classées selon la directive de la communauté européenne du 15/07/91 (91/492/CEE) relative aux règles régissant la production et la mise sur le marché des mollusques bivalves vivants. Cette réglementation édictée en vue d'harmoniser, au sein des états membres, les conditions de mise sur le marché et les normes de salubrité des coquillages vivants, vise à assurer l'égalité des conditions de libre concurrence tout en limitant les risques sanitaires liés à la consommation de cette denrée.

Historiquement, il a été universellement admis que les coquillages répondant au critère "moins de 230 *E. Coli*/100g de chair et de liquide intervalvaire" (ou < 300 Coliformes Fécaux CF/100 g), pouvaient être mis directement sur le marché. La norme adoptée, aussi bien en Europe qu'aux USA, a amené les Etats à classer leurs zones de production selon quatre niveaux de salubrité associés à des usages réglementés : la zone A, produits pouvant être expédiés directement pour la consommation humaine, la zone B, impliquant une purification de la production avant consommation, la zone C où l'élevage est interdit excepté la pêche de juvéniles et la zone D où tous les usages sont interdits.

La transcription en droit français de la directive précitée s'est traduite sous la forme de deux textes réglementaires :

- Le décret n° 94-340 du 28/04/94 relatif aux conditions sanitaires de production et de mise sur le marché des coquillages vivants.
- L'arrêté du 21/05/99 relatif au classement de salubrité et à la surveillance des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants.

<i>E. coli</i> (E.C.) / 100 g de chair et de liquide intervalvaire	Zones	Exploitation	
		Elevage	Pêche Professionnelle gisement naturel
Seuils microbiologiques	Classement		
Au moins 90 % des résultats < 230 E.C. Aucun > 1000 E.C.	A	Autorisé (Consommation directe)	Autorisée (Consommation directe)
Au moins 90 % des résultats < 4600 E.C. Aucun > 46000 E.C.	B	Autorisé (Reparcage ou purification)	Autorisée (Reparcage ou purification)
Au moins 90 % des résultats < 46000 E.C.	C	Interdit (sauf dérogation préfectorale)	Autorisée (Reparcage de longue durée – 2 mois minimum) purification interdite
Non A, non B, non C	D	Interdit	Interdite

Tableau 1 : Critères microbiologiques / Réglementation française
Décret du 28/04/1994 Arrêté 21/05/1999

Le classement de la salubrité des zones de production se fait, par groupe de coquillages, disposition qui traduit leur faculté différentielle de se contaminer et de se purifier et sur la base du dénombrement, dans les coquillages, des *Escherichia coli* indicateurs d'une contamination fécale, mais aussi des teneurs en certains contaminants chimiques présentant un risque sanitaire. Pour les coquillages de zone C, seul un reparcage de 2 mois minimum est autorisé pour décontaminer les coquillages.

Pour traiter les coquillages non conformes à la réglementation, des équipements de purification ont été développés dans les pays producteurs (France, Australie, USA, Italie, Espagne et Grande-Bretagne). Selon les systèmes, les temps de purification varient de deux à plusieurs jours. La majorité des Etats ont opté pour 48 heures, temps semble-t-il suffisant pour limiter le nombre de bactéries, le but de la purification étant d'obtenir des produits conformes à la norme (< 230 *E. coli* /100 g). Les systèmes de purification peuvent être plus ou moins complexes allant du simple bassin où l'eau est changée à pleine mer (bassin submersible, BS) pratique prohibée en France, à des bassins insubmersibles où l'eau est aérée (BIA). Dans ces derniers, l'eau peut être traitée avant recyclage en passant par un ou plusieurs équipements : filtre à sable, UV, ozoneur...

La purification, lorsqu'elle est réalisée correctement, semble s'avérer efficace vis à vis du risque bactérien, preuve en est la baisse de salmonelloses ou typhoïdes ces quinze dernières années en Europe. Par contre, pour les virus entériques, cette efficacité semble assez réduite. Ces dernières années, des coquillages répondant aux normes bactériennes ont été à l'origine de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) sévères (hépatite A) ou bénignes (gastro-entérites virales) (Miossec et al, 2000). Des travaux réalisés à l'étranger sur des volontaires (Grohmann *et al.*, 1981) et sur des épisodes diarrhéiques (Gill *et al.*, 1983, Richards, 1985) montrent que des coquillages passés en purification peuvent être à l'origine de gastro-entérites virales. Le développement de techniques moléculaires a permis de mettre en évidence les virus comme responsables d'une grande partie des épisodes épidémiques liés à la consommation des coquillages (Le Guyader *et al.*, 2000).

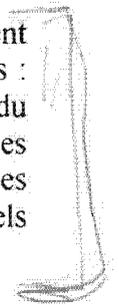
Les études concernant l'efficacité de la purification sur les virus sont récentes et en nombre limité. Elles ont été réalisées principalement à l'étranger. La majorité des résultats concerne des expériences faites en laboratoire sur des coquillages artificiellement contaminés. Ces résultats présentés ci-après proviennent d'une revue des principaux textes publiés, et en particulier des documents suivants :

- Informations sur les procédés de purifications et HACCP : Jackson and Ogburn, (Project N° 96/355), Richards G. (1988), NSSP Manual (1995), Bird P. (1994).
- Données sur la physiologie de l'huître et la purification virale : Metcalf TG *et al.* (1995, 1978), D. Lees (2000).

De plus les conférences internationales sur "Molluscan Shellfish Safety" ont permis de recueillir aussi d'importantes informations (Rennes, 6-8 April 1992 ; the Philippines, 17-21 Nov. 1997 ; Southampton, USA, June 19-23, 2000).

A partir de cette revue trois principales observations sont à retenir :

1. La purification est un processus complexe et chaque espèce répond différemment en fonction des combinaisons des différents facteurs associés aux procédés : turbidité, température, position des paniers, architecture des bassins... Ceci peut expliquer en grande partie certains résultats contradictoires. Le tableau 2 résume un certain nombre de ces expériences et de leurs conditions opératoires.
2. La plupart du temps, les expériences sur les virus et les bactériophages sont réalisées avec des coquillages artificiellement contaminés et en laboratoire. Par ailleurs, il y a très peu de travaux réalisés sur les calicivirus, principal virus responsable des TIACs liées à la consommation de coquillages, ce virus n'étant pas cultivable et les techniques de biologie moléculaire récentes ne donnant que des résultats qualitatifs. Cependant les résultats des expériences utilisant des contaminations artificielles montrent que les virus sont plus résistants que les bactéries aux traitements classiques et sont capables de persister très longtemps dans l'eau et les coquillages (Doré *et al.*, 1998, 200, Schwab *et al.*, 1998). Dans ce type d'expériences, cependant, les concentrations virales sont nettement plus élevées que dans des coquillages naturellement contaminés et, de ce fait, les résultats peuvent être à l'origine d'interprétations erronées sur la persistance des virus dans les coquillages soumis à purification.
3. L'évaluation de l'efficacité de la purification virale de coquillages naturellement contaminés n'a été réalisée qu'en une ou deux occasions dans des bassins professionnels : il s'agit essentiellement de travaux menés par le Laboratoire Européen de référence, du MAAF (Weimouth, UK) : Doré *et al.*, 2000 ; Lees, 2000). Cependant les TIACs observées en Europe ces dernières années, avec des coquillages répondants aux exigences européennes en matière de salubrité, démontrent clairement que les systèmes traditionnels de purification peuvent s'avérer inopérants vis-à-vis du risque viral.



1.2. Paramètres impliqués dans la purification

La contamination

Hoff et Becker (1969), ont montré que les huîtres accumulaient plus facilement les virus associés à des cellules ou à des débris que les virus nus (1.5 log de différence) et les élimineraient moins rapidement : il faudrait plus de 96 h pour passer d'une contamination de 104 virus/g à des doses non détectables (en culture cellulaire). La figure ci-dessous montre un schéma de l'appareil digestif d'un bivalve marin.

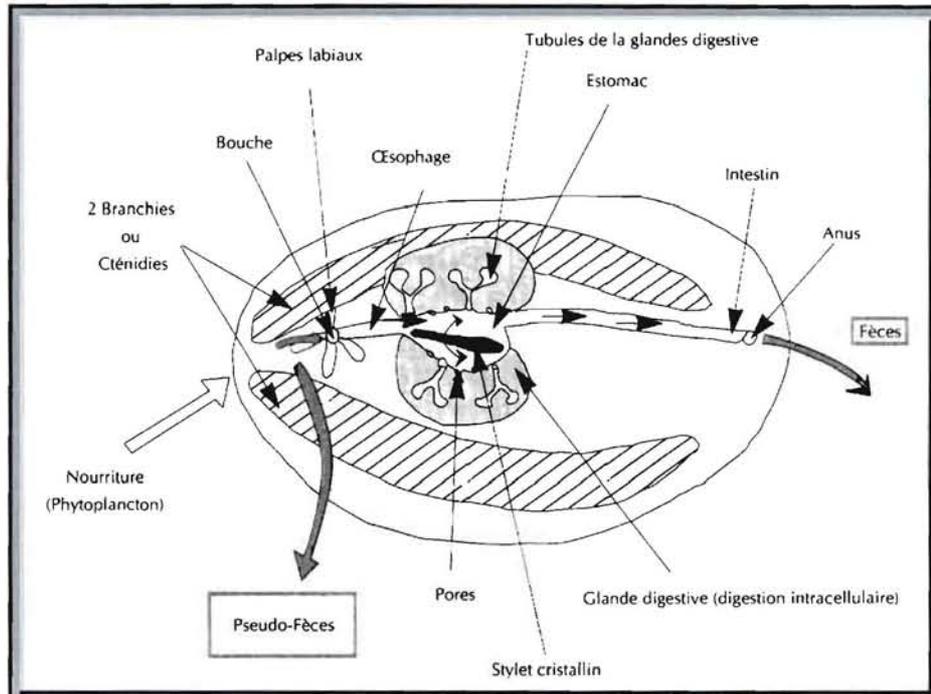


Figure 1 : Schéma de l'appareil digestif des bivalves marins (d'après J. Daguzan, 1992).

La séquestration

Les huîtres peuvent concentrer 60 fois des poliovirus présents dans l'eau environnante (Mitchell, 1966). Par ailleurs, Di Girolamo *et al.* (1975), ont montré que les virus s'accumulent préférentiellement dans les tissus digestifs (71 %). La figure 2 montre le schéma détaillé de la circulation des particules alimentaires et de leur digestion et les possibilités de séquestration des virus au niveau des tubules de la glande digestive.

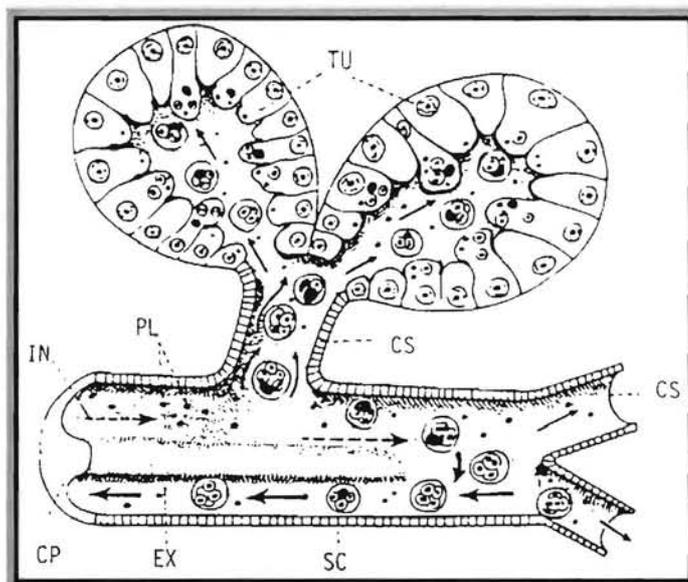


Figure 2 : Schéma détaillé de la circulation des particules alimentaires et de leur digestion au niveau des tubules de la glande digestive des bivalves (Daguzan, 1992). CP : conduit principal . CS : conduit secondaire ; EX : portion inhalante ; PL : particules alimentaires ; SC : sphères d'excrétion ; TU : tubules.

Cependant, Hoof *et al.* (1966), sur des huîtres artificiellement contaminées en phages (10^6 /ml) observent la même concentration à l'intérieur des huîtres que dans l'eau : ceci peut être lié aux conditions expérimentales de contamination (durée, huîtres analysées immédiatement après leur séjour en eau contaminée...). Par ailleurs, il semble que les virus soient plus facilement concentrés dans les huîtres s'ils sont associés à des particules ou à des fèces (Meinhold et Sobsey, 1982). Scotti *et al.* (1983), utilisant pour ses expériences un virus d'insecte marqué au P32, a étudié sa distribution dans les organes. Ils ont observé qu'une quantité importante de virus était fixée sur la coquille des huîtres ou sur les parois des bassins d'essais. Par ailleurs ils ont testé les huîtres individuellement et noté de grandes différences de l'une à l'autre après purification : dans certaines jusqu'à 2 log de réduction ont été observés, alors que pour d'autres aucune réduction de la charge virale n'était notée. Ce dernier point est important à retenir lors de l'interprétation de résultats d'expériences.

1.3. Efficacité de la purification

1.3.1. Rôle de certains paramètres sur l'efficacité du relargage

D. Lees (2000), dans une revue, énumère les principaux paramètres jouant un rôle important sur la purification parmi lesquels la *température*. Ce paramètre est également évoqué par Power and Collins, 1990 a, b, Jackus *et al.*, 1994, Doré *et al.*, 1998. L'activité physiologique normale de l'huître a lieu entre 10 et 20 °C (Metcalf, 1979). La température commande la physiologie du coquillage qui joue un rôle important. En effet indirectement, la teneur en oxygène, la présence de nourriture, la salinité interviennent sur l'état physiologique et donc sur la vitesse de pompage, le transit intestinal et l'émission de fèces par l'animal. Cependant d'autres expériences portant sur ce paramètre ont donné des résultats contradictoires. Ainsi Sobsey *et coll.* ont comparé l'efficacité de la purification du virus polio 1 et du HAV, à 12 °C, 17 °C et 23 °C. Les huîtres étaient artificiellement contaminées dans un bassin contenant 10^4 particules par ml. Elles ont été mises ensuite en purification dans 8 l d'eau de mer artificielle aérée. Au bout de trois jours 98 % du poliovirus était éliminé et ceci indépendamment de la température. Lors de ces mêmes expériences, au bout de 5 jours, le virus de l'hépatite A a été peu ou pas éliminé. Ce dernier résultat montre par ailleurs que la résistance à la purification peut-être aussi *fonction du virus étudié*.

La purification des huîtres est plus efficace lorsque le *taux d'oxygène dissous* est important. Ainsi Haven *et al.* (1978), recommande 2 mg/ml pendant toute la durée de la purification. La physiologie de l'huître est également modifiée par les conditions de *salinité*, une variation de 10 % suffit à réduire la filtration. Ce *taux de filtration* est extrêmement important sur la purification. Il peut varier d'une huître à l'autre, comme l'a montré Akin (1966) : les concentrations en poliovirus après purification, étaient selon les individus de 190 à 4 200 PFU (pour une seconde expérience de 97 à 10 200 PFU).

Par contre la *turbidité* ne semble pas jouer de rôle dans la vitesse d'élimination des virus (Hamblet *et al.*, 1969). *L'alimentation en algues* pour Sobsey, (1997) n'aurait également aucun effet sur la purification.

1.3.2. Etudes en laboratoire sur l'efficacité virale de la purification

La purification s'avère bien évidemment inefficace sur les huîtres dormantes. L'augmentation de température accélère la physiologie de l'huître qui se nourrit plus et donc se purifie plus vite (Meinhold et Sobsey, 1982). Si l'on se réfère aux expériences de ces auteurs, à 28 °C après une purification de 3 jours le poliovirus n'était plus détecté, alors qu'il était encore présent après 5 jours à 6 °C (cependant dans cette expérience la concentration initiale des virus n'a pas été indiquée). Doré *et al.*, 1998 indiquent par ailleurs que, si 2-3 jours dans certains cas permettent l'élimination des virus, 7 jours et plus sont nécessaires pour des huîtres très contaminées, même à température élevée. Dans les phénomènes de relargage, **température et concentration virale initiale** sont donc déterminantes (Cook et Ellender, 1986).

La **circulation de l'eau** doit également être un facteur déterminant puisque les travaux de Di Girolamo *et al.* (1975), montrent qu'en circuit fermé, la charge virale diminue de 99 % en 72 h. La circulation de l'eau accroît indirectement les teneurs en oxygène dissous nécessaires à un bon état physiologique de l'animal.

Ces résultats sont pondérés par ceux obtenus par Schwab (1998). Celui-ci a contaminé artificiellement des huîtres par du virus Norwalk-like (NLV) adsorbé sur des fèces stériles. Les huîtres étaient alimentées pendant la phase de contamination, avec des algues en paillettes (Kyorin co, Himeji, Japan). Les expériences de purification ont été réalisées dans un flux d'eau circulant, dans une eau de mer artificielle à 18 g/l de sel et à une température de 20-24 °C. Après 48 h, les auteurs ont observé une diminution très faible du nombre de virus (7 % seulement de la charge virale mesurée en unité PCR).

1.3.3. Etudes en bassins professionnels ou en vraie grandeur

Les paramètres précités jouent un rôle important sur l'efficacité d'un système de taille professionnelle. Canzonier (1982) précise que le **débit du flux circulant** / heure doit être dix fois supérieur au volume d'huîtres traitées. De plus, le niveau d'**oxygène dissous** doit être supérieur à 50 % de la valeur de saturation. L'ouverture du coquillage est dû au relâchement du muscle adducteur et l'empilement des coquillages peut empêcher cette ouverture passive. Cet empilement ne doit pas excéder 15 cm de haut.

- Etudes réalisées avec des huîtres artificiellement contaminées

Boher et Schwartzbrod (1993), ont étudié la purification des huîtres artificiellement contaminées par le rotavirus SA11 préalablement adsorbé sur des algues unicellulaires (*Dunaliella primolecta*). La purification avait lieu dans un bassin en circuit fermé équipé d'UV. Pour des contaminations faibles (< 30 virus/g), en 72 h la purification était complète (100 % des analyses en dessous de la limite de détection). Par contre, pour des doses plus importantes la purification n'a été effective que dans 80 % des échantillons. Scotti, quant à lui, dans une autre étude menée sur une station de purification de taille professionnelle n'a observé aucune réduction de la charge virale.

- Etudes réalisées avec des huîtres naturellement contaminées

Durgin *et al.* (1981), ont réalisé des études en grandeur nature (bassin de 1 324 l, circuit fermé et UV), la purification était effective en 24 h. Ce que confirmait leur approche en laboratoire dans des bassins de 60 l avec de l'eau de mer en circulation traitée aux UV et passée sur filtre à charbon : en 48 h la concentration en virus passait de 300 PFU/huître à des niveaux non détectables.

Doré et Lees (1995) ont testé la purification d'huîtres provenant de zones contaminées (prélevées en zone C, les gisements se trouvant à environ 800 m d'un rejet de station d'épuration), le temps de séjour des huîtres dans cette zone avait été de 1 à 3 semaines (coquillages peu contaminés) à plus de 6 mois (fortement contaminés). Les expérimentations étaient réalisées en bassin de 150 l en circuit fermé, la salinité de l'eau de mer était de 30-33 g/l. L'eau était stérilisée avec des UV, l'oxygène dissous étant maintenu à des valeurs supérieures à 60 % de saturation. Les huîtres étaient disposées en monocouche. Une faible décroissance a été observée au bout de soixante heures (environ un log).

Dans des huîtres commercialisées, ces même auteurs (Doré et Lees, 1998) ont recherché le bactériophage F+ARN spécifique et le NLV. Ce dernier a été mis en évidence par RT-PCR. L'échantillon moyen était de 6 huîtres. Le suivi mensuel indique que, pendant l'hiver, tous les échantillons étaient positifs en phages (30/30) et seulement 23 % (6/26) pendant l'été. La contamination par le virus NVL a suivi la même tendance : 63 % des échantillons étaient positifs en hiver et seulement 6 % pendant l'été. Ces résultats semblent indiquer que la contamination saisonnière est associée au pic hivernal de gastro-entérites d'origine virale. Ces auteurs ont ensuite réalisé une étude de purification dans les conditions réglementaires et dans deux conditions de températures 9 °C et 18 °C. Les résultats sur les bactériophages montrent que l'augmentation de la température améliore l'efficacité de la purification : 98 % sont éliminés à 18 °C en 48 h, comparé à 40 % à 9 °C.

En conclusion, très peu d'études ont été réalisées sur la purification de coquillages naturellement contaminés par des virus humains. Ceci est principalement dû au fait que souvent les virus impliqués dans les épidémies ne sont pas cultivables (calicivirus, virus de Norwalk ou NLV). Les techniques de détection moléculaire sont récentes et non encore quantitatives (RT-PCR). Cependant, même si les études en laboratoire présentent des biais, les principaux facteurs qui se dégagent sont liés à la physiologie du coquillage qui doit être activée pour avoir une épuration efficace. Ainsi la température et les conditions de rétention en bassin doivent être optimisées (oxygénation, salinité, peut-être alimentation). Certains facteurs doivent être pris en compte car ils semblent avoir un poids important sur l'efficacité de la purification vis à vis des virus. Il s'agit :

- du degré de contamination et l'antériorité de la contamination : plus le niveau de contamination est élevé et ancien et plus l'élimination sera difficile.
- ceci est peut-être dû à la spécificité des virus : leur petite taille, leur adhésion à des particules organiques ou leur séquestration dans des niches intestinales du coquillage (Metcalf, 1978), de la présence aléatoire des virus dans l'environnement qui n'est pas pris en compte par la concentration en *E. coli*. En effet cette dernière est liée à des rejets fécaux avec ou sans pathologie alors que la contamination en virus entériques est liée à des épidémies dans la population (Le Guyader *et al.*, 2000, Miossec *et al.*, 2000).

La présence de virus infectieux n'est pas signalée par un "indicateur" tenant compte d'une part du caractère aléatoire de cette contamination (déversement pendant des épidémies dans la population, lorsque les apports urbains ne sont pas maîtrisés) et d'autre part, de sa spécificité (survie des virus dans ces environnements plus longue qu' *E. coli*: plusieurs semaines ou dizaine de semaines). Si l'on considère que les coquillages issus des zones B, doivent être passés en purification, ces facteurs (contamination élevée et rémanente) devraient être évoqués dans la pratique de purification, pour tenir compte du fait qu'il est plus facile de décontaminer des huîtres ayant subi une pollution courte et sporadique (issues d'une zone B présentant des valeurs proches de 1 000 *E. coli*/100 g) que celles issues d'une zone d'élevage plus fortement contaminée (issues de zone B présentant des valeurs limitrophes au seuil de 4600 *E. coli*/100 g) : d'où l'intérêt, lors des opérations ou expériences de purification, de notifier ces paramètres.

Contaminant	system	water treatment	Nat. (N) or artif. (A) contaminated	temp. (°C)	salinity (g/l)	Flow rate (l/h)	depuration time	detection	after	before	reference
Poliovirus	FT	UV	A	nd.	nd	15 m ³ /h	48 h	culture	5 pfu/g	10 ⁴ pfu/g	Hoff (1969)
poliovirus	FT	UV	A	nd	nd	67 ml/min/huître	96 h	culture	ND	10 ⁴ pfu/g	Hoff (1969)
Poliovirus	statique	FILT	A	nd	nd	0	120 h	culture	10 ³ pfu/g	10 ⁴ pfu/g	Di Girolamo (1975)
Poliovirus	FT	FILT	A	nd	nd	0.35 m ³ /h	72	culture	2.10 ² pfu/g	3,4.10 ³ pfu/g	Di Girolamo (1975)
poliovirus	FT	UV	A	21-25	16-20	33 ml/min/huître	72	culture	ND	5.10 ³ pfu/g	Mitchell (1966)
poliovirus	FT	UV	A	19-23	8-23	33 ml/min/huître	72	culture	3 pfu/g	5.10 ⁴ pfu/g	Mitchell (1966)
Cricket Paralysis virus	eau circulation fermée	UV + FILT	A			2.5 m ³ /h	96	P32	10 ³ pfu/g	10 ⁴ pfu/g	Scotti (1983)
Bactériophage	eau circulation fermée	UV	N	9 °C hiver, 18 °C été			48 h	culture	100 % en hiver 23 % en été 10000, 9 °C < 30, 18 °C	34500 2775	Doré (1998)
NLV	eau circulation fermée	UV	N	9 °C, 18 °C			48 h	RT-PCR	63 % en hiver 6 % en été		Doré (1998)
Rotavirus SA11	eau circulation fermée	UV	A	?			72 h	culture	0 pfu/g	275 pfu/g	Boher (1993)
bactériophage	eau circulation fermée	UV	N	12 °C	30-33	300 l/h	72 h	culture	20 %	100 %	Doré (1995)
Virus Norwalk like	FT		A	20-24 °C	18-19	12 ml/min/huître	48	RT-PCR	734 unités PCR	792 unités PCR	Schwab (1998)
bactériophage (moule)	eau circulation fermée	UV 30W	A	15-20 °C	27-30	15000l/h	52	culture	10 ³ pfu/g	10 ⁴ pfu/g	Power (1990)

Tableau 2 : Résultats d'expériences conduites en purification virale des coquillages (Huîtres). Légende : m³ (volume du bassin d'essais); méthode de détection : culture cellulaire ou Polymerase Chain Reaction PCR ; ND : non détecté ; Cricket paralysis virus (picomavirus des insectes).

1.4. HACCP¹ et conclusion

Notification des paramètres dans une démarche HACCP liée à la purification des coquillages : Un modèle est proposé par A Furfari *et al.* (1992). Les points clés en sont présentés ci-dessous (tableau 3).

Points critiques	Spécifications
<ol style="list-style-type: none"> 1. Coquillages (espèces) 2. Origine 3. Conditionnement 	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>Crassostrea gigas</i>, <i>Ostrea edulis</i> 2. lieu : France (bassin de...), Europe... 3. Camions nettoyés et sur le site de production
Purification	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Nombre et type de bassins 2. Dimensions 3. Paniers 4. Charge du bassin en paniers 5. Source de l'eau de mer 6. Paramètres 7. Prétraitement de l'eau de mer 8. Type de système Aération 9. Unité de traitement UV 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Bassin en béton...ou autre 2. L.x l.x h. m ; L.x l. x h. m ; 3. Plastique ou... ; 4. Maximum d'épaisseur d'huîtres dans chaque panier x paniers maximum, chargés sur x palettes en métal ; x couches maximum. 5. Estuaire, baie... 6. Salinité, température, teneur en O₂, <i>E. coli</i> (indélectable) Filtration UV 7. Recirculation ; vitesse minimale x l/s 8. Système ventury, dispersion sur x.m par un tuyau, x trous de x mm de diamètre. 9. UV tubes (x m) ; X l.s capacité avec des turbidités <20 NTU. <i>E. coli</i> indélectable dans l'effluent passé aux UV
Operationnel	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Nettoyage et désinfection du bassin 2. Nettoyage des palettes 3. Analyse microbiologique des huîtres Stockage des huîtres Lots d'huîtres 4. Cycles de purification et temps. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. carcher, produits chimiques 2. carcher, produits chimiques 3. Niveau du produit final 4. 48 h / 72 h
Planning de l'échantillonnage	Au début et au milieu de la purification

Tableau 3 : Notification des paramètres dans une démarche HACCP de purification (A. Furfari *et al.* 1992).

Pour Bird (1992) les points critiques sont également l'origine des lots, les conditions de purification pré-citées auxquelles il rajoute d'autres paramètres tels que : la charge du bassin en huîtres, l'élimination des fèces sous les palettes et aussi le contrôle des points de rejets des déchets solides et liquides issus du lavage des huîtres.

¹ HACCP : Hazard Analysis Critical Control Point, en français "Analyse des Risques, Points Critiques pour la maîtrise. Système qui définit, évalue et maîtrise les dangers qui menacent la salubrité des aliments (Codex Alimentarius- Annexe au CAC/RCP I-1969, Rév. 3, 1997).

2. Méthode de recherche des virus

2.1. Le bactériophage, indicateur viral

Généralités

De nombreuses publications récentes montrent qu'il n'y a pas de relation entre les indicateurs fécaux classiques (*E. coli*) et la présence de pathogènes (Lees and Doré, 1995 ; Le Guyader *et al.*, 1995 ; Lee *et al.*, 1997 ; Le Guyader *et al.*, 1998). En fait, les coliformes thermotolérants sont d'assez mauvais indicateurs de contamination virale et certains auteurs recommandent l'utilisation des bactériophages comme indicateurs de pollution virale. Ces derniers sont en effet proches des virus puisqu'ils ont besoin d'une cellule hôte pour se multiplier, ils ont une structure voisine des virus et résistent bien dans les environnements extérieurs (Maillard, 1996 ; Armon et Kott, 1996 ; Sobsey, 1997 ; Havelaar 1993).

Parmi les différents bactériophages, notre intérêt s'est porté sur **les bactériophages F-ARN spécifiques**. Ces phages appartiennent à la famille des *Leviviridae* à ARN simple brin. Ils infectent des bactéries telles que *E. coli* ou *Salmonella spp* par l'intermédiaire de pili sexuels de fertilité. Ce groupe est assez homogène. Il a une structure et une taille comparables aux entérovirus (20 à 27 nm).

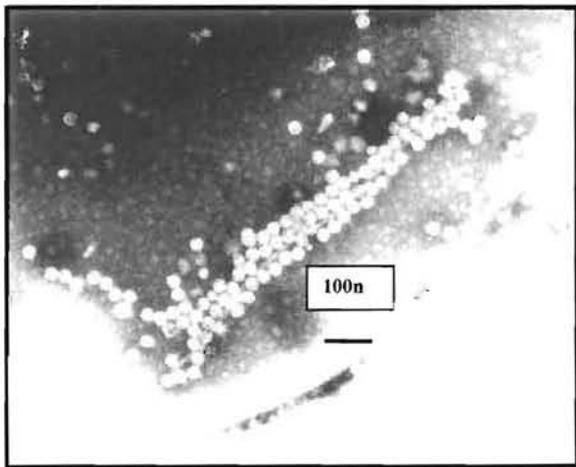


Photo 1 : phages fixés sur un pili de bactérie

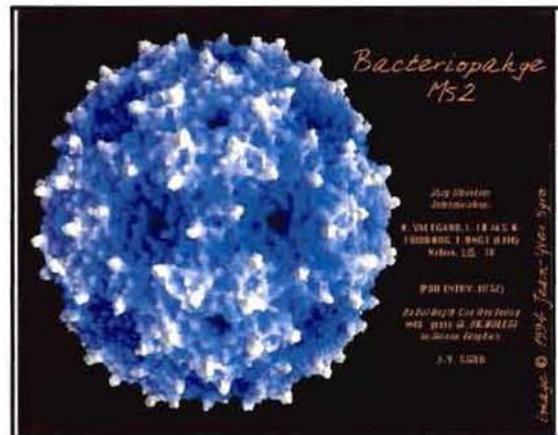


Photo 2 : bactériophage F-ARN spécifique ou MS2

Le phage modèle utilisé est le MS2 dont on peut voir une représentation ci-dessus.

Méthodes de mise en évidence des bactériophages

La méthode de détection est basée sur la norme internationale ISO 10705-1 (1995) concernant la détection et le dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques. Le principe est le suivant : il consiste à mélanger un volume connu d'échantillon avec une culture de la bactérie hôte, à incorporer l'ensemble à de la gélose semi-solide (maintenue en surfusion à 50 °C) puis à couler le mélange dans une boîte de pétri ; après une incubation de 18 h à 37 °C, chaque phage présent se développe aux dépens du tapis bactérien, ce qui se traduit par l'apparition de halos clairs correspondant aux plages de lyse.

La quantification est réalisée en comptant les plages de lyse et en les rapportant au poids d'échantillon analysé. Les résultats sont exprimés en Plage Formant Unité (PFU)/ 100 g de chair et de liquide intervalvaire ou en PFU/g de glande digestive suivant les tissus analysés. La limite de détection est de 300 PFU/100 g de chair et de 5 UFP/g de glande digestive.

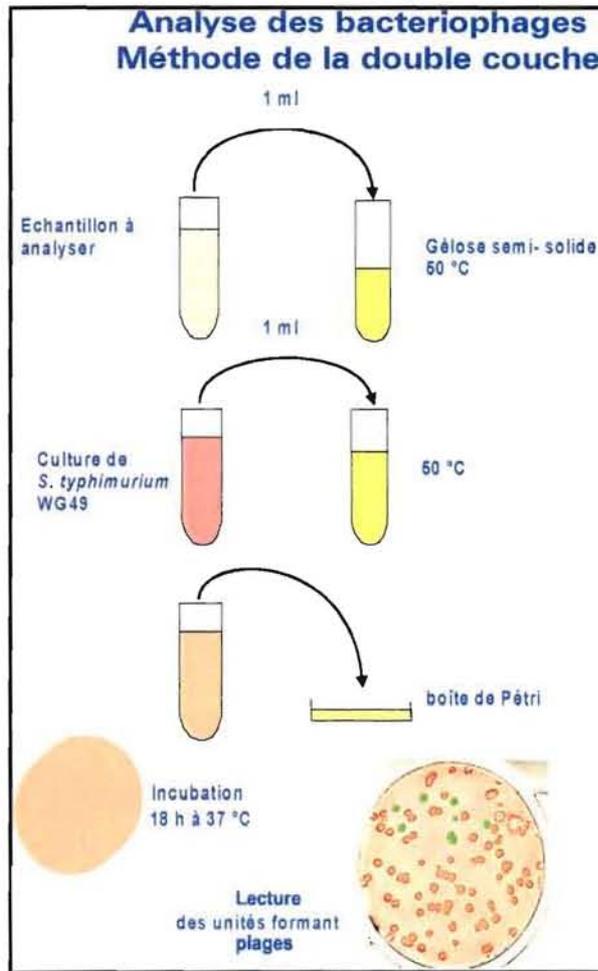


Figure 1 : Analyse des bactériophages : méthode de la double couche

La souche hôte utilisée pour cette méthode est *Salmonella* WG 49 résistante à l'acide nalidixique, ce qui permet de disposer d'un critère d'élimination de la flore bactérienne présente dans l'échantillon à analyser. Lors de cette analyse, nous obtenons tous les F+ spécifiques (ARN + ADN). Une analyse de l'échantillon dans les mêmes conditions mais en présence de RNase permet de sélectionner les phages F+ADN spécifiques et par déduction de n'avoir que les F+ARN .

Un contrôle de qualité de cette bactérie est effectué avant l'analyse. Par ailleurs un témoin constitué d'une solution de phages MS2 de titre connu permet de vérifier que la souche hôte est compétente pour le phage recherché.

Préparation des échantillons d'huîtres pour l'analyse

Les prélèvements sont acheminés au laboratoire dans des glacières. Ils sont traités le jour même ou congelés. Au laboratoire, les échantillons frais ou décongelés (une nuit à 4 °C) sont ouverts sous asepsie. Après pesée de la chair et du liquide intervalvaire, les huîtres sont disséquées et les glandes digestives soigneusement enlevées et pesées.

Un broyage des glandes digestives est effectué au Polytron pendant environ 30 sec en présence de 2 volumes d'eau peptonée. On vortexe pendant 30 sec avant de centrifuger à 2 500 g pendant 15 min. Le surnageant est maintenu à 4 °C avant analyse.

Sur le coquillage entier, le broyage des chairs et du liquide intervalvaire est réalisé dans un Waring Blender en présence de 2 vol d'eau peptonée, l'ensemble est vortexé pendant 30 sec avant d'effectuer une centrifugation à 2 500 g (15 minutes).

2.2. Recherche des Calicivirus (virus dits de "Norwalk") virus des gastro-entérites

Les gastro-entérites constituent un problème de santé publique à l'échelle mondiale. A l'heure actuelle, les agents responsables de gastro-entérites chez l'adulte sont essentiellement les **calicivirus**.

Ces virus comprennent :

- les virus Norwalk-like (autrefois appelé agent de Norwalk, ou petits virus ronds structurés)
- les virus Sapporo-like.

Cette famille est très diverse car ces virus présentent une grande variabilité génétique. Par exemple, pour les Norwalk-like virus (VNL), on distingue au moins deux principaux groupes (ou génogroupes).

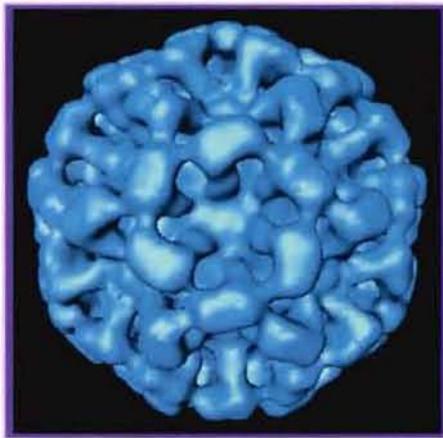


Photo 3 : représentation du virus de Norwalk

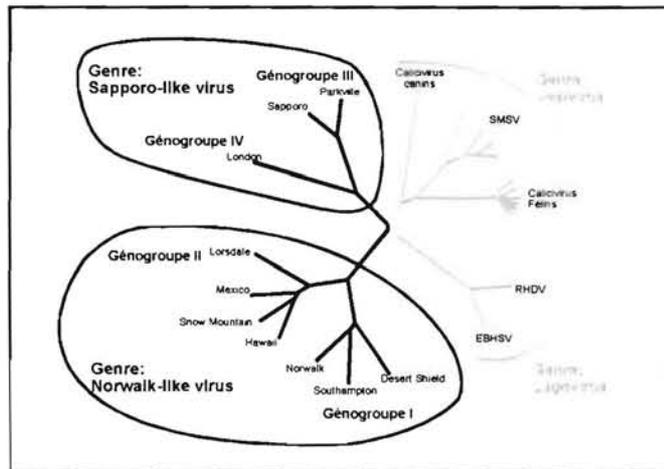


Figure 2 : Arbre simple représentant la famille des calicivirus

Un peu d'histoire....

En 1968, une épidémie de gastro-entérites se déclare dans une école de la ville de Norwalk (Ohio, USA). En 1972, le virus est caractérisé dans des selles de malades et il est capable de transmettre la maladie après ingestion par des volontaires. En 1981, le génome est séquencé et permet ainsi sa classification dans la famille des calicivirus.

Une structure simple et une résistance importante!

Comme la majorité des virus des gastro-entérites, les VNL sont des petits virus, nus, possédant un génome ARN simple brin.

Comme tous les virus, leur multiplication est intracellulaire : il ne peut donc y avoir aucune multiplication en dehors de cellules humaines. Cette spécificité pose d'ailleurs un problème pour les multiplier et les étudier car seul le volontaire humain permet de les amplifier... Ces virus ne sont transmissibles qu'à l'homme, pas à l'animal.

Comme tous les virus nus, ils sont très résistants et restent infectieux après :

- exposition à un pH acide de 2,7 pendant 3 heures à température ambiante,
- traitement par l'éther 20 % pendant 18 h à 4 °C,
- incubation à 60 °C pendant 30 minutes,
- traitement au chlore à des concentrations entre 3,75 et 6,25 mg/l (équivalent à 0,5 et 1 mg/l de chlore libre résiduel). Il faut des concentrations d'environ 10 mg/l pour les inactiver.

Cette résistance rend leur élimination très difficile (exemple de l'inefficacité de la chloration d'un rejet de station d'épuration) ; la meilleure précaution consiste à éviter la propagation du virus en renforçant les mesures d'hygiène (lavage des mains, protection de la bouche par des masques chez les personnes travaillant en agroalimentaire, lavage des blouses, des gants...).

Signes cliniques

La pathologie se caractérise par des nausées et/ou des vomissements parfois accompagnés de douleurs abdominales. Parfois des maux de tête et une augmentation de la température peuvent être observés. En général les symptômes régressent en quelques jours (1 à 3 j) mais le malade peut excréter du virus pendant quelques jours à quelques semaines après la fin des symptômes.

Des formes plus graves peuvent être observées chez les personnes immuno-déprimées ou chez les personnes âgées.

La période d'incubation varie de 24 à 48 h (en moyenne).

La dose infectieuse serait très faible... mais difficile à préciser car elle varie selon les souches, la personne infectée. Cependant quelques particules virales ont suffi pour déclencher la maladie chez des volontaires humains.

En raison de la diversité importante des souches mais aussi probablement en raison de facteurs immunitaires la ré-infection peut se produire fréquemment : on peut faire ainsi plusieurs gastro-entérites au cours du même hiver !

Mode de contamination

La transmission se fait essentiellement par voie féco-orale par de l'eau ou des aliments souillés. La transmission de personne à personne est également conséquente (importance du lavage des mains par exemple ...). Dans les collectivités, l'hygiène au niveau des poignées de porte, des interrupteurs est essentielle...

Parmi les aliments incriminés :

- l'eau de boisson : plusieurs épidémies ont été décrites au Canada, Finlande (parfois par le biais de glaçons mis dans la boisson),
- les fruits ou légumes (par exemple une épidémie liée à des framboises congelées contaminées vraisemblablement dans les champs),

- les coquillages : crus ou peu cuits (épidémies liées à la consommation d'huîtres frites aux USA),
- des aliments élaborés : sandwich (jambon contaminé par un cuisinier malade aux USA), gâteau en Angleterre (crème faite avec de l'eau du robinet contaminée).

En ce qui concerne les coquillages, les voies de contamination principales sont :

- Les apports sur le site d'élevage ou de pêche : rivières, rejets de station d'épuration, rejet individuels, rejet accidentels au niveau des réseaux de collecte d'eau usées,
- la contamination sur le site de pompage de l'eau de mer par les apports ci-dessus mais aussi éventuellement par les plaisanciers, personnels embarqués et/ou employés conchylicoles,
- les pratiques ostréicoles : contamination de coquillages sains issus de zones non contaminées (A) au cours du stockage dans des zones de dépôt, affinages, BS contaminés,
- l'hygiène de l'établissement : défaut dans le code de « Bonne Pratique » (HACCP) : contamination par du personnel malade (pendant la manipulation), contamination de personne à personne dans des lieux mal entretenus (lavabo, WC, zone de restauration...),
- la contamination dans les bassins par mélange de lots contaminés et non contaminés.

Le Diagnostic

Le diagnostic est fait le plus souvent par détection du virus dans les coquillages et les selles de malades par biologie moléculaire (RT-PCR). En raison de la diversité des souches la technique ELISA est difficilement utilisable sur les selles. Pour les mêmes raisons la sérologie au niveau du malade est également peu utilisée.

Les prélèvements de selles peuvent être effectués plusieurs jours après la fin des signes cliniques (jusqu'à 15 jours environ) et conservés au frais ou congelés. De même les coquillages incriminés dans une diarrhée peuvent être conservés au frais ou congelés pour analyse.

3. Etablissement conchylicole, SA Prat ar Coum : évaluation de l'existant

3. 1. Localisation

L'établissement conchylicole S.A Prat Ar Coum (commune de Lannilis) est installé sur la rive droite de l'estuaire de l'Aber Benoît depuis plus d'un siècle (figure 3). Il est dirigé par Monsieur Yvon Madec. Essentiellement axé sur la production d'huîtres plates jusqu'en 1970, cet établissement commercialise aujourd'hui tous les produits marins : crustacés, coquillages...

Au niveau conchylicole, la production d'huîtres *Ostrea edulis* (huître plate) et *Crassostrea gigas* (huître creuse) représente 70 % de la production de cet établissement. Les concessions ostréicoles Prat Ar Coum, sont localisées dans l'Aber Benoît, l'Aber Wrac'h, la Rade de Brest et la Baie de Morlaix, dans des zones classées sanitaires en A et B.

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

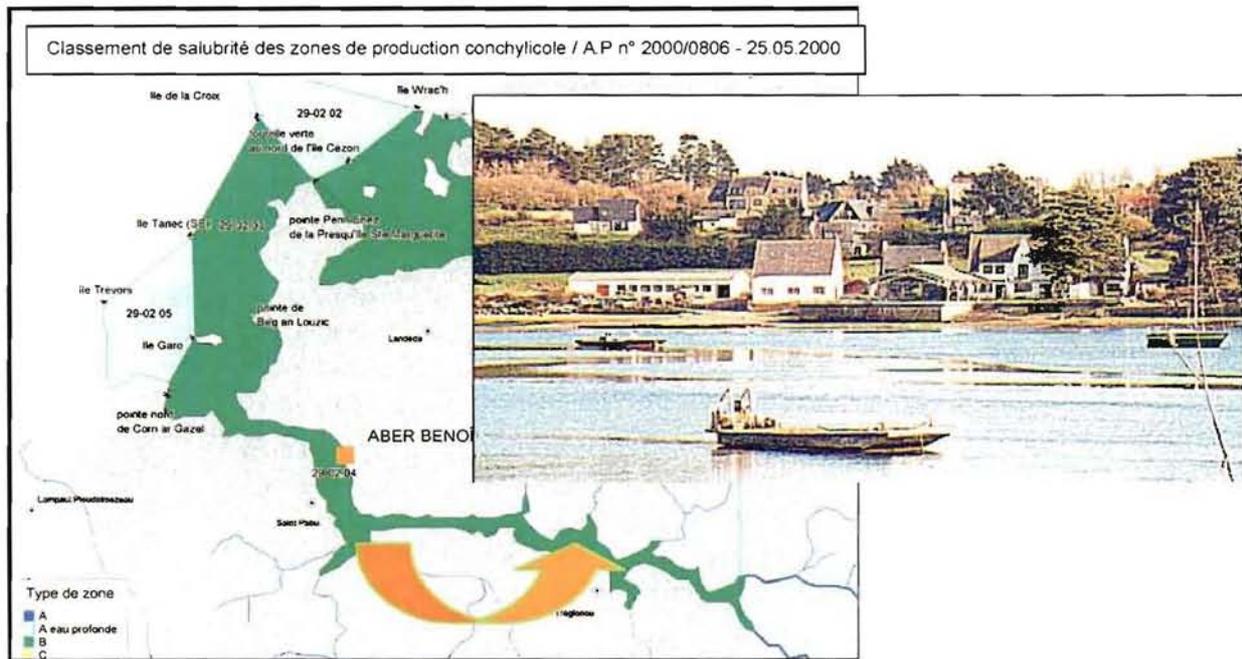


Figure 3 : Localisation des zones conchylicoles classées de l'Aber Benoît et de l'établissement S.A Prat Ar Coum à Lannilis.

Depuis 1991, cet établissement est agréé en tant qu'établissement de purification pour les coquillages.

3.2. Descriptif de la station de purification existante

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

- Un pompage direct dans l'Aber Benoît par une prise d'eau de 80 m³/h.
- Un filtre à silex, avec un seuil de filtration de l'ordre de 15/20 µm (fig.4).
- Un stérilisateur de l'eau aux U.V équipé de 6 générateurs de 40 Watts, fournissant une dose UV-C de 25.75 mJ/cm² minimum.
- Deux bassins de purification de 105 m³ chacun (L/ 12.5m x l/ 6.5m x P/ 1.3m) qui après l'alimentation directe peuvent fonctionner en circuit fermé par recyclage à 50 m³/h.
- Par bassin :
 - un système d'oxygénation de type ventury qui fonctionne 15 mn toutes les 45 mn.
 - une pompe de vidange de 50 m³/h, rejet direct dans l'Aber-Benoît.

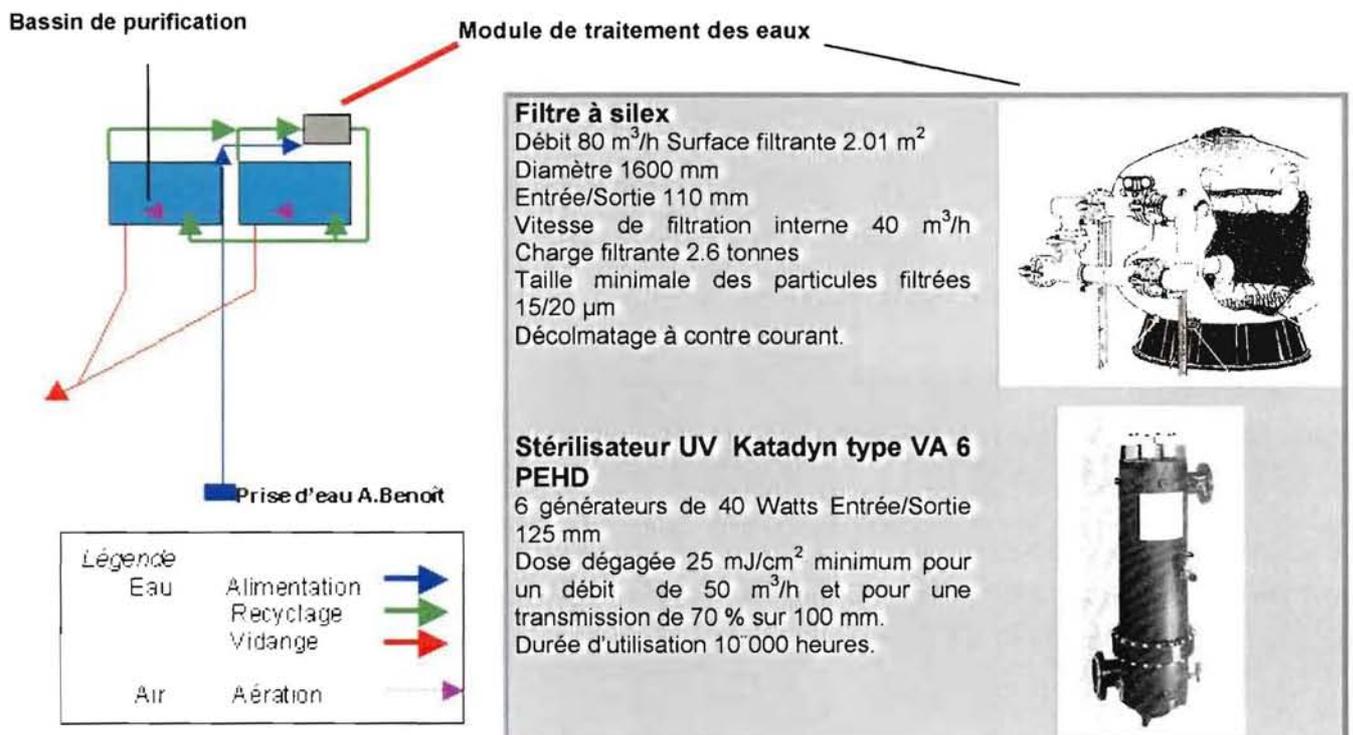


Figure 4 : schéma de l'installation Prat ar Coum

Outre l'aspect traitement aux U.V, l'installation a ses propres spécificités.

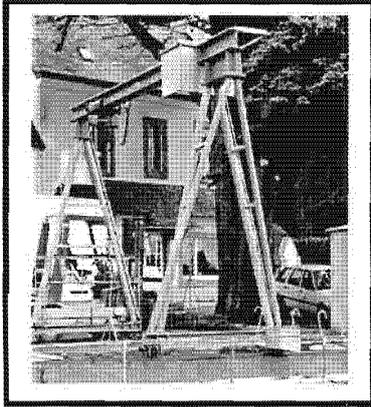


Figure 3

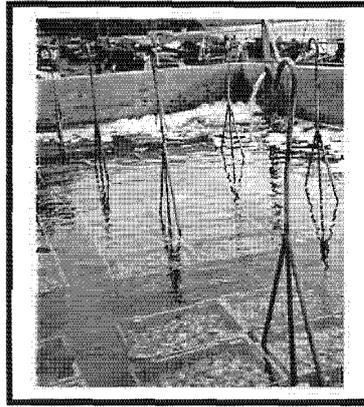


Figure 4

- a) Afin de diminuer les risques d'apports de contamination extérieure les bassins de purification sont équipés d'un portique avec palan électrique (figure 3).

Ce matériel permet avec des palettes métalliques adaptées (figure 4), la mise à l'eau ou la sortie des paniers de coquillages sans intervenir :

- sur le niveau d'eau des bassins.
- manuellement dans les bassins.

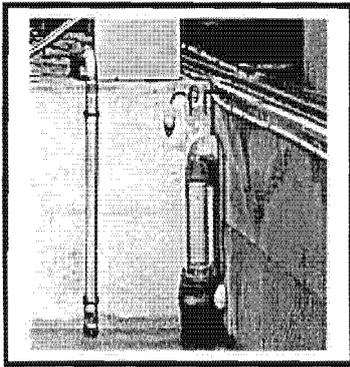


Figure 5

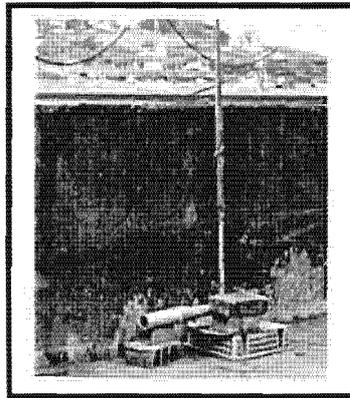


Figure 6

- b) Pour chaque bassin de purification, l'emplacement de l'arrivée d'eau en haut du bassin (Figure 4) et la pompe de reprise en fond de bassin et à l'extrémité opposée (Figure 5) donne un sens général de circulation de l'eau de haut en bas.

- c) Le système d'aération de type ventury est constitué d'une pompe fixe en fond de bassin entre l'arrivée et le point de reprise d'eau (Photo 7). L'air propulsé est dirigé vers l'arrivée d'eau.

- d) Les bassins de purification sont en extérieur. Leur capacité de traitement se situe entre 10 et 15 tonnes de coquillages suivant l'espèce concernée. Pour appréhender la circulation de l'eau à l'intérieur des bassins des essais de coloration avec la rhodamine ont été réalisés.

3.3. Notification des paramètres dans une démarche HACCP de purification.

La description du système de purification selon le tableau de Furfari (1992) est présentée dans le tableau 4.

POINTS CRITIQUES	SPECIFICATIONS
Coquillages	
1. Espèces	<i>Crassostrea gigas</i> (1) <i>Ostrea edulis</i> (2)(3)
2. Origine	Aber Benoît, Baie de Morlaix, Rade de Brest (1)(2) Aber Wrac'h (1) Grande Bretagne (3)
3. Conditionnement	Poches d'élevage plastifiées (1) Containers métalliques (huîtres en vrac) (1)(2) Sacs plastifiés (3)
4. Transport	Camion non réfrigéré (1)(2) Camion réfrigéré (3)
5. Nettoyage des huîtres	Lavage, triage huîtres sur site purification (1) (2) (3)
6. Nettoyage camions	Lavage camion sur site de purification (1)(2) Lavage camion hors site de purification (3)
Purification	
1. Nombre et type de bassins	2 bassins en béton – non couverts
2. Dimensions	2 (12.50m x 6.50m x 1.30m) = 2 (105.62m ³)
3. Panier	Plastique ajouré (0.60m x 0.50m x 0.16m)= (0.048 m ³) Maximum épaisseur huîtres 3 (suivant calibre)
4. Charge par bassin en paniers	18 palettes métalliques de 56 paniers = 1008 paniers (56 paniers répartis sur 8 colonnes et 7 lignes)
5. Masse d'huîtres par bassin	12 kg / panier = 12 096 kg / bassin
6. Source eau de mer	Estuaire de l'Aber Benoît
7. Paramètres	<i>E. coli</i> / Zone classée B, T °C / 8 –18, S°/oo 30-35 °/oo
8. Prétraitement de l'eau de mer	Filtration sur filtre à silex, taille particules 15/20 µm
9. Type de système	Recyclage de l'eau en circuit fermé, 50 m ³ /heure
10. Aération	Système venturi en fond de bassin, 15 mn/ heure
11. Système de stérilisation de l'eau	6 lampes aux ultra-violets (U.V) de 40 w. Dose dégagée de 25 mJ/cm ² pour un débit de 50 m ³ /h et une transmission de 70 % sur 100 mm. <i>E. coli</i> /100 ml indétectable dans l'eau épurée.
Opérationnel	
1. Nettoyage du bassin	Fréquence hebdomadaire, par eau estuarienne.
2. Désinfection du bassin	Fréquence trimestrielle, par eau estuarienne chlorée.
3. Nettoyage des paniers et palettes	?
4. Analyse microbiologique des huîtres	Absence suivi efficacité purification par lot d'huîtres Suivi au niveau du produit final (conditionnement)
5. Stockage des huîtres	Après calibrage et avant purification, dans zone estuarienne classée B. Après purification, direct conditionnement
6. Lots d'huîtres	Au cours de la purification : lots non identifiés, non isolés, multi-origines par bassin.
7. Temps du cycle de purification	24 heures minimum
8. Eaux de lavage - coquillages - bassins - locaux - camions	Rejets directs dans l'estuaire sans prétraitement.
Planning de l'échantillonnage	
1. Huîtres	Après purification (niveau produit final) Fréquence mensuelle
2. Eaux	Néant

Tableau 4 : Etablissement Prat Ar Coum - situation actuelle année 2001.

3.4. Calibration hydraulique

Il était déterminant de savoir si la position des paniers de coquillages dans le bassin était représentative du fonctionnement global du système. En effet les analyses étant longues et coûteuses on ne peut échantillonner tout un bassin lors des expérimentations. Dans un premier temps nous nous sommes intéressés au fonctionnement hydraulique du bassin en utilisant la rhodamine, colorant fluorescent neutre.

La tache fluorescente orange a été suivie visuellement (cf. photos), et des prélèvements ont été faits simultanément soit sur l'ensemble de la surface du bassin, soit à un point sur la verticale. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (Séquoia Turner, modèle 450).

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

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

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

Deux expériences ont été réalisées :

Bassin vide de coquillages : 300 ml de rhodamine ont été injectés (fluorescence 50 000 unités). Au bout de 5 minutes, la moitié du bassin a été atteinte par la nappe de colorant. La dilution est importante puisque, 15 min environ après l'injection, l'ensemble de l'eau du bassin est colorée. La fluorescence observée aussi bien en surface qu'au fond est faible et relativement bien homogène (minimum de fluorescence mesurée: 13 unités -maximum : 28 unités). Ces résultats indiquent une très forte et très rapide dilution de l'ensemble des eaux du bassin qui réagit de façon homogène.



Photo 7 : injection de la rhodamine
(T₀ + 30 sec.)



Photo 8 : dilution de la tache
(T₀ + 17 min.)

Bassin avec coquillages : une seconde expérience a été faite en présence de paniers remplis de coquilles d'huîtres. Ces dernières installées sur des palettes occupant environ 1/5 du bassin, ce qui correspond à une charge moyenne en coquillages. 600 ml de Rhodamine ont été injectés (photo 7).

L'expérience montre, dans les premières 5 minutes, un contournement par la tache fluorescente de l'obstacle constitué par les paniers. Au bout d'une demi-heure environ (photo 8) on constate, comme pour le bassin vide, une homogénéité de l'ensemble des eaux du bassin (minimum de fluorescence mesurée : 10 unités ; maximum 13 unités).

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

3.5. Vérification du piégeage des virus par le filtre à silex et de l'efficacité des UV.

Comme précisé précédemment, le recyclage des eaux passe par un système d'UV qui est précédé d'un filtre à silex. La station s'est équipée de ce filtre depuis une dizaine d'années. Il est entretenu hebdomadairement par inversion de la circulation de l'eau. Afin de vérifier s'il joue un rôle de piège à virus, nous avons procédé à la vidange de ce filtre. L'expérience a eu lieu après 8-10 jours de fonctionnement « professionnel » du filtre sans nettoyage.

3.5.1. Caractéristiques techniques du filtre

Filtre à silex en fibre de verre et polyester

Débit maximum de 80 m³/h

Dimensions Diamètre 1600 mm
Hauteur 1900 mm

Poids total 4 960 kg

Pression de service 2.5 kg/cm²

Hauteur de sable filtrant 1000 mm

Charge filtrante 2600 kg gravier 450 kg
sable 2150 kg

Surface filtrante 2.01 m²

Volume 2 760 litres

Taille minimale des particules filtrées 15/20 µm

Nettoyage par décolmatage à contre courant

Alarme d'encrassement par différentiel de pression
entrée/sortie (manomètres)

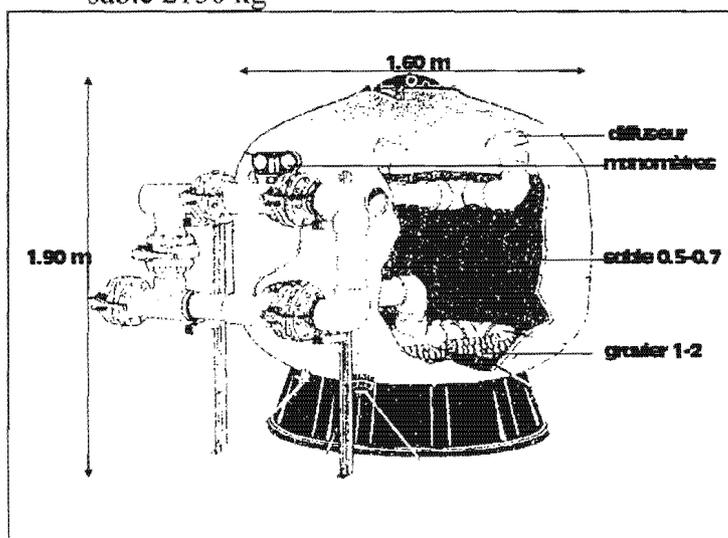


Figure 5 : Schéma du filtre à silex

3.5.2. Opération de lavage du 4 avril 2000

En utilisation normale dans les conditions professionnelles, le nettoyage hebdomadaire du filtre se fait par décolmatage à contre courant. C'est dans ce cadre que nous avons analysé la qualité sanitaire des eaux de lavage par tranche de 300 litres. Les teneurs en matières en suspensions et en bactériophages F+ARN spécifiques ainsi que les valeurs de pH, température et salinité, sont présentés dans le Tableau 5.

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

LD = Limite Détection AM = Absence Mesure

Tableau 5 : Paramètres physico-chimiques et résultats analytiques des eaux de lavage du filtre à silex de la station de purification S.A Prat Ar Coum, en situation professionnelle (04 avril 2000).

Les figures 5 et 6 présentent la relation significative entre les concentrations en MES et les contaminations en bactériophages (F-ARN spécifique) au cours de l'opération de lavage.

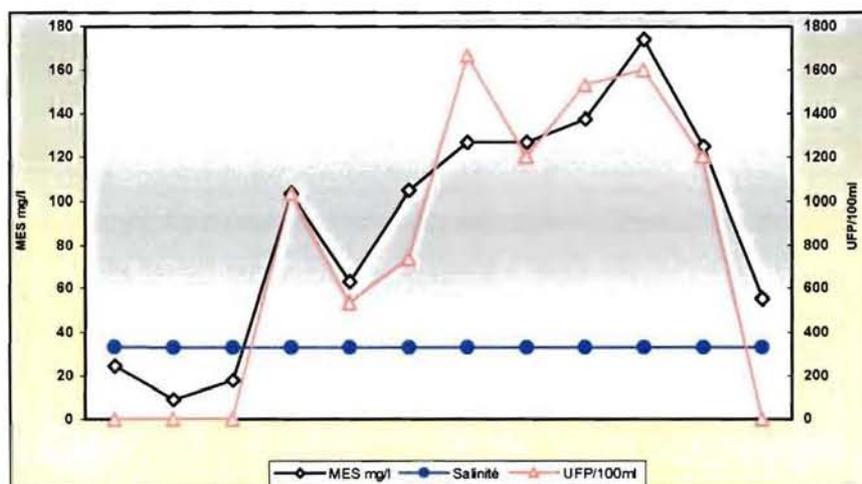


Figure 5 : Evolution des concentrations en matières en suspension (MES.mg/l) et les contaminations en bactériophages (UFP/100 ml) au cours de l'opération de lavage du filtre.

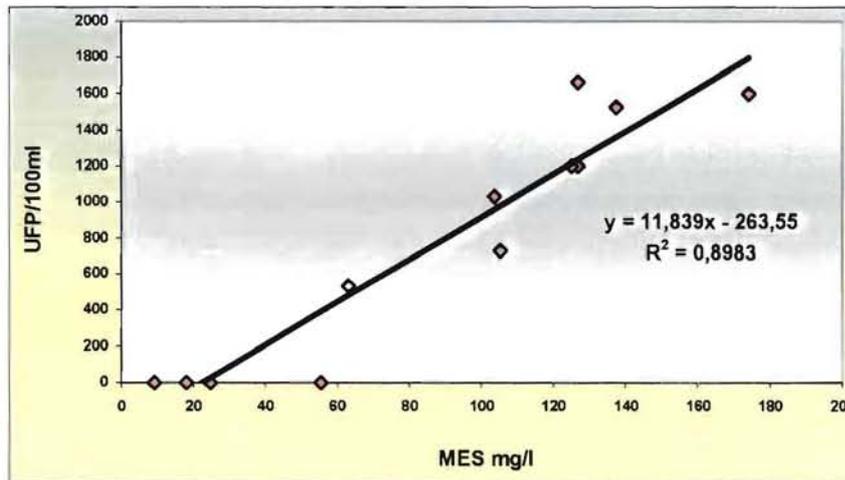


Figure 6 : Relation entre les concentrations en matières en suspension (MES.mg/l) et les contaminations en bactériophages (UFP/100 ml) au cours de l'opération de lavage du filtre à silex.

La vidange a été marquée par l'arrivée progressive d'une eau de plus en plus chargée en matière en suspension (figure 5). A mi-vidange les teneurs étaient de plus de 100 mg/l, les plus fortes valeurs obtenues étant de 180 mg/l. Il est intéressant de noter que la charge en bactériophages augmente en même temps que les teneurs en matières en suspension (maximum atteint : 1 600 UFP/100 ml).

Le coefficient de corrélation entre ces 2 paramètres est égal à 0.94778.

Le décollage maximum intervient après avoir évacué à contre courant de 2 100 litres à 3 000 litres. A terme, cette opération a conduit à récupérer 3.6 m³ d'eau de lavage : soit 320.745 g de matières en suspension pour une contamination en bactériophages équivalente à 2.85 10⁷.

La filtration a donc l'avantage de diminuer la turbidité de l'eau ce qui permet une meilleure efficacité du traitement par les UV. Ces matières en suspension, piègent les bactériophages et certainement d'autres microorganismes. Lorsque le filtre est nettoyé par contre courant (environ 1 fois par semaine en condition normale) ces microorganismes sont rejetés directement dans l'estuaire. On pourrait suggérer, afin de minimiser les risques de contamination du milieu naturel, de purifier ces eaux de lavage avant rejet.

3.5.3 Vérification de l'efficacité des UV sur les bactériophages.

Afin de vérifier l'efficacité des UV, l'eau du bassin a été contaminée artificiellement avec une souche de MS2. Une solution contenant 6 10¹¹ phages a été introduite dans le bassin. Le premier prélèvement (T0) a été effectué dans le bassin une heure après l'injection : en effet on a observé que ce temps était suffisant pour que le bassin soit homogène (cf. manip de rhodamine du 25 mai 2000). La concentration dans le bassin en bactériophages était alors de 2900 UFP/ml. Des prélèvements d'eau et des analyses ont été régulièrement faites dans l'eau du bassin (prélèvements réalisés au milieu en surface). Les résultats sont reportés ci-dessous (tableau 6 et fig. 7).

Temps (heures)	UFP/ml
0,00	2 900
0,92	2 570
1,92	2 350
3,20	1 010
3,92	514
4,92	579
5,80	290
23,00	36,5

Tableau 6 : évolution des concentrations en MS2 dans le bassin en fonction du temps (fonctionnement du système de filtration et des UV).

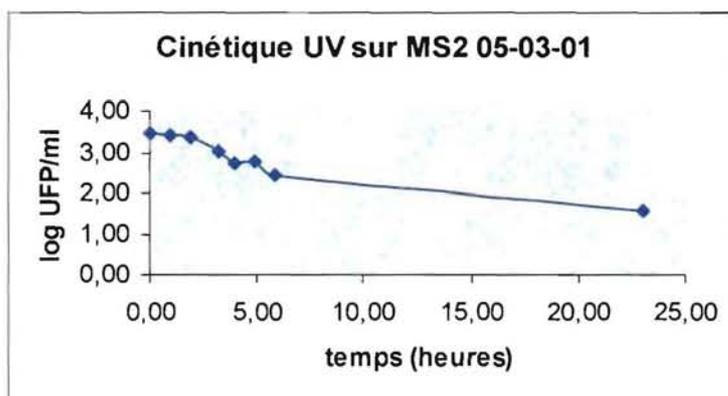


Figure 7 : Cinétique des concentrations en MS2 dans le bassin en fonction du temps (fonctionnement du système de filtration et des UV).

On constate en six heures environ, une diminution d'un facteur 10 des concentrations de phages dans le bassin. Au bout de 24 heures, la concentration a diminué d'un facteur 100. L'expérience a été réalisée après une utilisation professionnelle du bassin (une semaine avec des volumes de coquillages traités importants). Le fait que les virus persistent pendant 24 heures est peut-être dû à des adsorptions sur les parois ou les algues présentes dans le bassin. En tout état de cause les concentrations lors de cette expérience, étaient très largement supérieures à celles que l'on peut trouver dans un bassin en activité (certainement plus de 10 000 fois), une décroissance d'un facteur 100 doit être vraisemblablement suffisant dans des conditions de travail normal. Cette expérimentation sera reconduite pour vérifier ces résultats.

3.6. Calibration avec des coquillages artificiellement contaminés en bactériophages

Une vérification de l'efficacité et de l'uniformité de la purification a été réalisée en juin 2000. Pour cela, un millier d'huîtres (*Crassostreas gigas*, photo 9) a été contaminé par contact pendant 5 jours, avec une eau de mer chargée en bactériophages MS2 ($5 \cdot 10^4$ phages/ml).

Les coquillages ont été répartis en deux lots de huit paniers : le premier lot d'huîtres entreposé en surface près de l'arrivée d'eau de mer et le deuxième posé au fond près de la sortie de l'eau de mer du bassin. La température de l'eau de mer a varié de 16,4 °C (en début d'expérience) à 19 °C (fin d'expérimentation).

L'eau était épurée par passage sur un filtre à sable et UV. Des séries de prélèvements ont été effectuées à T0, T0.5, T1., etc. jusqu'à T8 jours pour suivre la décontamination.



Photo 9 : Huîtres entreposées dans les paniers.

Six répliquats ont été réalisés en surface et au fond. Les analyses ont été effectuées sur les glandes digestives des coquillages ainsi que sur la chair et le liquide restant. Au début de l'expérimentation (T0), la concentration en bactériophages des huîtres était environ de $5.3 \cdot 10^6$ UFP/100 g. La répartition dans les tissus était la suivante : $6.5 \cdot 10^5$ phages/g dans la glande digestive et $2.2 \cdot 10^4$ phage/g dans le reste du coquillage (liquide intervalvaire et chair sans la glande digestive). Cette dernière représente en moyenne 5 % du poids total de l'huître (moyenne de 3 répliquats de 6 huîtres).

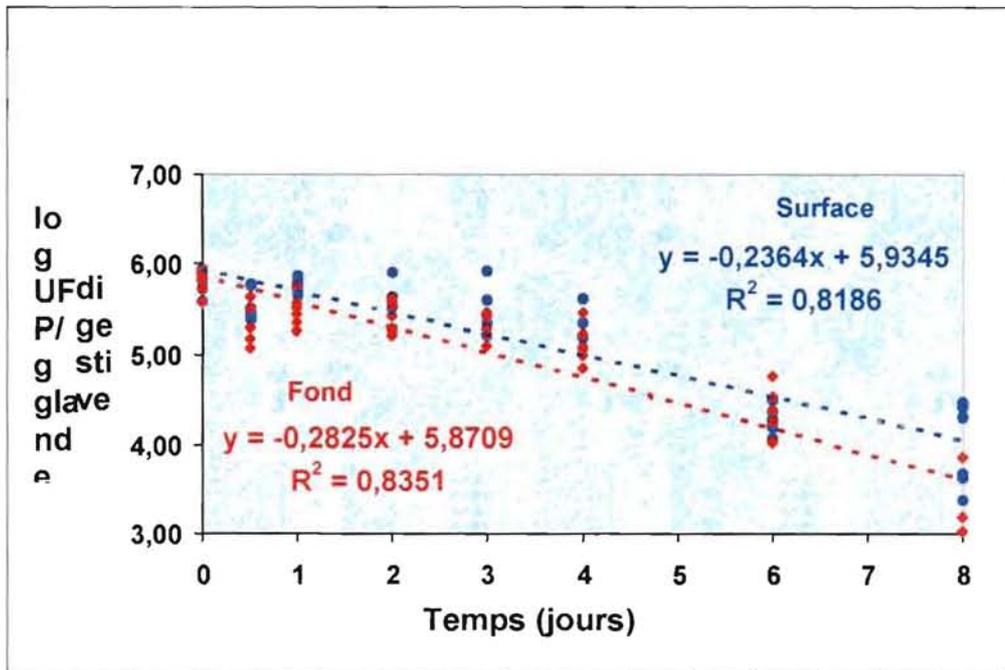


Figure 8 : Suivi de la purification d'huîtres artificiellement contaminées par le bactériophage MS2, Bassin professionnel Prat ar Coum, Juin 2000.

La figure 8 représente la cinétique de décontamination des coquillages. Les principaux résultats sont les suivants :

- Il n'y a pas d'écart significatif entre les paniers posés en surface et ceux mis au fond ; l'analyse montre une différence non significative entre les différents lots (écart-types entre 1/2 log et un log).
- Les résultats trouvés dans les glandes digestives sont supérieurs de 1 log à ceux trouvés dans la chair et le liquide intervalvaire. Ce phénomène de concentration à travers les glandes digestives des coquillages filtreurs a déjà été observé par Doré *et al.* (1995) et Power et Collins, 1990.
- En début d'expérimentation, environ 61 % des phages se trouvent concentrés dans 5 % de glande digestive des huîtres.
- La décontamination des huîtres, dans les conditions de cette expérience (température inférieure à 16 °C), se fait de manière assez lente (2 log en 8 jours).

3.7. Expérimentation sur échantillons naturels

Différents échantillons provenant de zones B ont été placés dans le système décrit ci-dessus. Des contrôles en *E. coli*, virus et F+ ARN spécifiques ont été réalisés avant et après passage dans le même bassin. Les temps de purification sont la plupart du temps de 48 heures, ce qui correspond aux pratiques professionnelles.

Avant purification : les échantillons étudiés présentaient une qualité très hétérogène. Pour la plupart, ils répondaient à la norme microbiologique ($< 230 E. coli$) sauf quelques échantillons issus d'un lot impliqué dans une TIAC (rivière du Jaudy, Auchan 2000). En ce qui concerne les teneurs en phage F-ARN spécifique, de nombreux échantillons étaient également en limite de détection (100 UFP/100 g chair) sauf les coquillages issus du Jaudy qui présentaient des valeurs assez élevées en phages. Enfin trois échantillons ont été trouvés positifs en virus Norwalk-like.

L'effet de la purification reste très aléatoire : dans un cas (Huîtres plates, Abert Benoit), les échantillons sont devenus négatifs pour les calicivirus, alors que les niveaux en bactériophages sont restés identiques. Dans le cas des huîtres de Crac'h (02/03/00) et du Jaudy (05/05/00) impliquées dans des TIACs, le virus n'a pas été détecté. La relation entre *E. coli*, les bactériophages et les calicivirus est inexistante.

On ne peut cependant tirer de conclusion sur ce système dans la mesure où nous ne disposons encore que de très peu de résultats. Par ailleurs l'interprétation doit tenir compte de différents éléments dont :

- Les différentes limites de détection qui varient selon le type d'analyse,
- L'hétérogénéité de la contamination d'un coquillage à l'autre qui est vraisemblablement importante dans des lots naturels.

Ces résultats mettent bien en évidence la difficulté de travailler avec des coquillages naturellement contaminés.

Origine	Type d'huître	Type de bassin	T °C	Prélevées	Mises en bassin	Retirées du bassin	Avant purification			Après Purification		
							<i>E. coli</i>	Phage*	Virus	<i>E. coli</i>	Phage*	Virus
Aber Benoit	HP	BIA	12,3	24/11/99	24/11/99	26/11/99	< 30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit	HP	PAC : UV + AE	/	24/11/99	24/11/99	26/11/99	< 30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit	HC	BIA	12,3	24/11/99	24/11/99	26/11/99	30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit	HC	PAC : UV + AE	11,9	24/11/99	24/11/99	26/11/99	30	< LD	-	< 30	< LD	-
Aber Benoit	HP	BIA	12,2	/	26/11/99	28/12/99	< 30	750	+	< 30	850	-
Aber Benoit	HP	PAC : UV + AE	11,9	/	26/11/99	28/11/99	< 30	750	+	30	1 150	-
Aber Benoit	HP	BIA	7,9/8,0	/	13/12/99	15/12/99	30	< LD	-	30	< LD	-
Aber Benoit	HP	PAC : UV + AE	7,9/9,3	/	13/12/99	15/12/00	30	< LD	-	< 30	392	-
Crac'h (Q)	HC	BIA ¹ (Ifremer)	11,5/11	07/03/00	10/03/00	13/03/00	< 30	< LD	+	< 30	< LD	+
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	12,7	05/04/00	07/04/00	10/04/00	Nd	281	-	Nd	206	+
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	14,7	18/04/00	18/04/00	20/04/00	1400	3 430	-	6000	2 255	-
Crac'h (H)	HC	PAC : UV + AE	14,7	18/04/00	18/04/00	20/04/00	Nd	< LD	-	< LD	< LD	-
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	12,4/16,4	02/05/00	05/05/00	07/05/00	130	292	-	Nd	< LD	-
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	16,4	02/05/00	05/05/00	08/05/00	130	292	-	Nd	< LD	-
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	14,8/16,9	17/05/00	18/05/00	20/05/00	170	< LD	-	< 30	< LD	-
Jaudy (P)	HC	PAC : UV + AE	16,3	17/05/00	18/05/00	21/05/00	170	< LD	-	< 30	< LD	-

* bactériophages F+ARN spécifique/100g ;** coliformes fécaux (Mac Conkey) /100 g : valeur à titre d'info (*E. coli* Malthus non fait) ; 1 : bac de 0,5 m³

Tableau 7 : Virus Safe Seafood - Essais de purification (48 heures)

4 . Elaboration d'un pilote de purification conchylicole

Pour le Programme Européen "Virus Safe Seafood" et dans un cadre partenarial avec les professionnels conchylicoles, certains locaux de l'établissement S.A. Prat ar Coum ont été mis à disposition afin d'élaborer un pilote purification (photo 10). Des bassins pré-existants (photo 11) ont été séparés par des cloisons du reste du local afin d'avoir un module de purification indépendant des conditions de travail de l'atelier. Les équipements de filtration, stérilisation, et de chauffage de l'eau sont installés dans un nouveau local annexe construit de façon contiguë aux bassins de purification (voir annexes 1 et 2).



Photo 10 : Localisation de l'implantation du pilote purification

A partir de deux viviers à bigorneaux situés dans un atelier de triage (figure 8), quatre bassins de purification ont été construits.

Après discussions entre les partenaires, le choix du pilote s'est porté, sur un système composé par quatre bassins autonomes où l'eau est recyclée après un passage sur filtre à silex et UV. La taille choisie est un compromis entre les exigences expérimentales et celles d'un système professionnel : en fait il s'agit, en taille d'une réduction au dixième du système existant à Prat ar Coum. Les possibilités de vitesse de pompage et de recyclage d'eau sont accrues (x 2 ou 3) par rapport aux bassins existants. Des systèmes de réchauffement ou de refroidissement des eaux sont envisagés. Par ailleurs, les quatre bassins sont totalement autonomes, permettant de travailler simultanément avec un même stock d'huîtres placé dans quatre conditions expérimentales différentes.

Correspondant au budget alloué en 2000, la construction, l'isolement et l'alimentation en eau et électricité des quatre bassins ont été réalisés. Par ailleurs, deux bassins ont été équipés de pompes d'alimentation et de refoulement. Un réchauffeur d'eau, filtre à silex et des UV équipent l'un des deux bassins. Le deuxième bassin, sans équipement sert de témoin expérimental de type bassin insubmersible aéré (BIA), puisqu'il utilise les conditions locales des professionnels (température de l'eau, circulation, aération). Les deux derniers bassins seront équipés en 2001.

L'intérêt de disposer d'un bassin témoin et de trois bassins de purification similaires est de mener en même temps, différents tests, sur une même période et dans des conditions identiques d'alimentation en eau et de température extérieure. Ces paramètres sont modulables dans les autres bassins, car ils peuvent, *a priori*, avoir un impact significatif sur la physiologie des coquillages et donc sur leur capacité épurative.

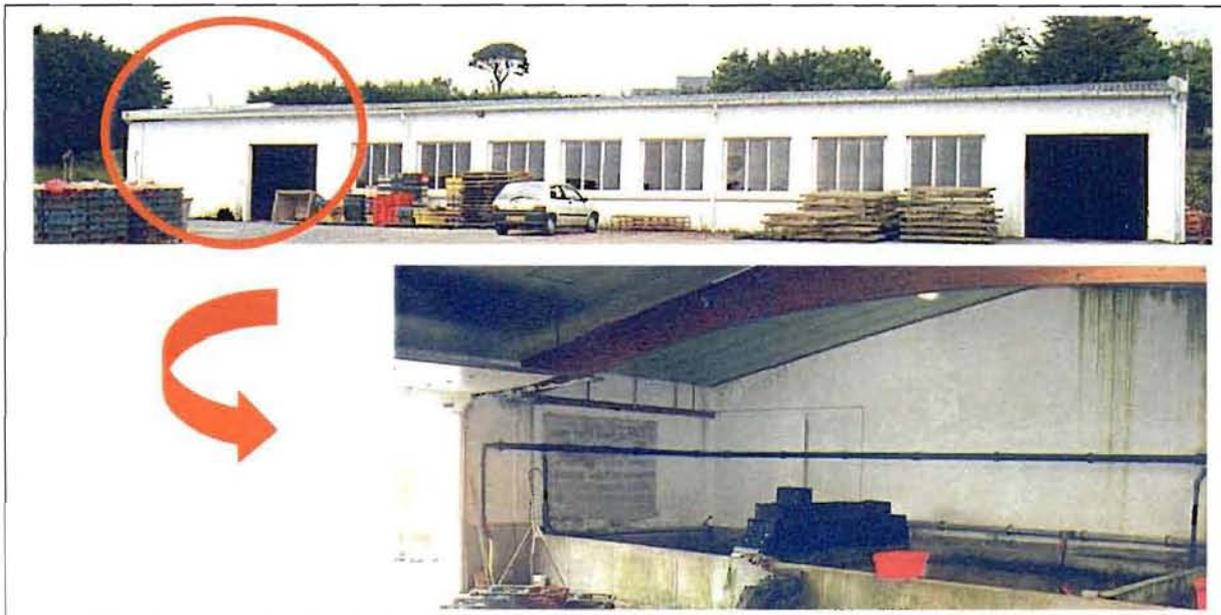


Photo 11 : Site à aménager : local de triage et viviers à bigorneaux (juin 2000)

4.1. Caractéristiques techniques

Descriptif des bassins

Les bassins sont ou seront en tous points identiques, chacun étant indépendant au niveau alimentation, recyclage et évacuation de l'eau.

Le remplissage des bassins se fait directement à partir de la prise d'eau de l'Aber-Benoît, sans filtration préalable.

- Dimensions : L (4.20 m); l (1.00 m à 2.22 m) ; P (0.82 m à 1.06 m).
- Superficie totale : 8.71 m²
- Volume total : 7.26 m³
- Volume utile : 5.82 m³
- Charge moyenne potentielle : 500 kg (huîtres creuses)

Circulation de l'eau dans les bassins (figure 9)

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

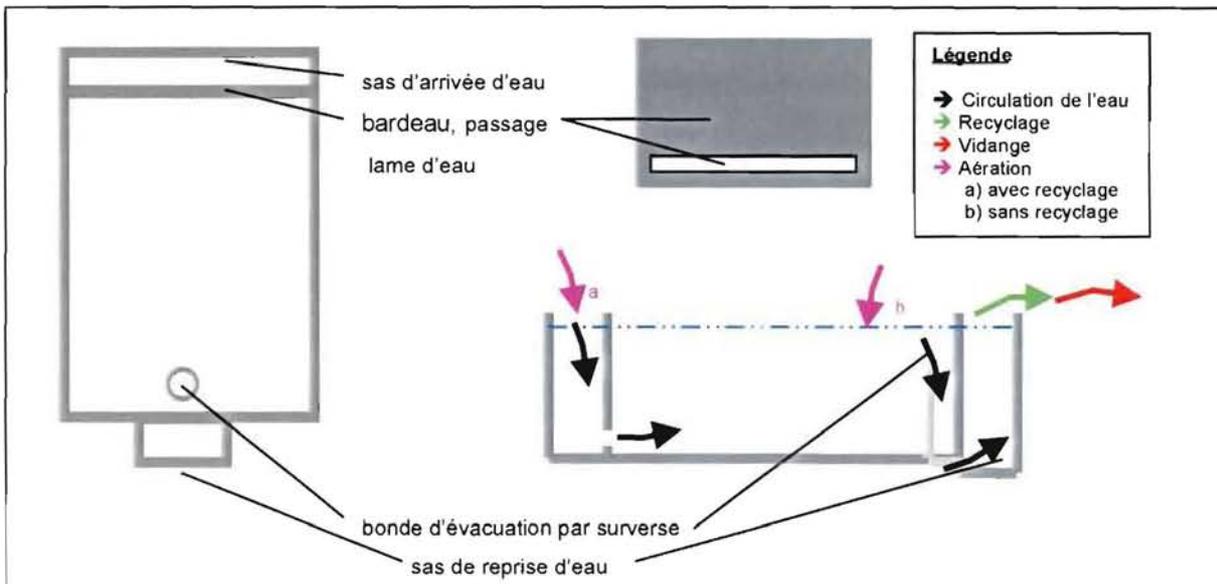


Figure 9 : schéma d'un bassin de purification et principe de circulation de l'eau

Equipements des bassins

Sur les 4 bassins construits en 2000, les équipements concernent (Figure 10) :

- Le bassin 1 équipé d'un filtre, d'U.V et d'un réchauffeur.
- Le bassin 2 (témoin) : sans équipement mais de conception identique au bassin 1 (pompes d'alimentation, de recyclage et de vidange similaires).
- Les bassins 3 et 4 non équipés.

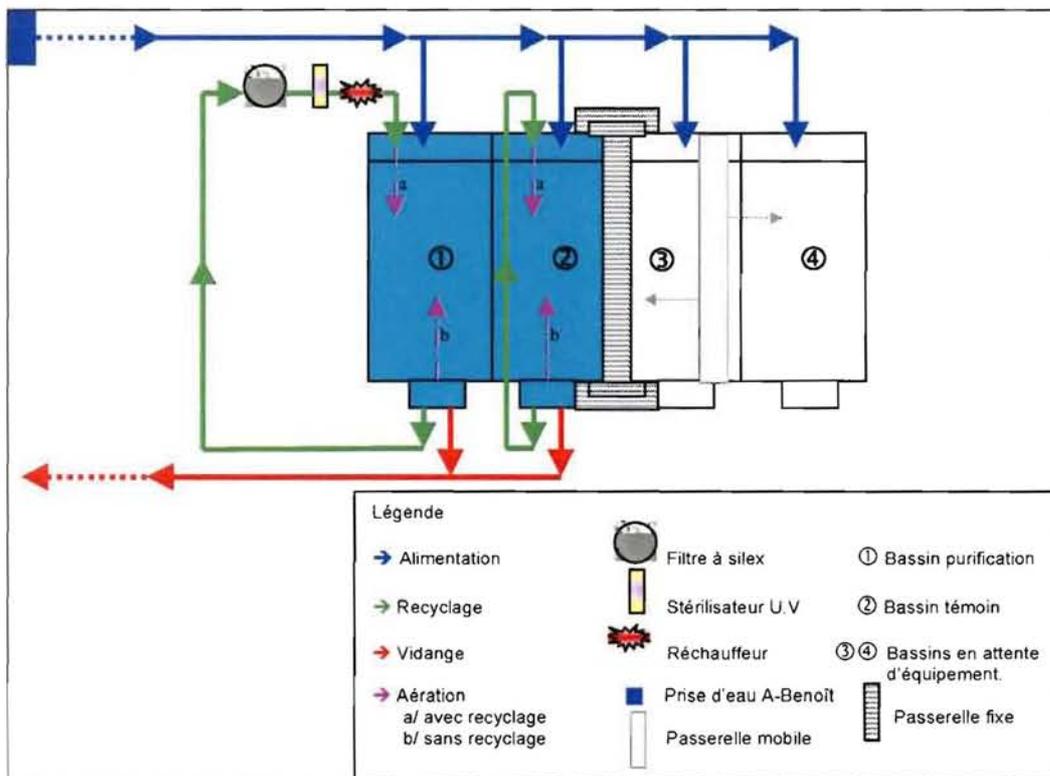


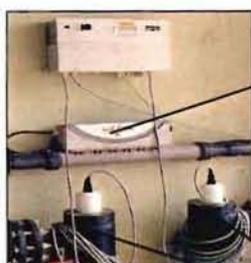
Figure 10 : Schéma d'équipement et de fonctionnement du pilote de purification conchylicole S.A Prat Ar Coum (Novembre 2000)

4.2. Matériel équipant le bassin 1



◆ Filtre Silex

Surface de filtration 0.44 m²
 Diamètre du filtre 750 mm
 Débit maximum 21 m³/h
 Granulométrie 0.5 / 0.7 mm
 Vitesse de filtration 50 m³/h/m²
 Pression de travail 2.5Kg/cm²



● Réchauffeur Titane

Débit de 5 à 20 m³/h maximum
 Température de 16 °C à 40 °C



● Stérilisateur U.V 150/2 – PEHD

Débit maximum 20 m³/h
 Puissance germicide totale 2 x 25 Watts UV-C
 Volume d'eau de la chambre 2 x 19.5 litres
 Temps de contact 7.02 secondes
 Dose UV-C garantie 31.75 mJ/cm²
 (jusqu'à 8700 heures)



● Pompe de recyclage
 (voir Figure 12)

Débit de 5 à 20 m³/h maximum
 Possibilité d'aération par système ventury.

● Pompe d'aération/ou de vidange
 (voir Figure 12)

Débit de 12 m³/h
 Aération programmable par horloge

4.3. Aménagements réalisés, année 2000

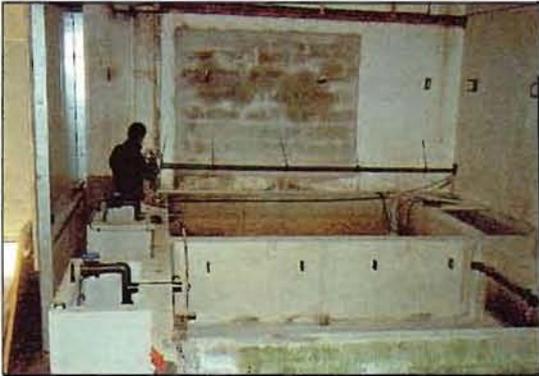


Figure 11 : rénovation des anciens viviers à bigorneaux en 4 bassins destinés au pilote purification



Figure 13 : isolation du pilote purification



Figure 14 : construction accès passerelle, bassin et ouverture local équipement.



Figure 15 : construction local matériel purification.

Figure 16 : Filtre silex, stérilisateur U.V, réchauffeur.

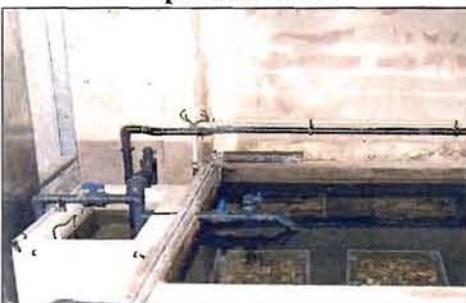
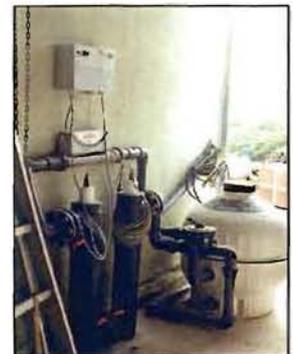


Figure 17 : Bassin de purification \odot du Pilote S.A Prat Ar Coum.

(opérationnel-novembre 2000)

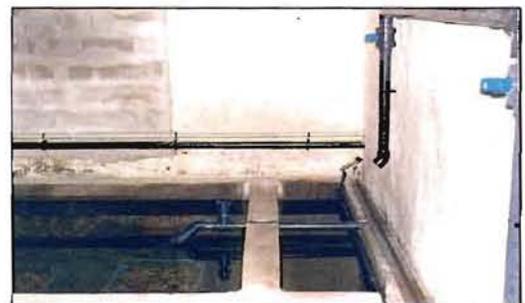


Figure 12 : pompes de recyclage, vidange et aération sur le bassin purification (idem bassin témoin)

5. Conclusion

La première année d'étude a permis:

- D'acquérir les données bibliographiques indispensables pour comprendre la fonction d'épuration des coquillages en l'appliquant à la purification virale.
- De calibrer le système de purification existant dans l'Etablissement Prat ar Coum
- De concevoir et de construire un pilote dont la moitié des équipements est actuellement en place.

En ce qui concerne le déroulement de l'étude en 2001, elle se fera en plusieurs étapes :

- *Validation des paramètres liés à la purification* : plusieurs tests sont en cours actuellement au laboratoire de Brest (Ifremer/DEL/MIC) sur des huîtres artificiellement contaminées placées dans des aquariums d'eau de mer. Les expériences sont réalisées en petits volumes sur une semaine environ. Parmi les différents paramètres sont testés : l'exondation des huîtres, l'alimentation en phytoplancton ou en matières en suspensions, l'ajout d'acides aminés et la température. En raison du phénomène de concentration des particules virales dans les glandes digestives des huîtres, la recherche des phages sera effectuée uniquement dans cet organe, ce qui permettra, dans les cas de coquillages faiblement contaminés, d'avoir une indication plus précise de l'efficacité de la purification.
- *Calibration du pilote* : dans un premier temps, une étude sera réalisée pour tester la fiabilité hydraulique du pilote (stabilité des températures, effet des vitesses de circulation de l'eau sur l'aération du bassin et sa température). Une coloration à la rhodamine permettra de tester l'hydraulique et le mélange des eaux dans les bassins. Enfin on utilisera des huîtres artificiellement contaminées pour terminer la validation du système.
- *Les études de purification* sur des huîtres naturellement contaminées devraient débiter au second semestre 2001.

Annexe 1 : Bibliographie

1. Akin E.W., Hamblet F.E., Hill W.F. 1966. Accumulation and depuration of poliovirus by individual oysters. Gulf Coast Shellfish Sanitation Research Ctr., Dauphin Island, Al. Technical memorandum GCSSRC-FY66-5. 5pp.
2. Armon, R. and Y. Kott, Bacteriophages as indicators of pollution. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 26, (4): 299-335, 1996.
3. Bird P., 1992. A rating system for oyster purification hazard analysis critical control point (HACCP) application to purification of live oysters. 2^e conférence internationale sur la purification des coquillages.
4. Bird PD, 1994, Purification Technology for New South Wales Oysters, NSW Shellfish Quality Assurance Program, 61 pp (+annexs).
5. Boher, S. and L. Schwartzbrod, 1993. Study of Viral Purification of Oysters. *Water Science and Technology*, 27, : 55-60.
6. Canzonier, W. J., 1982. Depuration of bivalves molluscs - what it can and cannot accomplish and some practical aspects of plant design and operation, presented at: International seminar on management of shellfish resources, Irish Mar. Farmers Assoc. Ireland.
7. Cook D.W., Ellender R.D. 1986. Relaying to decrease the concentration of oyster-associated pathogens. *J. Food. Prot.* 49: 196-202.
8. Daguzan J, 1992, Biologie des mollusques bivalves marines et conchyliculture, in *Coquillages et Santé publique, du risque à la prévention*, ENSP eds. 17-28.
9. Di Girolamo, R., J. Liston, et al., 1975. Uptake and elimination of poliovirus by West Coast oysters. *Appl Microbiol*, 29, (2): 260-4.
10. Doré, W. J. and D. N. Lees, 1995. Behavior of *Escherichia coli* and male-specific bacteriophage in environmentally contaminated bivalve molluscs before and after depuration. *Appl Environ Microbiol*, 61, (8): 2830-4.
11. Doré, W. J., K. Henshilwood, et al., 1998. The development of management strategies for control of virological quality in oysters. *Water-Science-and-Technology*, 38, (12): 29-35.
12. Doré, W. J., K. Henshilwood, et al., 2000. Evaluation of F-specific RNA bacteriophage as a candidate human enteric virus indicator for bivalve molluscan shellfish. *Appl Environ Microbiol*, 66, (4): 1280-1285.
13. Durgin O.B., Metcalf T.G., Moulton E.R., Hurst J.W., 1981. Viral monitoring of commercial shellfish. Contract No 223-78-2228, US Food and Drug Admin., Washington DC. 52 pp.
14. Furfari, S. A., D. J. Kelley-Reitz, et al., 1992. Hazard analysis critical points (HACCPs) and verification studies at shellfish depuration plants in the USA. *Shellfish depuration ; second international conference 6-7-8 Avril 1992 Rennes (France)*, : 185-197.
15. Gill, O. N., W. D. Cubitt, et al., 1983. Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 287, (6404): 1532-4.
16. Grohmann, G. S., A. M. Murphy, et al., 1981. Norwalk virus gastroenteritis in volunteers consuming depurated oysters. *Aust J Exp Biol Med Sci*, 59, (Pt 2): 219-28.
17. Hamblet, F. E., W. F. Hill, et al., 1969. Oysters and human viruses: effect of seawater turbidity on poliovirus uptake and elimination. *Am J Epidemiol*, 89, (5): 562-71.
18. Havelaar, A. H., M. van Olphen, et al., 1993. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol*, 59, (9): 2956-62.
19. Haven D.S, Perkins F.O., Morales-Alamo R., Rhodes M.W., 1978. Bacterial depuration by the American Oyster (*Crassostrea virginica*) under controlled conditions. *Voll. Biological and technical studies. Special scientific report No 88*. Virginia Institute of Marine Science, Gloucester point, VA. pp 64 ff.
20. Hoff, J. C. and R. C. Becker, 1969. The accumulation and elimination of crude and clarified poliovirus suspensions by shellfish. *Am J Epidemiol*, 90, (1): 53-61.
21. Hoff, J. C., Jakubowski W., R. C. Beck., 1966. Studies on bacteriophage accumulation and elimination by the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Pp 74-90. In W.J Beck and J.C. Hoff (eds.), 1965 Proc. Northwest Shellfish Sanitation Res. : Planning Conf., Publ. Health Service Publ. No. 999-FP-6, Washington DC.
22. Jackson KL, Ogburn DM (project N°96/355), Review of depuration and its role in shellfish quality assurance, NSW Shellfish Quality Assurance Program, 77 pp.
23. Jaykus, L. A., 1994. Development of methods to concentrate and purify human enteric viruses in oysters for detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction and oligoprobing. *Dissertation-Abstracts-International*, -B; 54 (12) 6120 Order no. DA9415332, 325pp.
24. Le Guyader, F., D. Menard, et al., 1995. Use of RT seminested PCR to assess viral contamination in Caribbean rivers (Martinique). *Water Science and Technology*, 31, (5-6): 391-394.
25. Le Guyader, F., Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., and M. Pommepuy, 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied-and-Environmental-Microbiology*. 66:3241-3248.

26. Le Guyader, F., L. Miossec, et al. ,1998.RT-PCR evaluation of viral contamination in five shellfish beds over a 21-month period. *Water-Science-and-Technology*, 38,(12): 45-50.
27. Lee, J. V., S. R. Dawson, et al. ,1997.* Bacteriophages are a better indicator of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. *HEALTH-RELATED-WATER-MICROBIOLOGY-1996.;WATER-SCI.-TECHNOL.* 1997 pp. 165-170; vol. 35, no. 11-12.
28. Lees, D. 2000. Viruses and bivalve shellfish. *International-Journal-of-Food-Microbiology.* 59:81-116.
29. Maillard, J. Y. ,1996.Bacteriophages: a model system for human viruses. *Lett Appl Microbiol*, 23, (5): 273-4.
30. Meinhold, AF., and Sobsey M.D., 1982. The uptake, elimination and tissue distribution of poliovirus in the American Oyster *Crassostrea virginica*. *Abstr. Annu. Meeting Am. Soc. Microbiol.*:181.
31. Metcalf TG, 1978, Indicators of viruses in shellfish, in *Indicators of viruses in water and food*, ed. G Berg , Ann Harbor Science, Ann Harbor , Michigan, 383-415.
32. Metcalf TG, Melnick JL, Estes MK, 1995, *Environmental Virology: from detection of virus in Sewage and Water by isolation to identification by molecular biology*, *Annu. Rev. Microbiol.*, 49: 461-487.
33. Miossec, L., Le Guyader F., Haugarreau L., and Pommepuy M., 2000. Magnitude of rainfall on viral contamination of the marine environment during gastroenteritis epidemics in human coastal population. *Revue-D-Epidemiologie-Et-De-Sante-Publique.* 48 Suppl. 2:62-71.
34. Mitchell, J. R., M. W. Presnell, et al. , 1966. Accumulation and elimination of poliovirus by the eastern oyster. *Am J Epidemiol*, 84: 40-50.
35. NSSP, 1993, Manual of operations, US FDA, Prime Connection, <http://www.fda.gov>.
36. Power, U. F. and J. K. Collins , 1990. Tissue distribution of a coliphage and *Escherichia coli* in mussels after contamination and depuration. *Appl Environ Microbiol*, 56, (3): 803-7.
37. Richards, G. P. , 1985. Outbreaks of shellfish-associated enteric virus illness in the United States: requisite for development of viral guidelines. *J.-FOOD.-PROT.* vol. 48, no. 9, pp. 815-823.
38. Richards, G.P. , 1988. Microbial purification of shellfish : a review of depuration and relaying. *Journal of food protection* , 51 (3) : 218-251.
39. Schwab KJ, Neill FH, Estes MK, Atmar RL, 1998, Improvements in the RT-PCR detection of enteric viruses in environmental samples. *Water Sci. Tech.* 38: 83-86.
40. Scotti, P. D., G. C. Fletcher, et al. , 1983. Virus depuration of the pacific oyster (*crassostrea gigas*) in new zealand. *New zealand Journal of science.* Vol. 26, pp 9-13.