

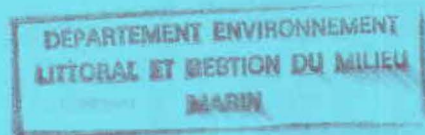
ISN
48593

N 600
SCH
D

Détermination de la Qualité du Milieu sur L'Inactivation des Virus en Mer

(Contrat Ifremer 91.2.430437 Del)

Schwartzbrod L.*, Dincher M.L.*, Deloince R.***, Crance J.M.**



* Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques
Laboratoire de Virologie

** Centre de Recherche du Service de Santé des Armées
Unité de Biologie Moléculaire

IFREMER-DERO/EL



0EL04552

Décembre 1992

1. INTRODUCTION.

- Les virus sont rejetés en quantité considérable dans le milieu aquatique et ce par le biais des eaux usées urbaines fortement chargées en microorganismes. Le traitement de ces eaux n'étant pas d'une efficacité parfaite en ce qui concerne les virus, une quantité non négligeable de ces derniers persiste dans les eaux épurées qui sont rejetées dans les eaux superficielles et en particulier dans les mers.

En zones conchylicoles côtières, la présence de virus dans l'eau de mer constitue un risque potentiel de contamination des coquillages. En effet, pour leur nutrition, ceux-ci filtrent de grandes quantités d'eau et retiennent les éléments particuliers parmi lesquels les microorganismes présents dans l'eau. Compte tenu du fait que ces mollusques sont la plupart du temps consommés à l'état cru, il existe un risque pour la santé des consommateurs.

Dans ces conditions, il est fondamental de pouvoir déterminer le devenir des virus dans l'eau de mer.

Notre travail consiste à évaluer l'influence d'un certain nombre de paramètres sur la survie du poliovirus de type 1 et du virus de l'hépatite A pris comme exemple de virus entérique. Notre étude a été réalisée en eau de mer synthétique, stérile et filtrée de façon à pouvoir travailler dans un milieu de composition parfaitement connue et d'éviter le plus possible l'existence de biais dans cette étude.

Les paramètres testés sont la température, la salinité, la lumière ainsi que le rayonnement ultra-violet.

Après une étude bibliographique seront présentés le matériel et les méthodes utilisés ainsi que le protocole expérimental suivi puis les résultats qui seront ensuite discutés. -

2. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.

2.1. CYCLE DE CONTAMINATION VIRALE DANS LE MILIEU HYDRIQUE.

Les virus sont présents en abondance dans le milieu hydrique qui joue le rôle de propagateur de la contamination virale (cf. figure 1). Les virus pathogènes pour l'homme susceptibles d'y être rencontrés sont essentiellement des virus entériques. Les cellules hôtes de ces pathogènes n'étant pas présentes dans le milieu hydrique, ces derniers ne peuvent en aucun cas s'y multiplier.

Les virus entériques sont présents dans les selles d'une personne infectée où ils peuvent atteindre des concentrations de 10^{11} particules virale / g de selles (CHAMPSAUR, 1989).

Ils se retrouvent ensuite au niveau des eaux usées à des concentrations allant jusqu'à 10^5 UFP/l (DAHLING *et al*, 1989). Ces eaux usées constituent le premier maillon du cycle de contamination virale par le milieu hydrique dans lequel, l'être humain est impliqué en tant que contaminateur primaire et récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau.

Les eaux usées sont susceptibles de subir ensuite un traitement physico-chimique ou biologique qui ne permet cependant d'éliminer que 50 à 90 % de la concentration (SCHWARTZBROD, 1984).

Cette concentration étant relativement importante, il persiste une quantité non négligeable de particules virales qui sont alors rejetées dans les eaux superficielles (lacs, rivières, fleuves, mers). Cette charge virale est rapidement diluée dans ces grandes quantités d'eau, mais l'isolement de virus est encore réalisable (SCHWARTZBROD *et al*, 1987).

Au niveau des zones conchylicoles, les virus peuvent être adsorbés et concentrés par les fruits de mer qui, de part leur mode d'alimentation, filtrent de grandes quantités d'eau de mer. Ainsi, BEMISS *et al* (1989) ont observés des facteurs de concentration entre la contamination virale de l'eau de mer (UFP/ml) et la contamination virale des tissus de fruits de mer (UFP/g) qui varie entre 1,1 et 2,5 pour une durée de contamination artificielle de 48 à 72 heures.

Plusieurs études ont montrées que la survie des virus dans les coquillages se faisait pendant des périodes très longues. Les fruits de mer étant généralement consommés à l'état cru, il existe donc un risque de contamination pour le consommateur.

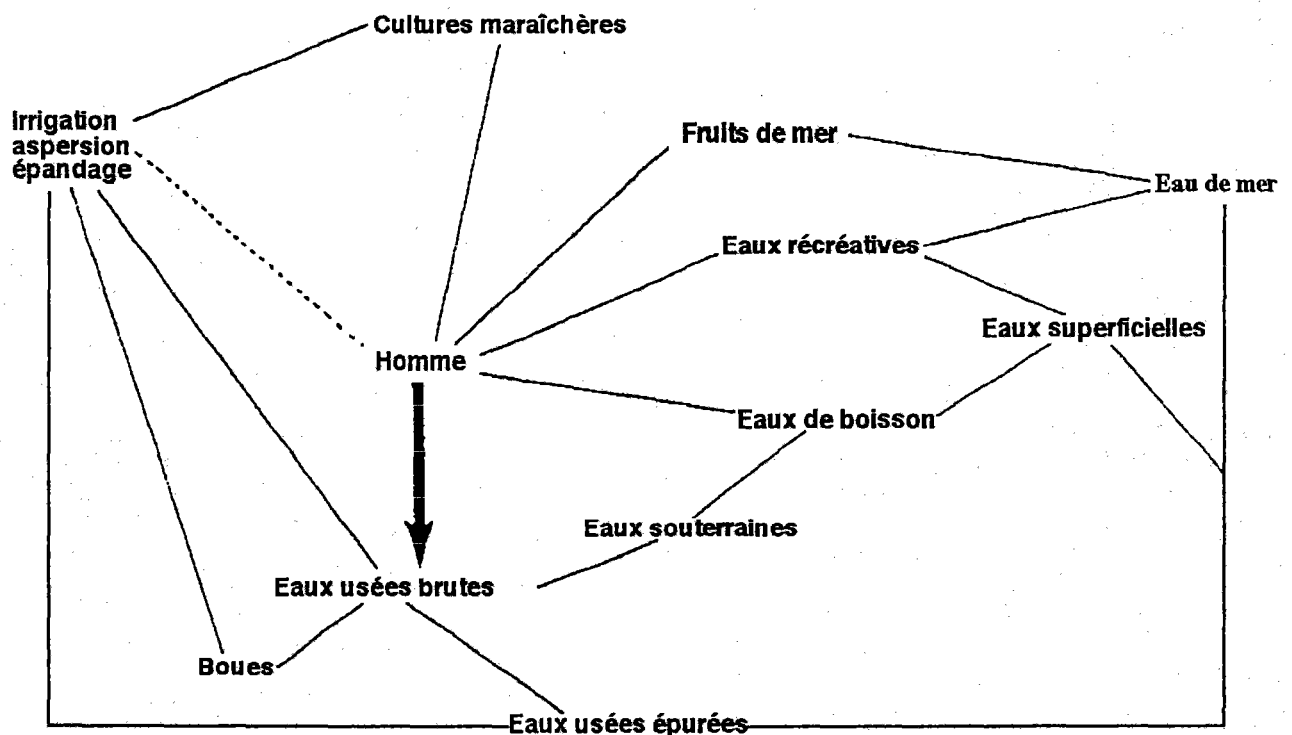


figure 1 : Schéma du cycle de contamination virale dans le milieu hydrique.
(d'après SCHWARTZBROD, 1991)

2.2. SURVIE DES VIRUS.

Plusieurs études concernant la survie des virus dans différents milieux hydriques ont été réalisées. Le temps de survie est exprimé en T90 et T99 (éventuellement T99,9), ce qui représente le temps nécessaire pour obtenir une chute du titre viral de 1 log ou 2 log (éventuellement 3 log).

Ainsi, d'après BIZIAGOS *et al* (1988), le poliovirus de type 1 et le virus de l'hépatite A ont respectivement des T90 de 56 jours et 89 jours dans de l'eau minérale à 20°C. GIRONES *et al* (1989) ont quant à eux déterminé un T90 inférieur à 2 jours pour le même virus dans de l'eau de mer naturelle à 20°C. FUJIOKA *et al* (1980) ont constaté une chute du titre du poliovirus de 1 log au bout de 24 à 48 heures et ce en eau de mer naturelle à $24 \pm 1^\circ\text{C}$.

Ces très faibles valeurs de durée de survie rejoignent celles trouvées par HURST et GERBA (1980). Le temps de survie en eau de mer apparaît donc plus faible qu'en eau douce.

La perte du pouvoir infectieux résulte de l'altération de la capsidie et/ou des acides nucléiques empêchant respectivement l'adhésion des virus sur la cellule hôte ou l'expression des acides nucléiques viraux au sein de cette même cellule.

2.3. FACTEURS NATURELS AFFECTANT LA SURVIE DES VIRUS.

Les facteurs naturels influençant la survie des virus dans le milieu sont d'ordre physique, chimique et biologique (cf. figure 2).

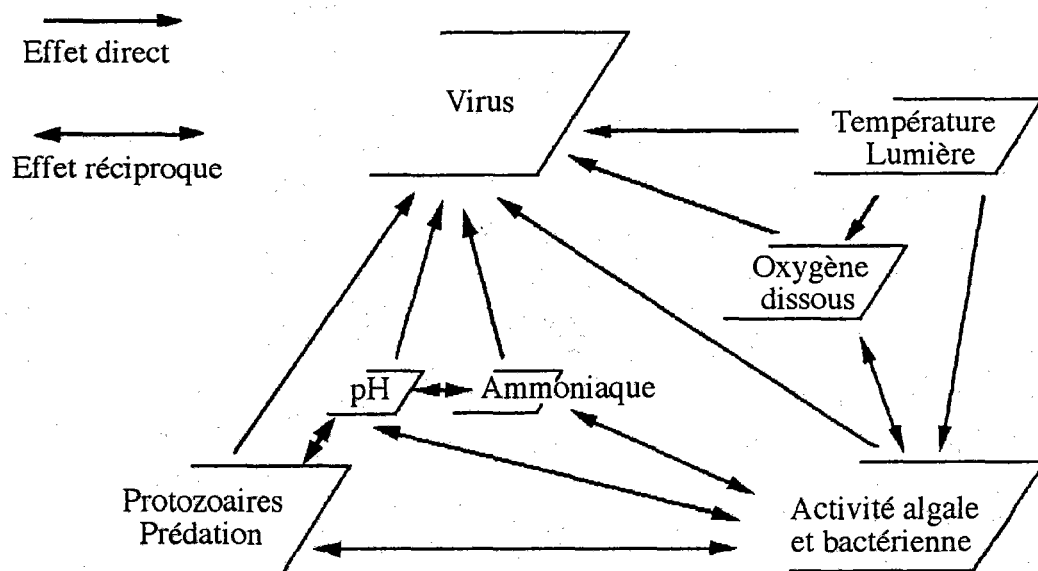


figure 2 : Facteurs affectant la survie des virus dans l'environnement.
(d'après BLOCK, 1983)

Il est évident que ces différents facteurs interfèrent entre-eux et que leurs effets sont cumulables, pourtant, afin de simplifier leur étude, ils sont traités séparément.

2.3.1. Les facteurs physiques.

2.3.1.1. La température.

La température semble être le facteur ayant la plus forte influence sur la survie des virus quelle que soit la nature du milieu hydrique. Le titre viral reste en général stable pour des températures basses mais chute rapidement dès que la température augmente.

Ainsi, dans une eau de mer autoclavée, DENIS *et al* (1975) notent que le titre du poliovirus de type 2 chute de 1 log (T90) en 48 jours à 4°C alors qu'à 22°C en 30 jours, la perte est de 3 log (T99,9).

En eau minérale, BIZIAGOS *et al* (1988) observent des T90 de 342 jours et 519 jours pour le poliovirus et le virus de l'hépatite A à 4°C, alors qu'à 23°C, ceux-ci ne sont plus que de 56 jours et 89 jours.

Enfin, en milieu nutritif de survie, MENG *et al* (1987) montrent que le titre du rotavirus chute de 3,5 log en 7 jours pour une température d'exposition de 37°C et en 1 heure pour une température de 56°C.

2.3.1.2. La lumière.

La lumière, qui selon BONNEFONT *et al* (1990) a une influence indéniable sur la décroissance des bactéries fécales en milieu marin, a été aussi identifiée comme un agent d'inactivation viral. Elle agit de façon directe sur les particules virales et de manière indirecte par stimulation du développement de la microfaune.

HURST (1988) observe que le taux d'inactivation en eau douce passe de 0,71 à 0,80 log/jour à l'obscurité à 2,38 log/jour à la lumière dans une eau de faible turbidité. KAPUSCINSKI et MITCHELL (1983) notent que, en eau de mer naturelle, le T90 déterminé à la lumière est 5 fois plus faible que celui déterminé à l'obscurité.

Cette inactivation se produit pour un rayonnement de longueur d'onde inférieure à 370 nm (CUBBAGE (1979) et KAPUSCINSKI et MITCHELL (1983)).

En fait, l'effet inactivant de la lumière est sans doute lié aux rayonnements ultra-violet situés dans une gamme de longueur d'onde allant de 200 à 400 nm et pour lesquels un effet virucide a été mis en évidence (cf. § 2.4.4.).

2.3.1.3. L'agrégation et l'adsorption.

La plus grande part des virus présents dans le milieu hydrique sont sous forme agrégée ou adsorbée à la surface de particules en suspension (argile, sable, sédiments, matière organique...). La persistance des virus dans ce milieu est due en grande partie à cette capacité à s'agréger ou à s'adsorber. Il a ainsi été montré que le poliovirus persistait plus longtemps en eau de mer contenant des sédiments qu'en eau de mer seule (CHUNG et SOBSEY, 1992).

L'adsorption des virus sur les éléments particuliers leur confère une protection de type physique qui, d'après WARD *et al* (1976), augmente notamment leur résistance à la chaleur.

2.3.2. Les facteurs chimiques.

2.3.2.1. Le pH.

Le titre du rotavirus, en solution saline, ne varie pas pour des pH compris entre 3 et 10 (MENG *et al*, 1987). Par contre, lorsque celui-ci est inférieur à 3 ou supérieur à 10, une diminution du titre pouvant aller jusqu'à 4 log est observée.

2.3.2.2. La salinité.

De nombreuses études ont été réalisées à propos de l'action de la salinité sur la survie des virus mais les résultats obtenus sont discordants. Selon BABICH et STOTZKY (1979), la salinité n'a pas d'influence sur l'inactivation des virus alors que par contre, SALO et

CLIVER (1976) estiment que l'inactivation virale est toujours plus importante en solution saline que dans l'eau distillée.

2.3.3. Les facteurs biologiques.

Ces facteurs biologiques ont essentiellement été observés en eau de mer naturelle à laquelle sont attribuées des propriétés antivirales (MATOSSIAN et GARABEDIAN, 1967). Ils sont très nombreux et varient selon la nature et la localisation de l'eau de mer.

FUJIOKA *et al* (1980), GIRONES *et al* (1989) et PATTI *et al* (1987) ont mis en évidence l'origine microbiologique de l'un de ces facteurs.

2.4. ACTION DES DESINFECTANTS.

2.4.1. Le chlore.

L'efficacité de la chloration dépend de la souche virale, de la quantité de chlore mise en oeuvre, du temps de contact et de la forme chimique du chlore qui dépend elle-même du pH, de la température de l'eau d'une part et de la quantité de composants organiques et minéraux d'autres part. En effet, lorsque le pH augmente, le chlore passe de la forme Cl_2 à la forme HClO puis à celle de ClO^- . Une telle variation de pH est importante car les différents composés n'ont pas le même pouvoir désinfectant. L'ordre d'efficacité est le suivant : $\text{Cl}_2 > \text{HClO} > \text{ClO}^-$. De plus, l'efficacité du chlore libre (Cl_2) est réduite par la présence de matière organique et d'ammoniaque.

A titre d'exemple, une diminution de 99,99% du titre du virus de l'hépatite A en 2 minutes et 30 secondes est obtenue avec un résiduel de chlore compris entre 0,28 et 0,4 mg/l (GRABOW *et al*, 1983).

2.4.2. Le dioxyde de chlore.

Le dioxyde de chlore est un oxydant plus puissant que le chlore. Pour une dose de dioxyde de chlore résiduel de 0,57 mg/l, FUJIOKA *et al* (1986) ont constaté une chute de titre du poliovirus dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) de 1,6 log après 1 minute de réaction et de 3,2 log après 5 minutes de réaction.

2.4.3. L'ozone.

L'ozone est un excellent agent inactivant qui élimine rapidement les virus. FINCH et FAIRBAIN (1991), lors d'une étude relative au poliovirus de type 1 en tampon phosphate à pH 6,9 et à 22°C, ont constaté une chute du titre de 1,5 log en 60 secondes quand une dose de 0,6 mgO₃/l est appliquée.

2.4.4. Le rayonnement ultra-violet.

L'action désinfectante des rayons ultra-violet est indéniable et surtout très rapide.

CHANG *et al* (1985) ont montré que, dans une solution de tampon phosphate, la dose nécessaire pour induire une diminution de 3 log du titre du poliovirus est de l'ordre de 28 à 42 mW.s/cm². De même, dans de l'eau de mer synthétique stérile, BOHER (1991) observe une chute du titre du rotavirus de 6 log en 5 minutes avec une dose de 46,5 mW.s/cm². Pour une dose de 8,5 mW.s/cm², par contre, lors de 2 expériences sur 5 l'inactivation n'est pas totale après 15 minutes d'exposition.

3. MATERIEL ET METHODES.

Toutes les manipulations citées dans ce chapitre sont réalisées dans des conditions stériles sous hotte à flux laminaire vertical.

3.1. LES VIRUS.

3.1.1. Le virus poliomyélique

3.1.1.1. Le virus

La souche virale utilisée pour l'ensemble des expériences est le poliovirus de type 1, souche vaccinale Lsc 2ab.

Le poliovirus est capable de se multiplier sur culture cellulaire en provoquant un effet cytopathogène (ECP). Celui-ci se traduit par une destruction spécifique et caractéristique du tapis cellulaire sur lequel le virus a été inoculé. Les cellules deviennent arrondies, réfringentes, se détachent du support et flottent dans le liquide. Cet ECP est mis en évidence par observation au microscope inversé.

3.1.1.2. Les cellules

La mise en évidence du virus se fait par inoculation sur des cultures in vitro de cellules Ma 104. Ce sont des cellules de rein de singe en lignée établie ce qui signifie qu'elles sont cultivables pendant un temps à priori infini.

3.1.1.3. Entretien des cellules

Les cellules en suspension dans un milieu nutritif, placées à 37°C, sédimentent, se fixent à la paroi et se multiplient pour former un tapis cellulaire. Au bout de quelques jours, il se produit une acidification du milieu due à un rejet de substances acides produites par le métabolisme cellulaire. Cette variation de pH se caractérise par le virage au jaune du rouge de phénol présent dans le milieu nutritif. Les cellules ne supportant que des pH neutres, il convient alors de changer le milieu nutritif. Deux types de milieux peuvent être utilisés selon les cas :

- soit un *milieu de croissance*, lorsque le tapis n'est pas continu c'est à dire qu'il n'y a pas de contact entre les cellules.

- soit un *milieu de survie* dans le cas où le tapis cellulaire est déjà continu et que l'on souhaite maintenir ces cellules en survie, sans qu'il y ait multiplication cellulaire.

Le milieu de croissance est un milieu M.E.M. "Minimum Essentiel Medium" de EAGLE additionné de 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 20 minutes. Le milieu M.E.M., est réalisé en dissolvant un sachet de milieu M.E.M. déshydraté (M.E.M. 0011, Eurobio.) et 11 g de NaHCO₃ dans 5 l d'eau Milli Q. Ce milieu est stérilisé par filtration sur filtre Millipore de 0,22 µm, réparti en flacons stériles et conservé à +4°C.

Le milieu de survie est constitué par du milieu M.E.M. cité précédemment complémenté par 2% de sérum de veau foetal décomplémenté.

Avant utilisation pour culture cellulaire, les milieux sont complétés avec 1% d'une solution d'antibiotiques réalisée en dissolvant 10⁴ µg de Streptomycine (Diamant) et 10⁴ millions d'unité de Spécilline (Spécia) dans 100 ml d'eau Milli Q.

3.1.1.4. Subculture des cellules

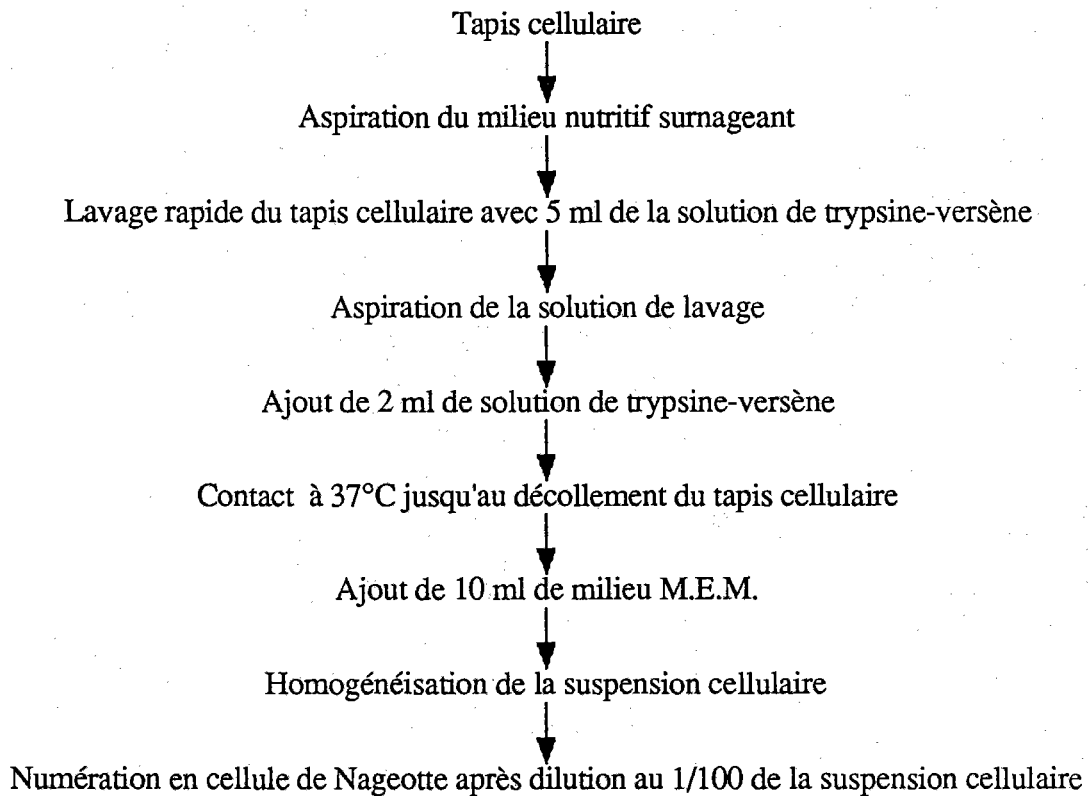
La subculture consiste à dissocier un tapis cellulaire continu, pour obtenir des cellules individualisées qui, mises en suspension dans un milieu de croissance (cf.§ 3.1.1.3.), se multiplient pour donner de nouveaux tapis cellulaires.

La dissociation du tapis cellulaire se fait à l'aide d'une solution de trypsine-versène. La trypsine est une enzyme qui attaque les protéines membranaires et rompt les liaisons peptidiques intercellulaires.

Le versène quant à lui complexe les ions di-et trivalents participant aux liaisons inter-cellulaires.

La solution de trypsine utilisée est réalisée en dissolvant dans une solution de P.B.S.(Phosphate Buffer Saline sans Ca^{2+} ni Mg^{2+}) contenant 10% d'une solution de bicarbonate à 14 g/l, de la trypsine à raison de 3 g/l et du complexant Titriplex III (versène) à raison de 0,8 g/l. Cette solution de trypsine-versène est stérilisée par filtration sur filtre Millipore de 0,22 μm et stockée à 4°C (± 1).

Le protocole suivi lors de la subculture est le suivant :



La numération se fait en comptant les cellules présentes sur 8 bandes de la cellule de Nageotte ce qui correspond à un volume de 10 μl .

La densité cellulaire par ml est obtenue en multipliant le nombre de cellules comptées sur les 8 bandes par 10^4 .

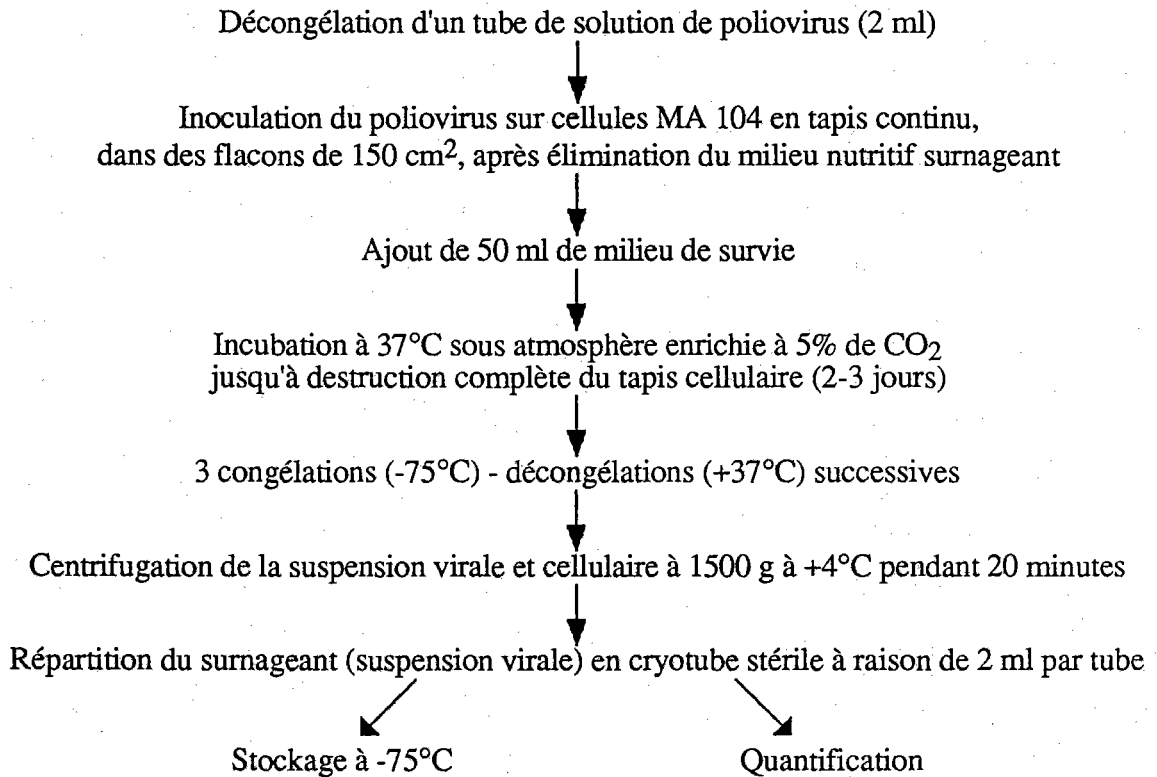
Une fois la densité cellulaire connue, la suspension peut être répartie dans différents supports selon les besoins à raison de :

- 12 à $15 \cdot 10^6$ cellules dans 50 ml de milieu de croissance, par boîte de Roux de 150 cm^2 de surface, pour une production cellulaire.

- $1,5 \cdot 10^4$ cellules dans 100 μl de milieu de croissance par cupule d'une microplaque de 96 cupules, pour réaliser un titrage (cf. § 3.1.1.6.).

3.1.1.5 Préparation de la suspension virale

La suspension virale utilisée pour les différentes expériences a été préparée selon le protocole suivant :



3.1.1.6. Mise en évidence et quantification du virus

La quantification est réalisée par la méthode du "Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes" ou NPPUC.

Cette quantification se fait en microplaques de 96 cupules à fond plat qui sontensemencées par des cellules en suspension et par les échantillons à titrer.

La suspension cellulaire est répartie à raison de $1,5 \cdot 10^4$ cellules/cupule.

Les échantillons à titrer sont dilués dans du milieu de survie et 3 dilutions successives d'un même échantillon sont inoculées sur microplaques.

Chaque dilution est inoculée dans 40 cupules d'une microplaque. Ainsi, chaque microplaque regroupe 2 dilutions (80 cupules) et 16 témoins cellulaires représentés par les 16 cupules non inoculées par la suspension virale.

En pratique, les microplaques sontensemencées en ajoutant successivement dans chaque cupule :

- 100 µl de suspension cellulaire à $1,5 \cdot 10^5$ cellules/ml
- 100 µl de milieu de croissance
- 50 µl de l'échantillon à titrer (excepté pour les cupules témoins)

Une foisensemencées, les microplaques sont placées dans une étuve en atmosphère enrichie à 5% de CO₂, à 37°C.

Après 6 jours d'incubation, l'observation des cupules témoins permet de vérifier la bonne qualité des tapis cellulaires. Il est ensuite noté, pour chaque dilution, le nombre de cupules présentant un ECP.

Pour calculer le "nombre le plus probable" de virus contenus dans un inoculum à une dilution donnée, le programme informatique mis au point par MAUL A. (BLOCK et

SCHWARTZBROD, 1982) est utilisé. Ce programme donne la valeur du NPPUC par volume d'échantillon incorporé dans une cupule (dans notre cas il s'agit de 50 μ l). Pour obtenir le titre exprimé en NPPUC/ml, il faut corriger cette valeur du facteur de dilution et la ramener à 1 ml.

3.1.2. Le virus de l'hépatite A

3.1.2.1. Le virus

La souche CF53 a été isolée à partir des fèces d'un patient de 20 ans atteint d'une hépatite A sévère prolongée, au 3ème jour de l'ictère. Ce prélèvement a été fourni par le Service d'Hygiène hospitalière de la Faculté de Clermont-Ferrand (Pr. LAVERAN).

Cette souche a été adaptée à la culture de cellules d'hépatocarcinome humain par passages successifs. Cette adaptation a demandé plusieurs mois et aboutit à une infection persistante des cellules. La production reste faible (10^6 doses infectieuses 50 en culture de cellules) et son coût atteint 100 F le ml pour une suspension partiellement purifiée à 10^6 DICT₅₀/ml.

3.1.2.2. Les cellules

La lignée cellulaire utilisée provient d'un hépatocarcinome humain établie en 1978 et dénommée PLC/PRF/5 (Réf. ATCC : ECACC n° 85061113). Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère Air (95 %), CO₂ (5 %). Le milieu de croissance est le RPMI 1640 contenant 10 % de sérum de veau foetal décomplémenté, 100 UI/ml de pénicilline et 100 μ g/ml de streptomycine.

3.1.2.3. Préparation de la suspension virale

La production de VHA est réalisée dans un système "Multitray" de 6000 cm² après infection des cellules PLC/PRF/5 à une multiplicité de 0,01 (17ème passage). Après trois semaines de culture à 32°C, le surnageant de Multitray est récolté chaque semaine pendant 1 à 3 mois. Les surnageants sont regroupés, puis concentrés au PEG 6000. Le titre antigénique et le titre infectieux de la suspension virale sont alors déterminés. La suspension est aliquotée, puis stockée à -70°C jusqu'à utilisation.

3.1.2.4. Mise en évidence du virus

Détection de l'antigène de l'hépatite A (VHA-Ag). L'antigène lié à ce virus est détecté par une méthode radioimmunologique modifiée à partir de celle de PURCELL *et al.* (1976). Les anticorps anti-VHA présents dans le sérum d'un sujet convalescent d'hépatite A (200 UI/ml) sont dilués 200 fois avant utilisation. 100 μ l de la dilution sont déposés dans chaque puits d'une plaque de microtitration (Costar réf. 2595) qui est ensuite placée 4 jours à 4°C. Après lavage, 50 μ l de l'échantillon à étudier sont ajoutés et la plaque est incubée 2 heures à 45°C. Après lavage, 50 μ l d'immunoglobulines anti-VHA marquées à l'iode-125 sont déposés dans chaque puits et la plaque est laissée à la température du laboratoire pendant une nuit. Après lavages, la radioactivité fixée de chaque puits est comptée et le rapport nombre de cpm de l'échantillon (P)/moyenne du nombre de cpm des échantillons négatifs (N) est calculée. Il doit être $\geq 2,1$ pour que l'échantillon P soit considéré comme positif.

Dans le cadre d'une recherche sur la contamination naturelle, une étude de la spécificité à l'aide de sérums de chimpanzé prélevés avant et après infection par le VHA est impératif et spécifique du VHA.

3.1.2.5. Titrage du VHA

- **Titre antigénique :** la quantité d'antigène viral est établie par la détermination de la dilution limite à l'aide de la méthode radioimmunologique. Deux séries de dilutions de l'échantillon sont préparées dans un tampon phosphate (PBS) et étudiées en RIA. Le titre correspond à l'inverse de la dilution pour laquelle le rapport P/N est égal à 2.1.

- **Titre infectieux** : il s'agit d'une méthode longue (3-6 semaines).

Il est déterminé par inoculation de cellules PLC/PRF/5 à confluence dans une plaque de culture de 48 puits à l'aide d'une série de dilutions (de raison 4) - (6 puits/dilution). Les plaques de cultures sont incubées à 32°C pendant 28 jours avec changement de milieu toutes les semaines. Après 28 jours, les cultures de cellules sont soumises à 4 cycles de congélation-décongélation, puis une étude radioimmunologique pour la recherche d'Ag-VHA est réalisée sur chaque puits. Le titre infectieux, exprimé en doses infectieuses 50 en culture de cellules, est calculé par la méthode de Reed & Muench.

3.2. L'EAU DE MER SYNTHETIQUE.

Elle est constituée d'eau désionisée additionnée d'une quantité variable de sels marins synthétiques Instant Ocean (cf. composition annexe 1) selon la salinité souhaitée.

L'hydratation des sels entraîne une différence entre la quantité de produit pesé pour un litre d'eau et la salinité (g/l). A partir de plusieurs essais, une droite d'étalonnage a pu être réalisée (cf. figure 3).

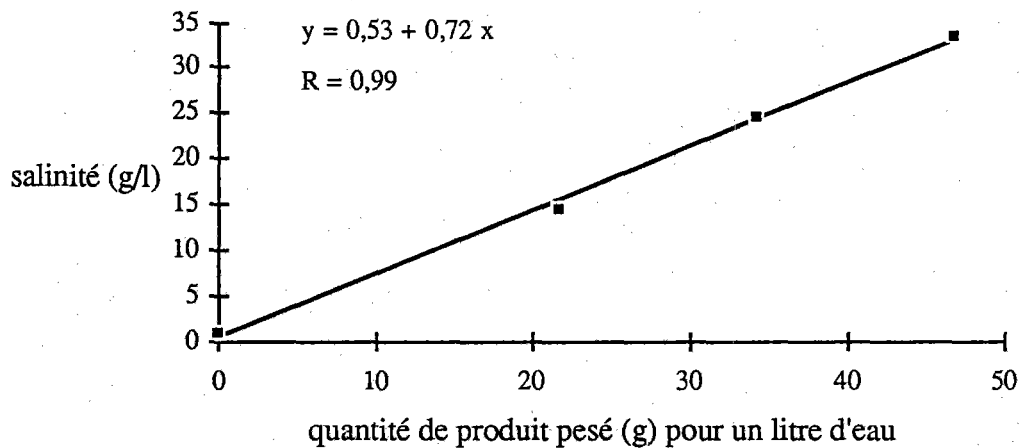


figure 3 : Relation entre la quantité de produit pesé par litre d'eau et la salinité.

La mesure de salinité est réalisée systématiquement lors de chaque préparation d'eau de mer à l'aide d'un densimètre et d'une table de correspondance densité-salinité.

L'eau de mer est ensuite stérilisée par filtration sur filtre Millipore de 0,22 µm et conservée à + 4°C jusqu'à utilisation.

3.3. LA LUMIERE ARTIFICIELLE.

Cette lumière est produite par trois tubes "néon" : deux tubes "Sylvania gros lux life line" de 40W et un tube "Cool White" de 40 W. Ces tubes sont en fonctionnement 24h/24h. Ces tubes néons produisent une lumière semblable à la lumière du jour.

3.4. LES ULTRA-VIOLETS.

L'influence du rayonnement ultra-violet est testée dans un pilote de désinfection schématisé sur la figure 3. Il s'agit d'un circuit fermé équipé d'une lampe UV (8 watts ou 15 watts) dans lequel il est possible de faire circuler un liquide. Le débit de fonctionnement est de 4 litres par minutes. Le temps de passage du volume de liquide dans tout le circuit est de 45 secondes.

Les lampes UV de 8 watts et 15 watts, dites lampes germicides émettent des rayonnements ayant une longueur d'onde de 254 nm. Cette longueur d'onde se situe dans la

gamme des rayonnements appelés UVc (200-280 nm) susceptibles d'inactiver des microorganismes.

La désinfection de l'eau est réalisée par circulation permanente de celle-ci en couche mince entre un tube UV et l'enveloppe de verre qui l'entoure (cf. figure 4).

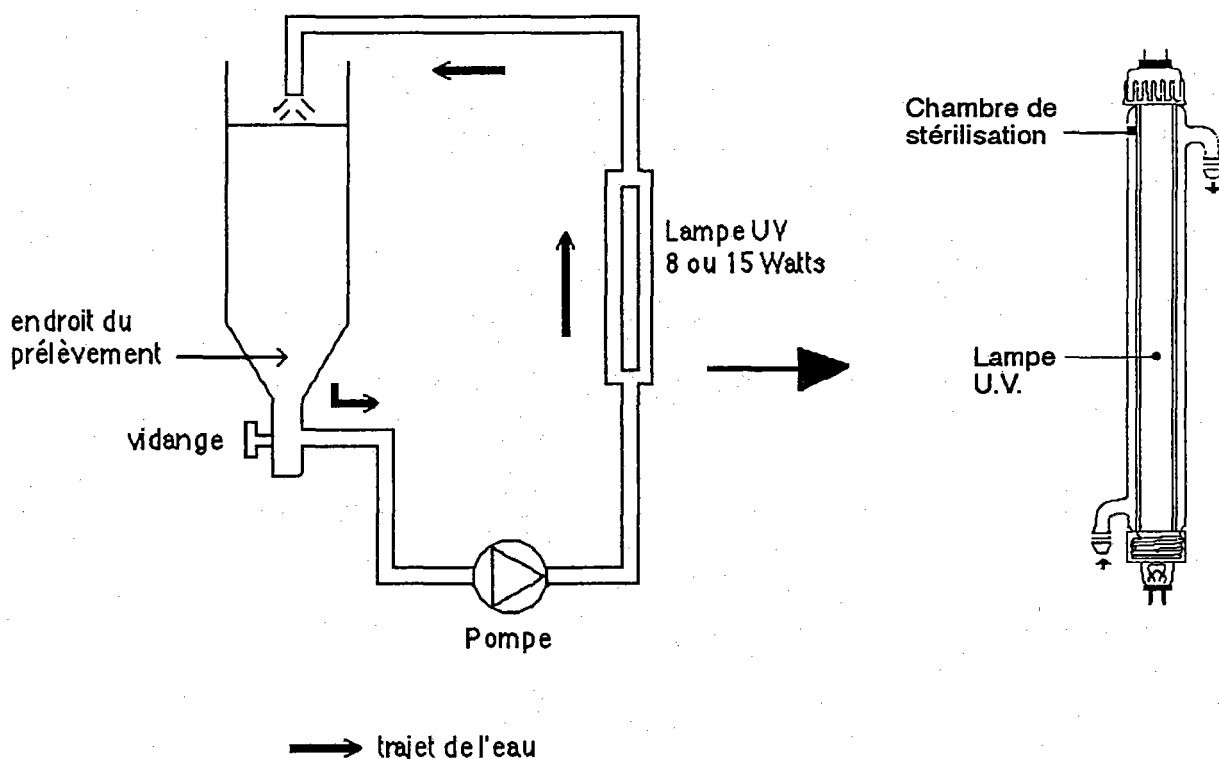


figure 4 : Schéma du pilote de désinfection par rayonnement ultra-violet et d'une lampe germicide.

Les doses germicides en un point donné de la chambre de stérilisation sont calculées, pour chaque lampe, selon la formule suivante :

$$D = \frac{P.e}{S} (- K.x).t$$

- où
- D = la dose germicide (en mW.s/cm²).
 - P = la puissance utile de la lampe (en mW).
 - S = la surface interne de la chambre de stérilisation (en cm²).
 - K = le coefficient d'adsorption des UV dans le liquide à traiter (en cm⁻¹).
 - x = l'épaisseur de la lame d'eau (en cm).
 - t = le temps d'exposition d'un élément de volume aux UV (en s).

$$t = \frac{\text{volume utile de la lampe}}{\text{débit}}$$

Pour un débit de 4 l/min, les doses germicides sont respectivement, pour les lampes de 8 watts et 15 watts, de 8,5 mW.s/cm² et 42 mW.s/cm².

3.5. METHODE DE CALCUL DES T90 ET T99.

Le calcul des T90 et T99, qui sont les temps au bout desquels la population virale initiale a diminué de 90% et 99%, est réalisé à partir de l'équation d'une courbe de régression de type $y = a.e^{-bx}$ (cf. figure 5). Dans certains cas, celle-ci doit être extrapolée pour permettre le calcul des T99 qui se situent au delà des valeurs expérimentales. Les T99 ainsi calculés ne sont alors que purement théoriques.

Toutefois, cette courbe de régression n'est applicable aux résultats expérimentaux que lorsque les coefficients de corrélation sont significatifs. Pour cela, ces derniers doivent être supérieurs à une certaine valeur théorique dépendant du nombre de points expérimentaux qui est donnée en annexe 2.

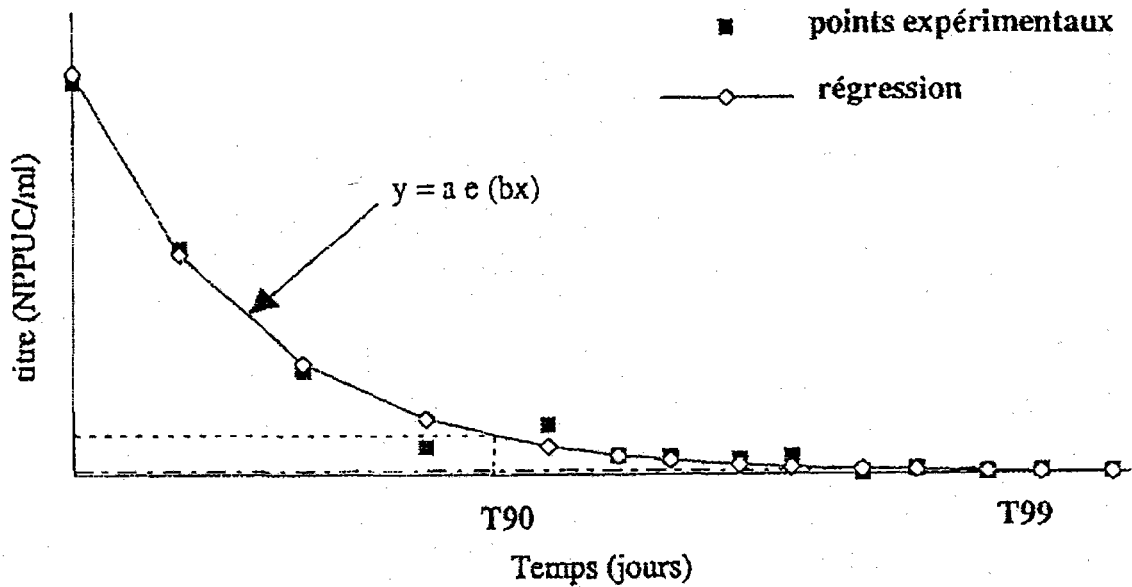


figure 5 : Exemple d'une courbe de régression réalisée à partir de points théoriques.

4. PROTCOLE EXPERIMENTAL.

Le protocole général suivi pour les expériences concernant l'influence de la température, de la salinité et de la lumière est décrit ci-dessous et schématisé par la figure 6. Le protocole utilisé pour tester l'influence du rayonnement ultra-violet est quant à lui présenté dans le § 4.2.3..

Une eau de mer synthétique est réalisée à une salinité donnée. Elle est inoculée par une quantité connue de suspension virale de Poliovirus de type 1 ou de virus de l'hépatite A.

Après homogénéisation par agitation magnétique, l'eau de mer est répartie dans différents flacons en verre stériles de 125 ml. Cette répartition est réalisée à l'aide d'une seringue de cornwall de 10 ml, à raison de 100 ml par flacon.

La concentration virale initiale est déterminée à partir de deux flacons. L'un des flacons est prélevé parmi les premiers réalisés lors de la répartition de l'eau de mer, l'autre parmi les derniers de façon à vérifier l'homogénéité de l'inoculation de l'eau de mer entre le début et la fin de la manipulation.

Les flacons restants sont placés dans les conditions spécifiques de chaque expérience, selon le paramètre testé.

Au cours du temps, des prélèvements sont effectués à partir de flacons déterminés de façon aléatoire puis titrés afin de réaliser un suivi de l'évolution du titre viral.

Pour effectuer ce titrage, 2 échantillons de 4,5 ml sont prélevés à partir de chaque flacon puis congelés à -75°C en attendant d'être titrés par la méthode du "NPPUC" (cf. § 3.4.).

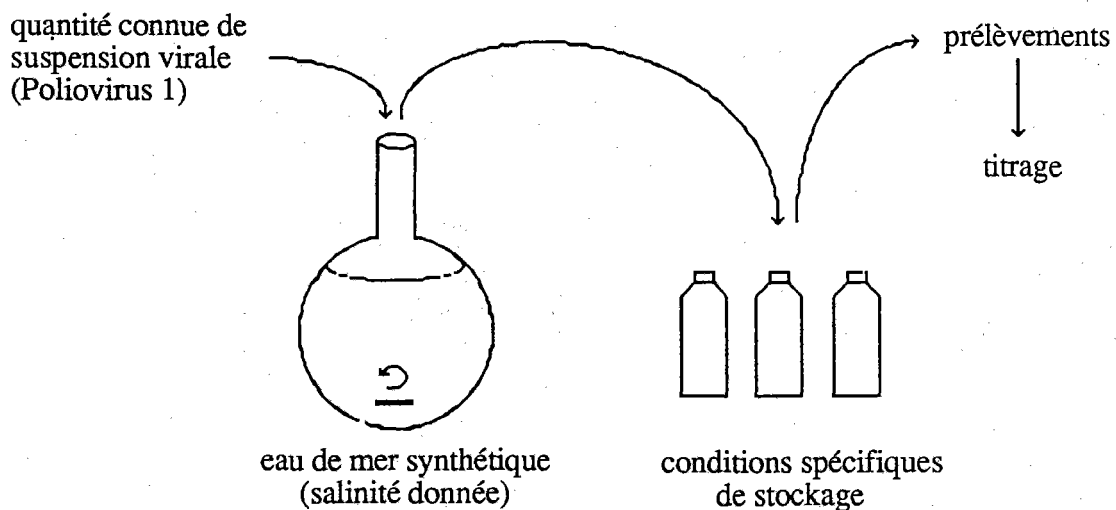


figure 6 : Schéma du protocole expérimental.

4.1. INFLUENCE DE LA TEMPERATURE.

Les différentes températures testées sont 4°C , 19°C et 25°C .

Une eau de mer synthétique est réalisée à une salinité de 24 g/l et le protocole précédemment décrit est suivi. Ainsi, 8 l d'eau de mer stérile sont inoculés avec 59 ml de suspension virale de titre connu. L'eau de mer est ensuite répartie dans 77 flacons.

Après tirage au sort de 2 flacons servant à déterminer la concentration virale initiale, les 75 flacons restants sont placés aux différentes températures testées, à l'abri de la lumière, et ce à raison de 25 flacons pour chaque température testée.

Des échantillons sont prélevés tous les 7 jours en ce qui concerne les flacons placés à 4°C , tous les 3 ou 4 jours pour ceux placés à 19°C et 25°C puis titrés.

4.2. INFLUENCE DE LA SALINITE.

Les différentes salinités testées sont **14 g/l, 24 g/l et 33 g/l.**

Le protocole décrit en 4.1. est suivi pour chaque salinité testée. Ainsi, pour une salinité donnée, 3 l d'eau de mer stérile contaminés par 17 ml de suspension virale de titre connu puis répartis dans 27 flacons.

Deux flacons servent à déterminer la concentration virale initiale et les autres sont placés à 25 °C, à l'abri de la lumière.

Des prélèvements sont effectués pour le titrage, tous les 7 jours en ce qui concerne les flacons réalisés avec une eau de mer à 14 g/l, tous les 3 ou 4 jours pour les autres salinités. Les échantillons sont ensuite titrés.

4.3. INFLUENCE DE LA LUMIERE.

Le facteur testé étant la lumière, les échantillons sont placés soit sous une **lumière artificielle**, soit à **l'obscurité**.

Selon le protocole décrit en 4.1., 3 l d'eau de mer stérile sont réalisés à une salinité de 33 g/l et inoculés par 17 ml de suspension virale de titre connu.

L'eau de mer est répartie dans 26 flacons, dont 2 servent à déterminer la concentration virale initiale. Parmi les 24 flacons restants, 12 sont tirés au sort et placés à l'abri de la lumière à 19°C. Les 12 autres sont également placés à 19°C mais sont exposés 24h/24h à une lumière artificielle (cf. § 3.6.).

Des échantillons sont prélevés tous les 3 ou 4 jours et ensuite titrés.

4.4. INFLUENCE DU RAYONNEMENT ULTRA-VIOLET.

Les doses germicides testées sont **8,5 mW.s/cm² et 42 mW.s/cm².**

Le protocole consiste à contaminer 3 litres d'eau de mer stérile à 24 g/l avec 0,4 ml d'une suspension de Poliovirus de titre connu puis à introduire cette eau dans le pilote de désinfection.

La pompe est alors mise en fonctionnement pendant 15 minutes sans que la lampe UV ne soit branchée afin d'homogénéiser l'eau de mer contaminée.

Un échantillon de 20 ml est ensuite prélevé. Il est utilisé pour déterminer la concentration virale initiale.

La lampe UV est ensuite branchée. Des échantillons sont prélevés après différents temps de séjour correspondant à différents nombres de passage de l'eau dans le circuit. Ces échantillons sont congelés puis titrés par la méthode du "NPPUC".

La température de l'eau de mer varie de 4°C en début d'expérience à 15°C en fin d'expérience.

5. RESULTATS.

Dans un premier temps sont indiqués les résultats concernant le Poliovirus de type 1 et dans un deuxième temps sont rapportés ceux concernant le virus de l'hépatite A.

5.1. Poliovirus de type 1

Les résultats des différentes expériences sont présentés sous forme graphique. Les points constituant ces graphiques représentent la moyenne des résultats de deux titrages réalisés selon la méthode du "NPP". Ils sont encadrés d'intervalles de confiance à 95%.

5.1.1. Influence de la température

La température est relevée lors de chaque prélèvement. Nous avons ainsi constaté au cours des expérimentations des températures de $+4,4^{\circ}\text{C} \pm 0,7$ (valeur moyenne \pm écart-type), de $18,8^{\circ}\text{C} \pm 1,0$ et de $24,5^{\circ}\text{C} \pm 1,6$. Pour des raisons de commodité, nous parlerons de 4°C , 19°C et 25°C . Le pH de l'eau de mer, mesuré après préparation de celle-ci, est de 8,5.

Les résultats de cette expérience sont présentés sur les figures 7a, 7b, 7c.

Pour l'expérience menée à 4°C , le titre viral initial est de $2,1 \cdot 10^5$ NPPUC/ml et il est encore de $1,9 \cdot 10^5$ NPPUC/ml après 153 jours.

Lors des expériences menées à 19°C et à 25°C , le titre passe respectivement de $2,1 \cdot 10^5$ NPPUC/ml à $1,8 \cdot 10^4$ NPPUC/ml et de $2,1 \cdot 10^5$ NPPUC/ml à 43 NPPUC/ml et ce en 83 jours.

Des courbes de régression et leur coefficient de corrélation ont été calculés pour les trois expériences. Ces coefficients, calculés à partir de 20, 21 et 24 points expérimentaux, sont respectivement de 0,61, 0,91 et 0,93 pour 4°C , 19°C et 25°C . Par comparaison aux valeurs théoriques, il apparaît que ces coefficients sont significatifs au seuil de 1% (cf. § 3.5.). Ainsi, les régressions sont applicables à nos résultats expérimentaux et permettent de calculer les T90 et T99 qui sont reportés dans le tableau 1.

tableau 1 : Evolution des T90 et T99 en fonction de la température dans une eau de mer stérile à 24 g/l à l'abri de la lumière.

	4°C	19°C	25°C
T90 (jours) (intervalle de confiance)	731,3 (608,8 - 853,84)	70 (57,1 - 82,9)	32,4 (28,2 - 36,6)
T99 (jours) (intervalle de confiance)	1450,9 (1328,4 - 1578,4)	145,8 (132,9 - 158,7)	57 (52,8 - 61,2)
équation de la régression	$y=221904e^{(-0,003x)}$	$y=179385e^{(-0,03x)}$	$y=442071e^{(-0,09x)}$

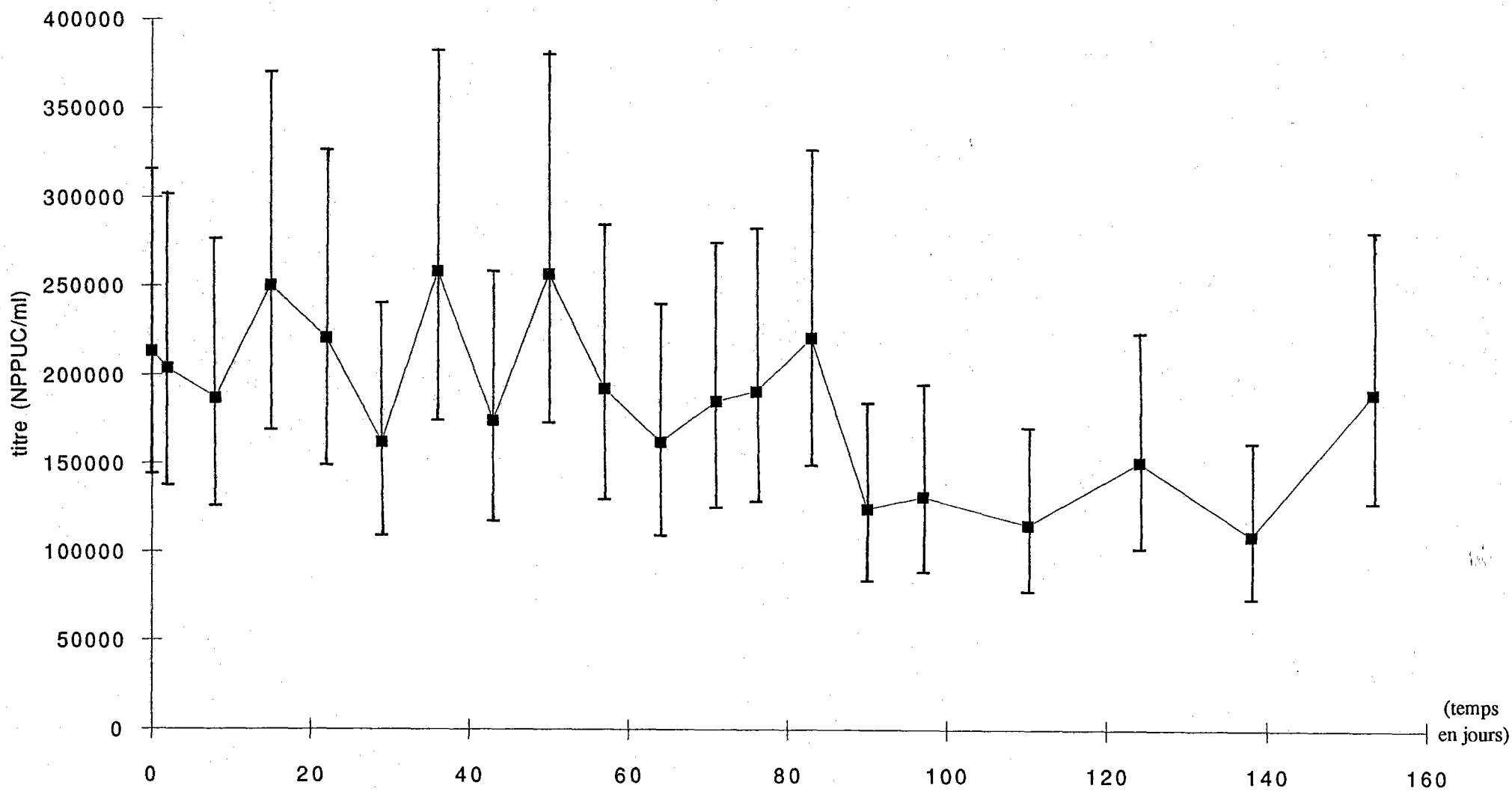


figure 7a : Evolution du titre viral à +4°C, en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité

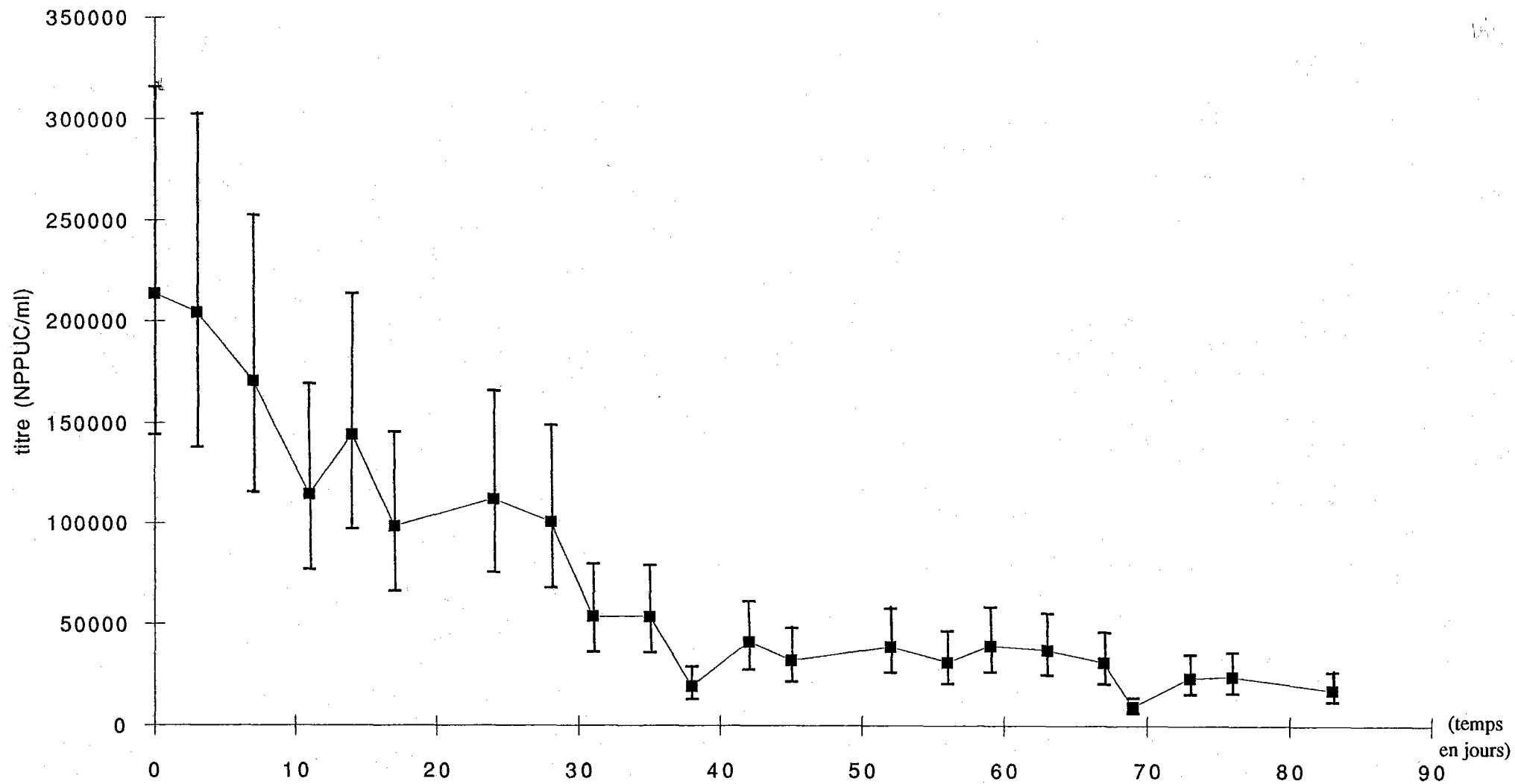


figure 7b : Evolution du titre viral à +19°C, en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité

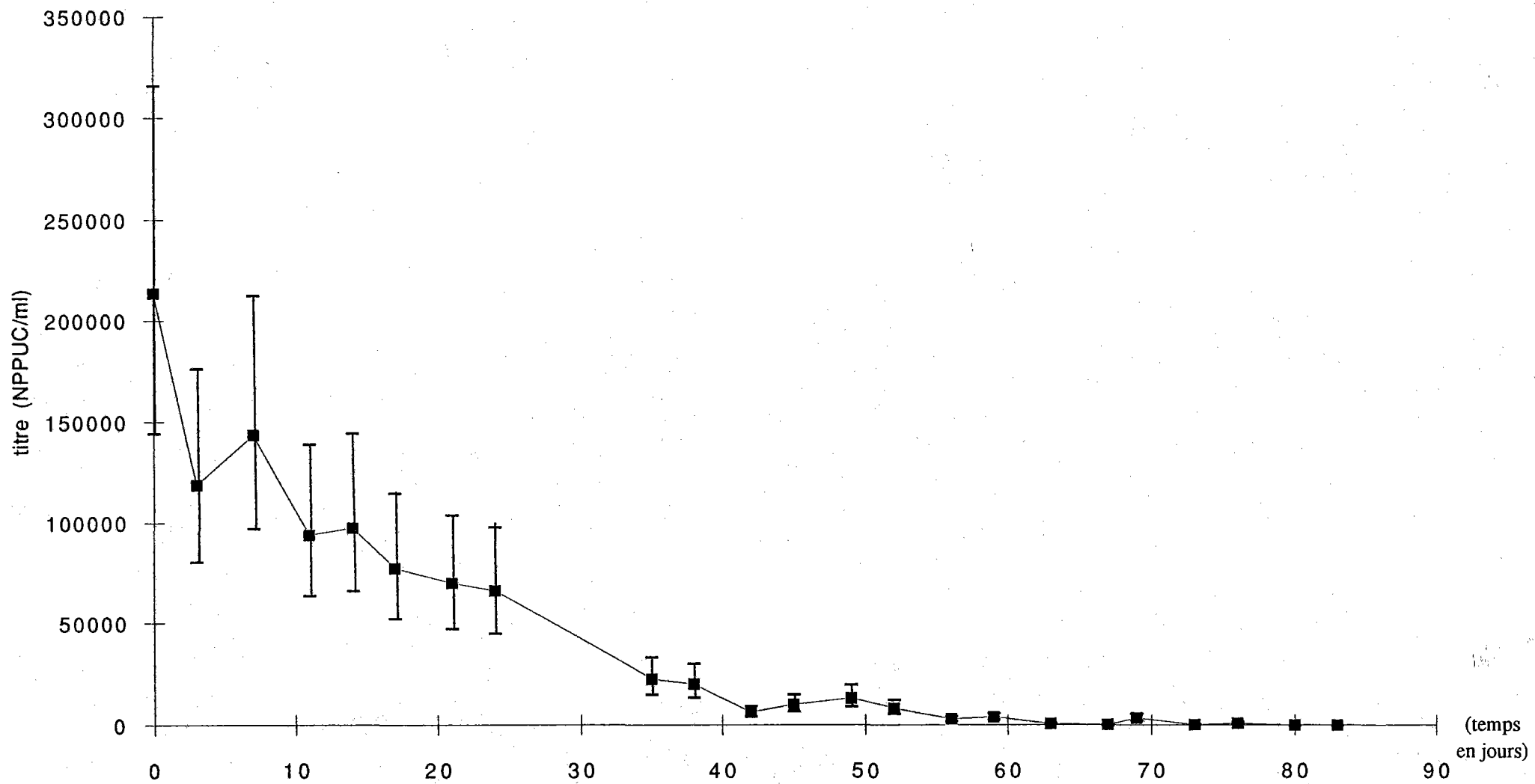


figure 7c : Evolution du titre viral à +25°C, en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité

5.1.2. Influence de la salinité

Les salinités réelles mesurées lors de la préparation de l'eau de mer sont de $13,9 \text{ g/l} \pm 1,3$, $24,5 \text{ g/l} \pm 1,3$ et $33,5 \text{ g/l} \pm 1,3$. Pour des raisons pratiques, nous parlerons de 14 g/l , 24 g/l et 33 g/l . Le pH de l'eau est égal à $8,5$.

Les résultats de ces expériences sont présentés sur les figures 8a, 8b, 8c.

Lors de l'expérience réalisée avec une salinité de 14 g/l , le titre viral varie de $5,1 \cdot 10^4$ NPPUC/ml à 176 NPPUC/ml en 77 jours. Pour une salinité de 24 g/l , la variation se fait entre $6 \cdot 10^4$ NPPUC/ml et 77 NPPUC/ml en 80 jours. Enfin, pour une salinité de 33 g/l , le titre viral diminue de $7,6 \cdot 10^4$ NPPUC/ml à 20 NPPUC/ml en 99 jours.

Les courbes de régression et leur coefficient de corrélation ont été calculés à partir de 13, 19 et 15 valeurs expérimentales respectivement pour 14 g/l , 24 g/l et 33 g/l . Les coefficients obtenus sont égaux à $0,96$, $0,90$ et $0,96$. Par comparaison aux valeurs théoriques (cf. § 3.5.), il apparaît qu'ils sont tous trois significatifs au seuil de 1% . Les courbes de régression peuvent donc être utilisées pour déterminer les T90 et T99. Ceux-ci sont reportés dans le tableau 2.

tableau 2 : Evolution des T90 et T99 en fonction de la salinité dans une eau de mer stérile à 25°C et à l'abri de la lumière.

	14 g/l	24 g/l	33 g/l
T90 (jours) (intervalle de confiance)	27,8 (22,7 - 32,8)	25,4 (20,5 - 30,2)	18,6 (15,3 - 21,9)
T99 (jours) (intervalle de confiance)	57,5 (52,4 - 62,5)	54 (49,1 - 58,8)	37,8 (34,6 - 41,1)
équation de la régression	$y=44006e^{(-0,08x)}$	$y=46289e^{(-0,08x)}$	$y=70448e^{(-0,12x)}$

5.1.3. Influence de la lumière artificielle

Les résultats expérimentaux sont présentés sur les figures 9a, 9b.

Sous l'influence de la lumière et à 19°C , le titre viral chute de $5,8 \cdot 10^4$ NPPUC/ml à $3,1 \cdot 10^3$ NPPUC/ml en 42 jours alors qu'à l'obscurité il passe de $5,8 \cdot 10^4$ NPPUC/ml à $5,4 \cdot 10^3$ NPPUC/ml durant la même période de temps.

Les courbes de régression ont été calculées à partir de 13 et de 12 valeurs expérimentales. Les coefficients de corrélation sont respectivement de $0,95$ et $0,98$ pour les expériences menées sous lumière artificielle et à l'obscurité. Par comparaison avec les coefficients de corrélation théoriques (cf. §3.5.), il apparaît que ces deux coefficients expérimentaux sont significatifs au seuil de 1% et donc que les équations des courbes de régression sont applicables à nos résultats. Les T90 et T99 présentés dans le tableau 3 ont donc été calculés.

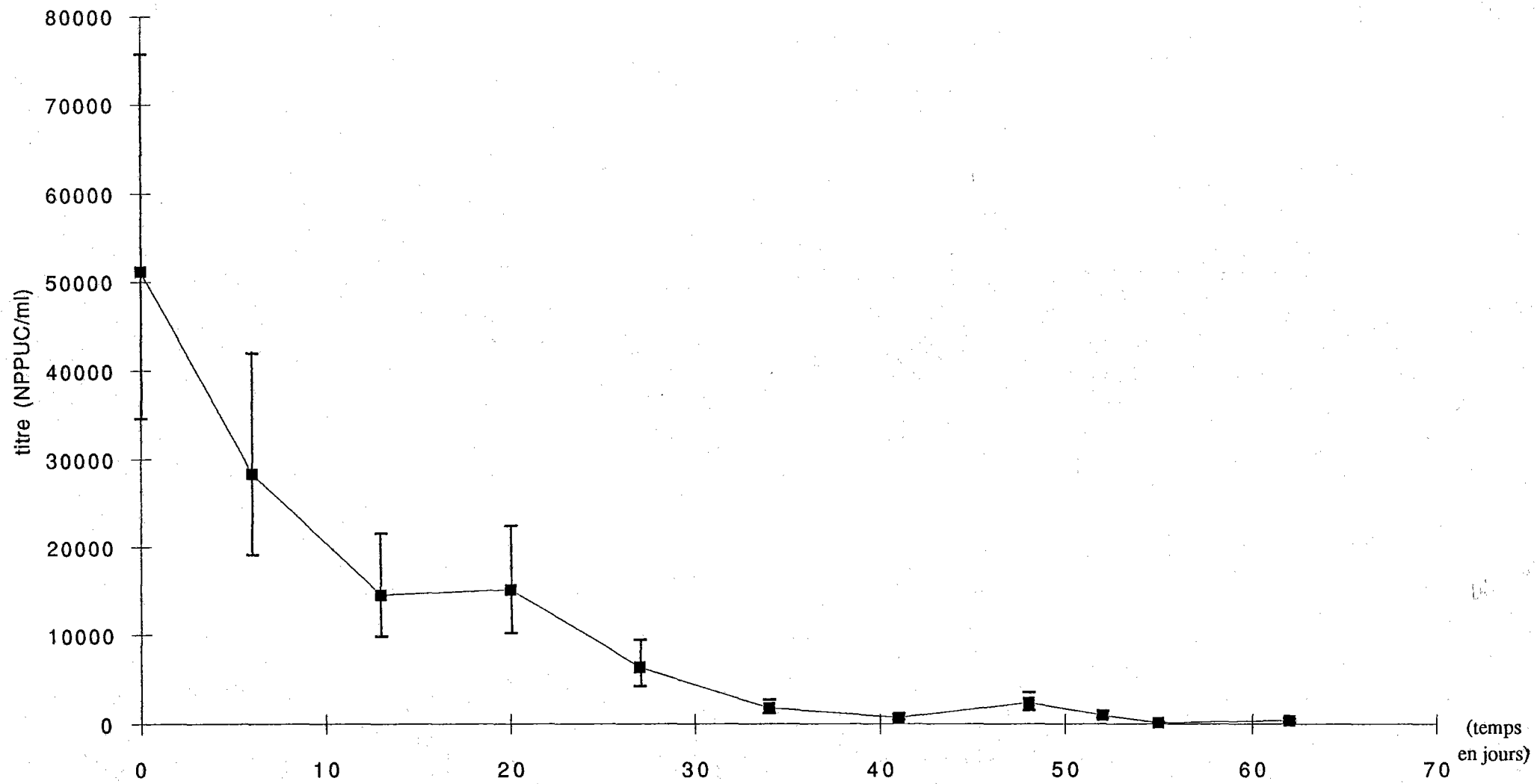


figure 8a : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C et à l'obscurité : Salinité 14 g/l

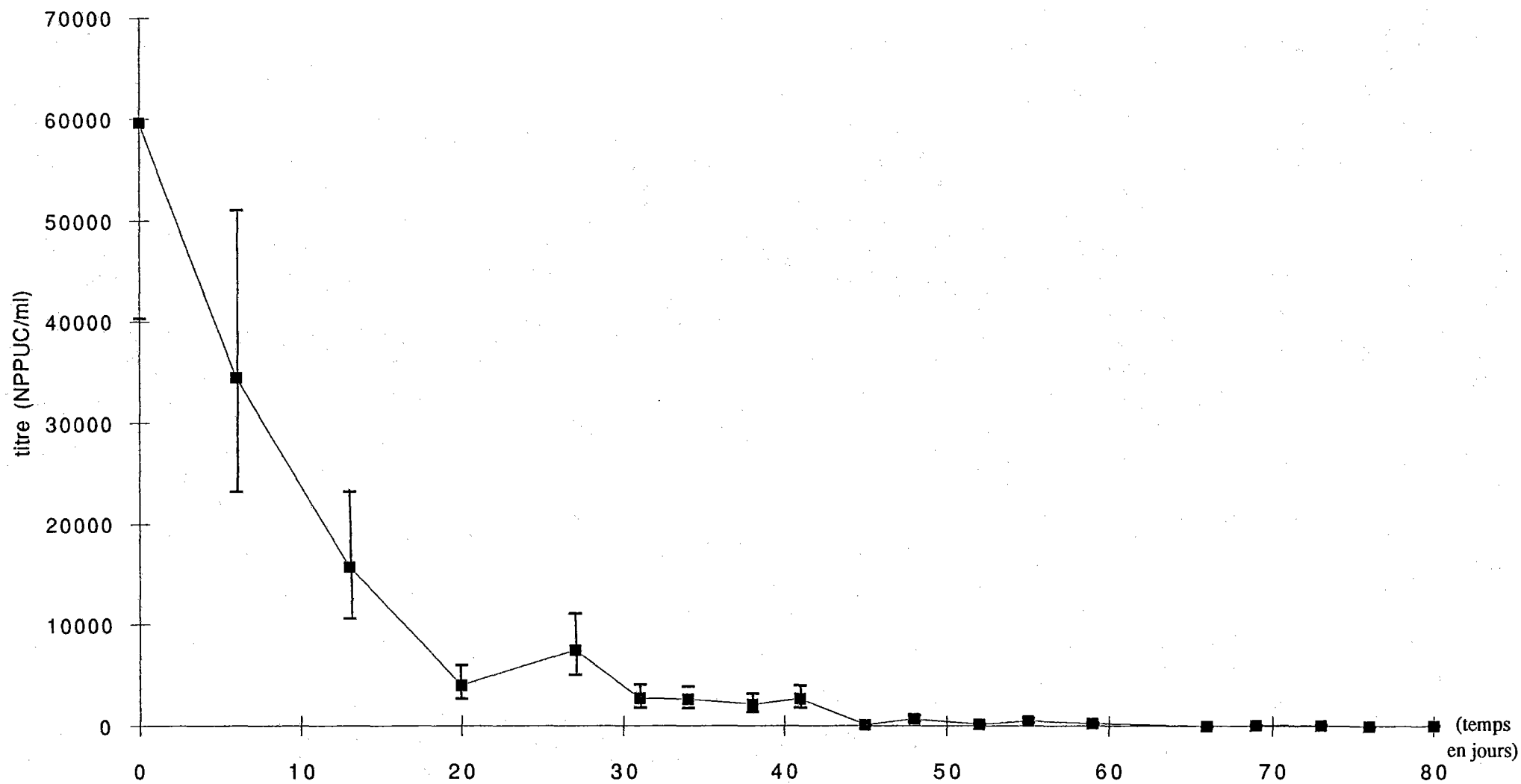


figure 8b : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C et à l'obscurité : Salinité 24 g/l

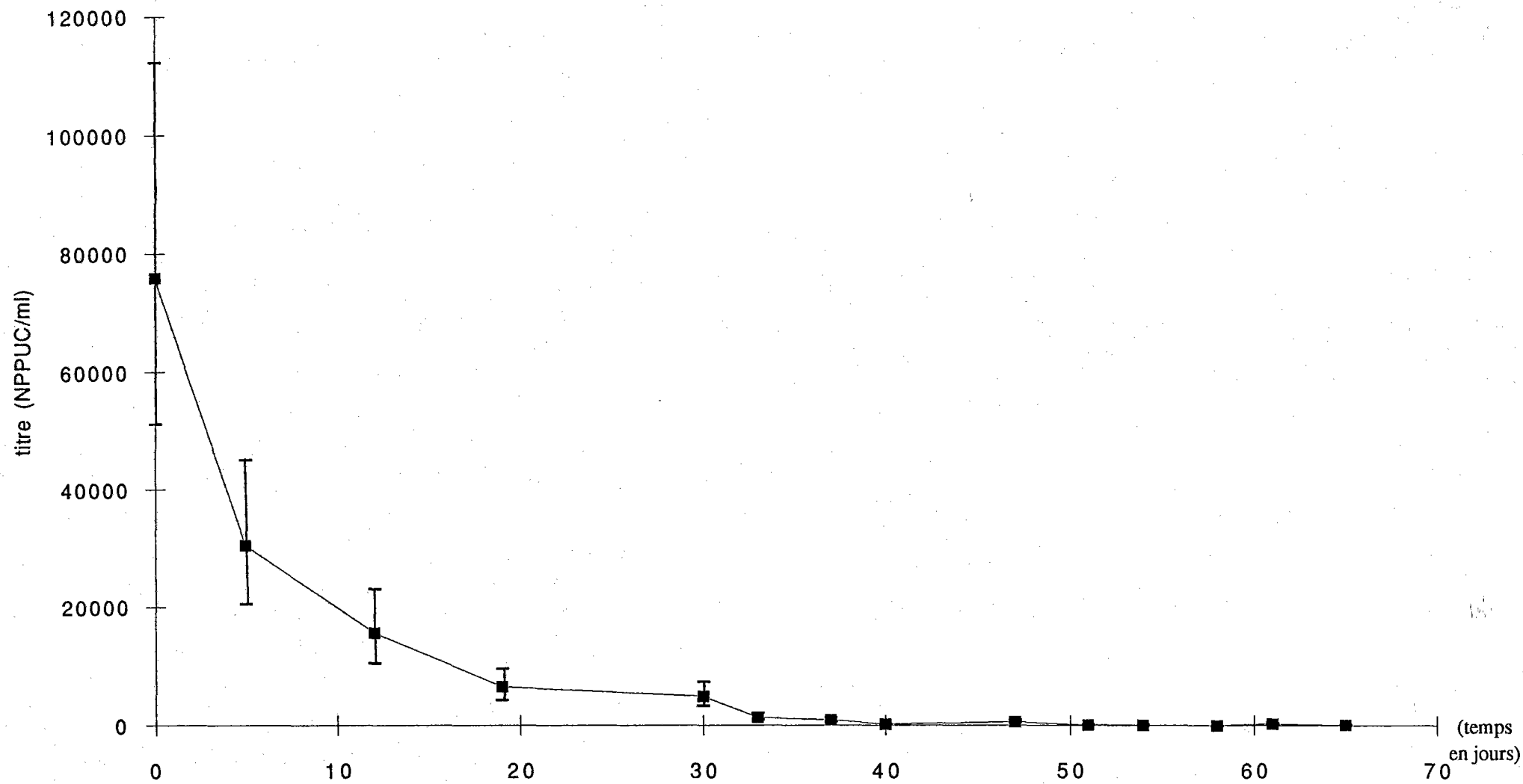


figure 8c : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C et à l'obscurité : Salinité 33 g/l

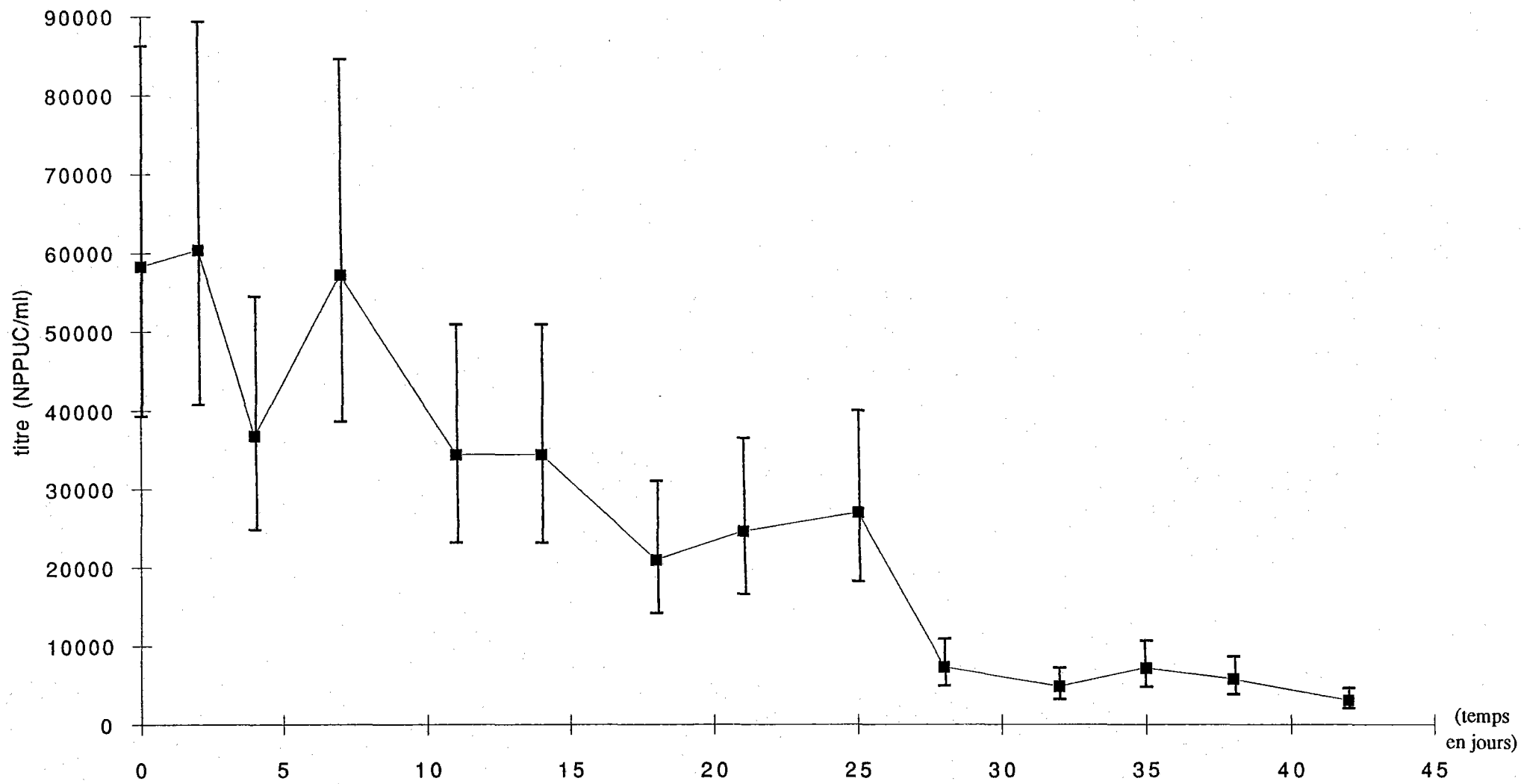


figure 9a : Evolution du titre viral en présence de lumière, en eau de mer stérile à 19°C et à 33 g/l

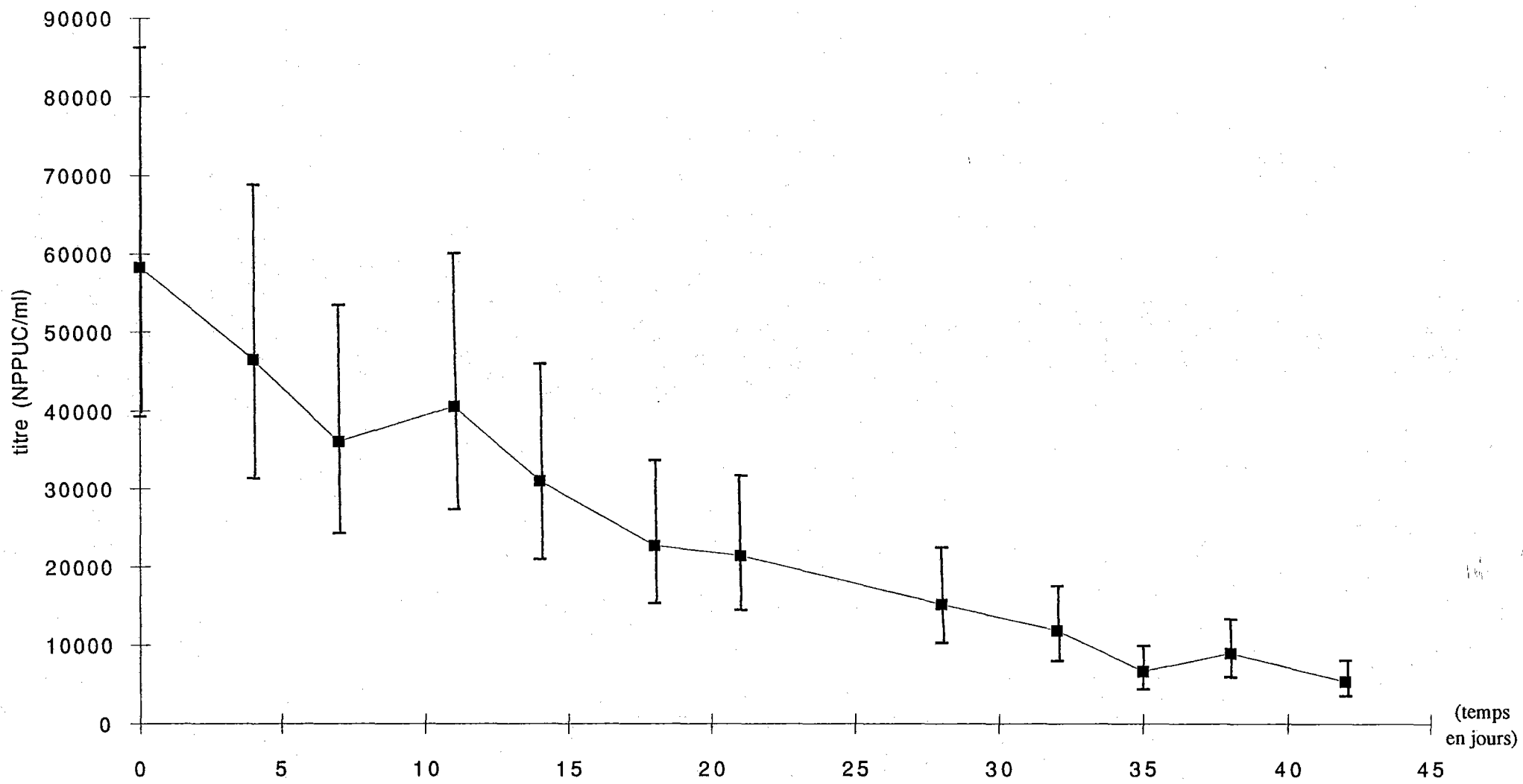


figure 9b : Evolution du titre viral à l'obscurité, en eau de mer stérile à 19°C et à 33 g/l

tableau 3 : Evolution des T90 et des T99 en fonction de la lumière, en eau de mer stérile à 19°C et à 33 g/l.

	<i>lumière</i>	<i>obscurité</i>
T90 (jours) (intervalle de confiance)	35,5 (29,9 - 41)	43,1 (36 - 50,3)
T99 (jours) (intervalle de confiance)	68,1 (62,6 - 73,7)	85,2 (78 - 92,3)
équation de la régression	$y = 66455 e^{-0,07 x}$	$y = 61973 e^{-0,05 x}$

5.1.4. Influence du rayonnement ultra-violet

La température de l'eau de mer varie de 4°C en début d'expérience à 15°C en fin d'expérience. Le pH est de 8,5.

Les résultats de deux expériences réalisées en duplicat sont présentés sur les figures 10a et 10b. Ils ne sont pas accompagnés d'intervalle de confiance de façon à ne pas surcharger le graphique.

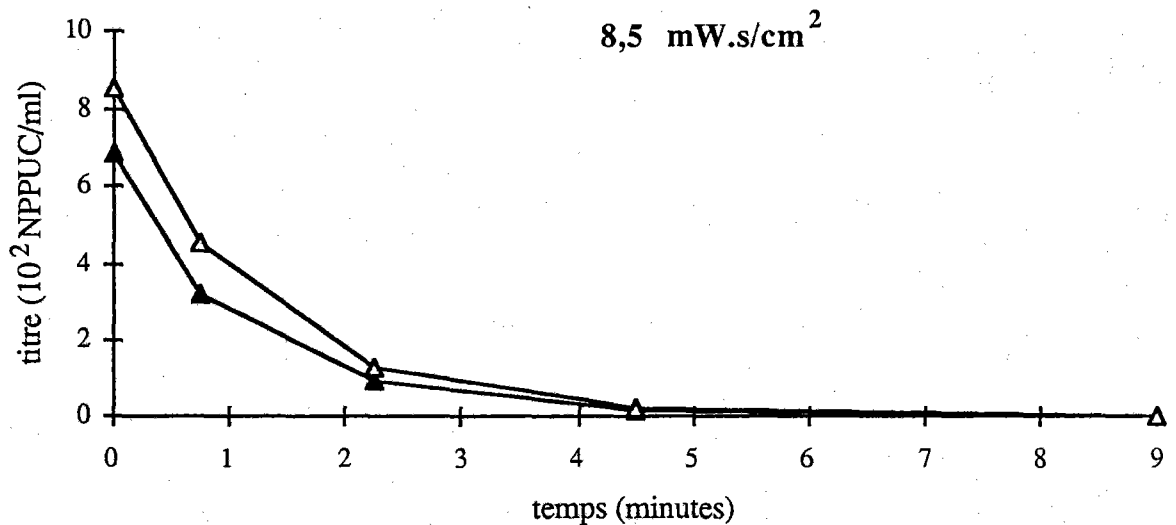


figure 10a : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 24 g/l, à 19°C sous des doses germicides de 8,5mW.s/cm².

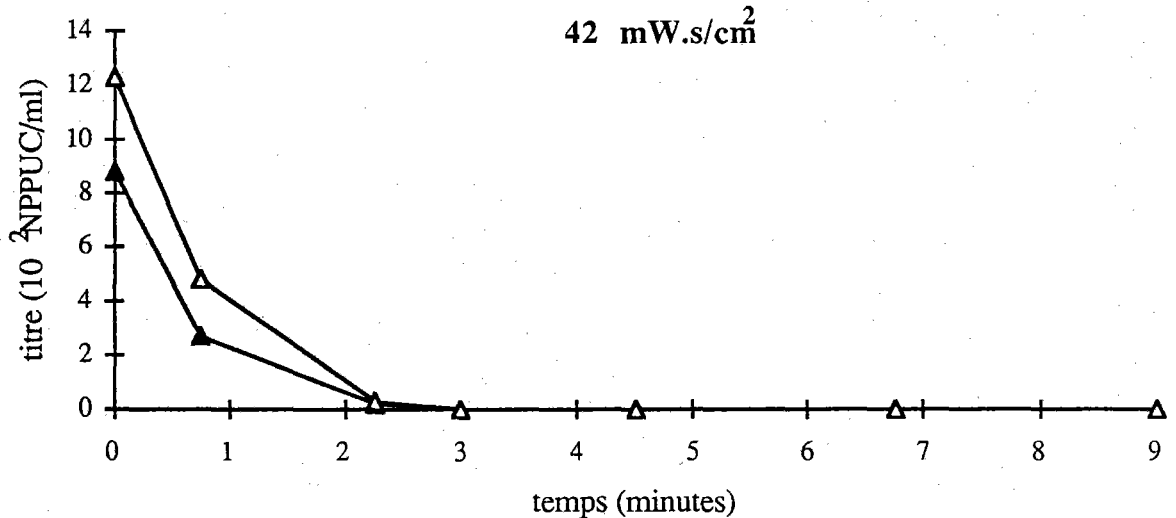


figure 10b : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 24 g/l, à 19°C sous des doses germicides de 42 mW.s/cm^2 .

Pour une dose de $8,5 \text{ mW.s/cm}^2$, le titre viral subit une variation de 686 NPPUC/ml à 0 NPPUC/ml dans un cas et de 859 NPPUC/ml à 0 dans l'autre et ce au bout de 9 minutes. Pour une dose de 42 mW.s/cm^2 , le titre diminue de 1232 NPPUC/ml à 0 NPPUC/ml lors de la première expérience et de 883 NPPUC/ml à 0 NPPUC/ml lors de la seconde et ce en 4 minutes et 30 secondes.

Les courbes de régression ont été calculées sur une période de temps de 4 minutes et 30 secondes. En effet, l'étape de linéarisation qui permet d'aboutir aux coefficients de l'équation exponentielle tient compte du logarithme népérien des valeurs expérimentales. Les valeurs nulles obtenues pour des temps supérieurs à 4 minutes et 30 secondes ne sont donc pas utilisables.

Les coefficients de corrélation pour $8,5 \text{ mW.s/cm}^2$ et pour 42 mW.s/cm^2 sont calculés à partir de 4 valeurs expérimentales.

Ils sont égaux à 0,99 et apparaissent significatifs au seuil de 1% après comparaison aux valeurs théoriques.

Les régressions sont donc utilisées pour déterminer les T90 et T99 qui sont reportés dans le tableau 4.

tableau 4 : Evolution des T90 et T99 sous l'influence des rayons ultra-violet dans une eau de mer stérile à 24 g/l et à 19°C.

	$8,5 \text{ mW.s/cm}^2$		42 mW.s/cm^2	
T90 (min) (intervalle de confiance)	2,6 (2,15 - 3,05)	2,77 (2,29 - 3,24)	1,54 (1,28 - 1,79)	1,36 (1,03 - 1,58)
T99 (min) (intervalle de confiance)	5,25 (4,80 - 5,70)	5,54 (5,07 - 6,01)	3,03 (2,78 - 3,29)	2,67 (2,44 - 2,89)
équation de la régression	$y=657e(-0,87x)$	$y=853e(-0,83x)$	$y=960e(-1,76x)$	$y=1309e(-1,54x)$

Le titre viral initial étant différent lors de chaque manipulation, il est difficile de comparer les résultats entre-eux. C'est pourquoi nous avons transformé les données en pourcentages afin de pouvoir comparer l'évolution du titre lorsque l'une ou l'autre lampe est en fonctionnement. La représentation graphique en est donnée sur la figure 11.

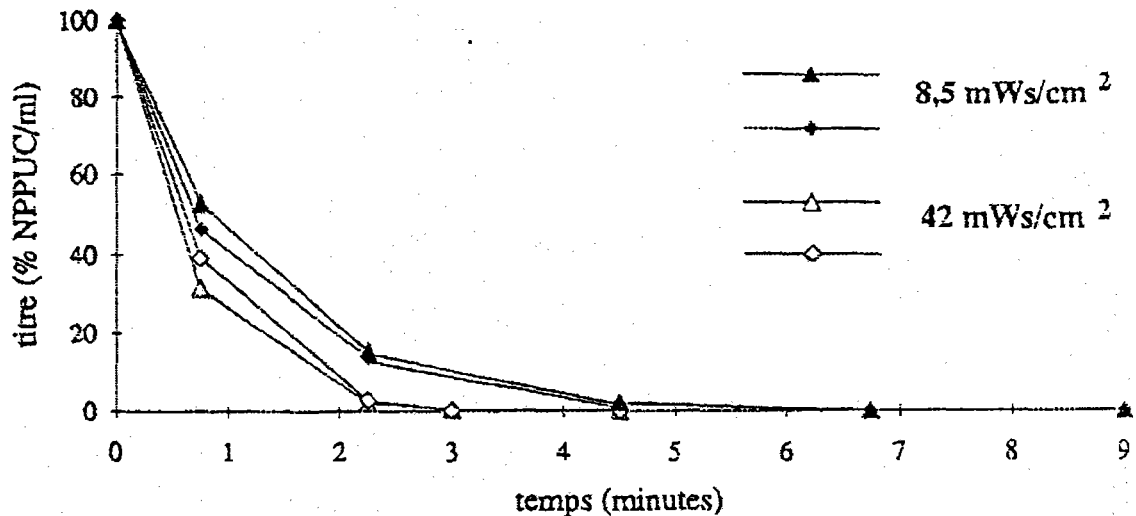


figure 11 : Evolution comparée du titre viral sous l'influence des rayons ultra-violet dans une eau à 24 g/l et à 19°C.

Le titre viral chute de 100% à 0% en 9 minutes lors des deux expériences réalisées avec une dose de 8,5 mW.s/cm² et en 4 minutes et 30 secondes lors des deux expériences réalisées avec une dose de 42 mW.s/cm².

De façon à déterminer si l'inactivation virale est uniquement provoquée par l'action des ultra-violet ou si d'autres facteurs ont une influence, nous avons déterminé une courbe théorique d'inactivation. Nous avons pour cela considéré que le rayonnement ultra-violet était efficace à 100% et émis l'hypothèse que le pilote de désinfection était assimilable à un réacteur parfaitement mélangé alimenté en continu avec un débit constant.

L'équation de cette courbe théorique peut être écrite comme suit :

$$C = Co \cdot \frac{1}{e^n}$$

où C = concentration à un temps t

Co = concentration initiale

n = nombre de fois que le volume a parcouru la totalité du circuit en un temps donné

$$n = t \cdot \frac{Q}{V}$$

t : temps t (min)

Q : débit (4 l/min)

V : volume (3 l)

Nous avons alors comparé cette courbe théorique avec les courbes obtenues expérimentalement pour 8,5 mW.s/cm² et 42 mW.s/cm². Ces différentes courbes sont représentées sur les figures 12a et 12b où le titre viral est exprimé en pourcentage. Les intervalles de confiance ne sont pas reportés sur le graphique afin de ne pas surcharger celui-ci.

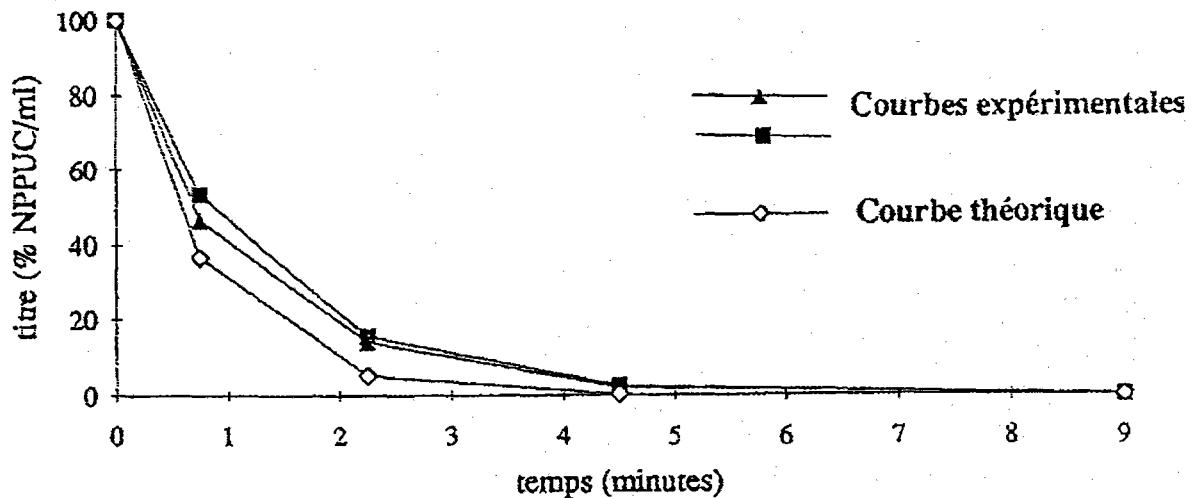


figure 12a : Evolution expérimentale et théorique du titre viral en eau de mer stérile à 24 g/l et à 19°C sous l'influence des rayonnements ultra-violet : dose germicide de 8,5 mW.s/cm².

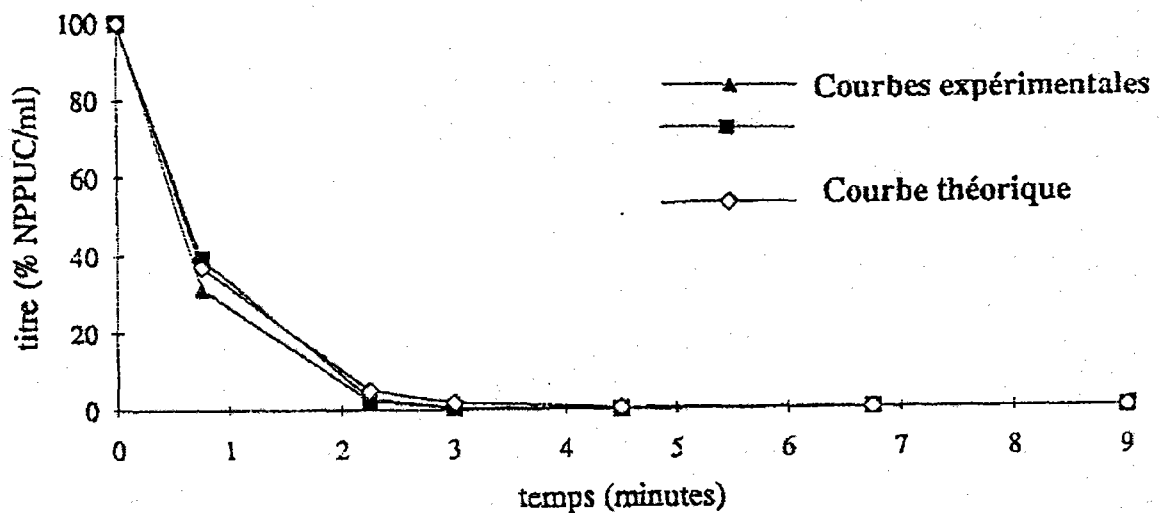


figure 12b : Evolution expérimentale et théorique du titre viral en eau de mer stérile à 24 g/l et à 19°C sous l'influence des rayonnements ultra-violet : dose germicide de 42 mW.s/cm².

Pour une dose germicide de 8,5 mW.s/cm², la chute du titre viral est moins rapide dans les conditions expérimentales qu'on ne pouvait l'envisager en observant la courbe théorique. Pour 42 mW.s/cm² par contre, les courbes expérimentales sont très proches de la courbe théorique et les valeurs de 0% sont obtenues plus rapidement qu'avec une dose de 8,5 mW.s/cm².

5.2. Virus de l'hépatite A

5.2.1. Influence de la température

VHA. Les études ont été réalisées dans les mêmes conditions que pour le poliovirus. L'évolution en fonction du temps, de l'antigène lié à l'hépatite A (Ag-VHA) mesuré par radioimmunologie, est présentée figures 13a, 13b, 13c et tableau 5. Elle ne peut être assimilée à celle du titre infectieux présentée pour le poliovirus. La stabilité de l'Ag-VHA est fonction de la température de l'eau de mer dans laquelle le VHA a été placé. Elle augmente avec l'abaissement de la température. Les courbes de régression et les coefficients de corrélation ont été calculés pour

les 3 températures. Pour 19 et 25°C, il existe une diminution significative de la quantité d'antigène détectable en fonction de la température. Par contre, à 4°C, la diminution constatée est faible et non significative pour la durée de la mesure. Le temps au bout duquel la diminution de la quantité de l'antigène détecté atteint 50 %, 90 % ou atteint le seuil de détection (P/N = 2,1) est calculé et présenté tableau 6. A 25°C et 19°C, le T50 est d'environ 40 jours, le T90 de 140 jours et le T seuil de 200 jours. A 4°C, ces temps ne peuvent être calculés pour la durée de l'expérience à cause de la grande stabilité du virus de l'hépatite A.

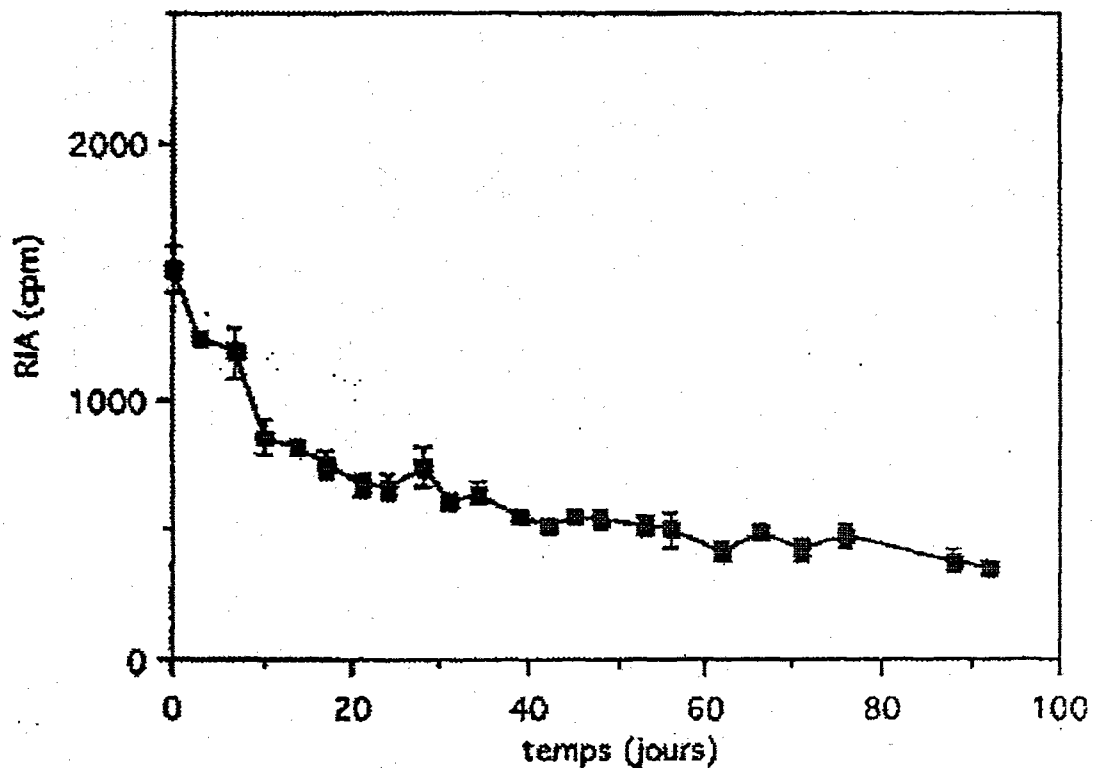


figure 13a : Evolution de l'antigène de l'hépatite A en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité à +25° C

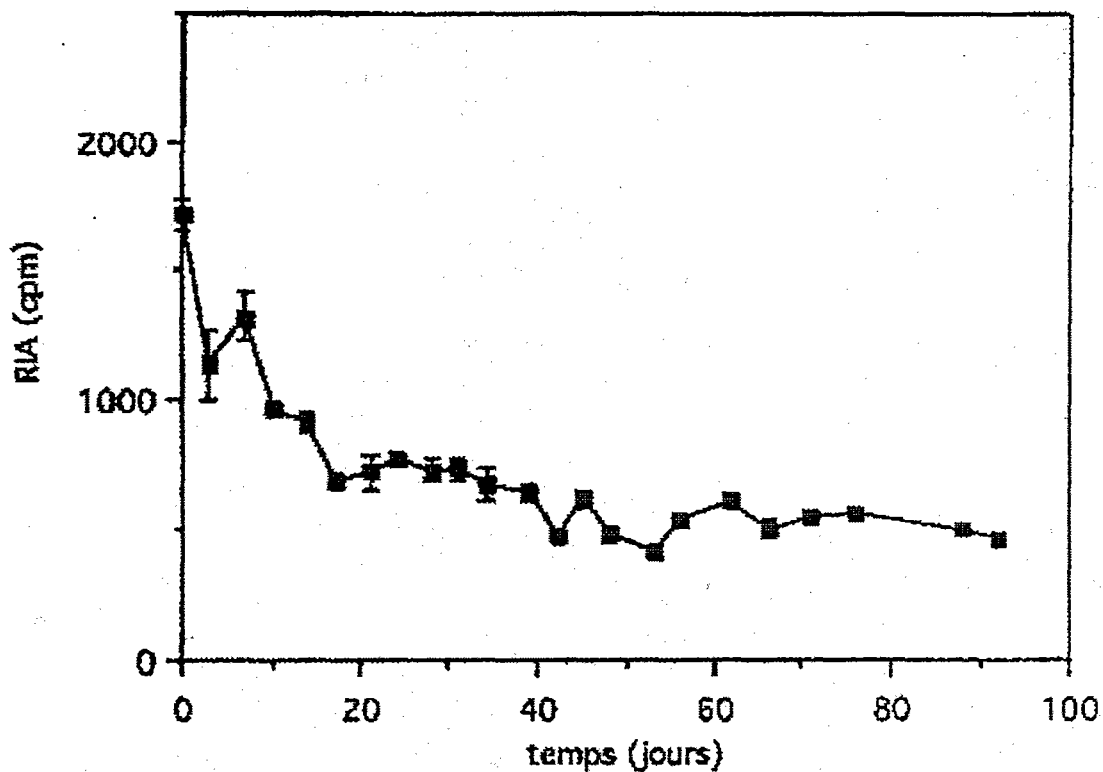


figure 13b: Evolution de l'antigène de l'hépatite A en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité à +19° C

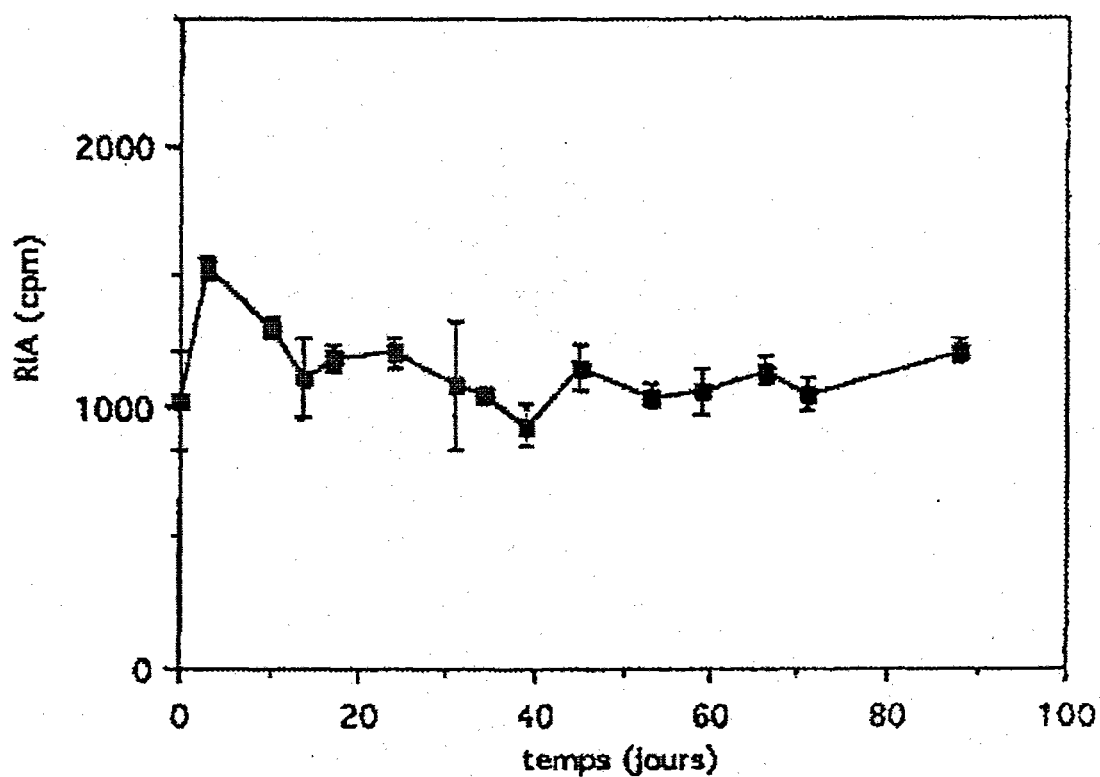


figure 13c: Evolution de l'antigène de l'hépatite A en eau de mer stérile à 24 g/l et à l'obscurité à +4° C

Tableau 5 : Détection de l'Ag-VHA, par RIA, dans une eau de mer synthétique au cours du temps, à différentes températures (1)

Moment du prélèvement (jours)	Quantité d'Ag-VHA (cpm) ⁽²⁾		
	25° C	19° C	4° C
0	1510 ± 87	1720 ± 65	1032 ± 191
3	1239 ± 26	1138 ± 133	1528 ± 42
7	1191 ± 95	1322 ± 98	NR ⁽³⁾
10	859 ± 64	965 ± 27	1302 ± 36
14	818 ± 8	911 ± 38	1114 ± 153
17	755 ± 50	692 ± 16	1190 ± 48
21	674 ± 47	724 ± 73	NR
24	669 ± 51	774 ± 21	1215 ± 55
28	739 ± 71	734 ± 44	NR
31	609 ± 28	736 ± 45	1090 ± 243
34	646 ± 45	679 ± 60	1051 ± 34
39	556 ± 22	650 ± 31	931 ± 81
42	520 ± 24	472 ± 20	NR
45	555 ± 8	622 ± 30	1155 ± 90
48	540 ± 32	487 ± 31	NR
53	518 ± 35	418 ± 10	1048 ± 48
56	501 ± 70	536 ± 24	NR
59	NR	NR	1072 ± 87
62	414 ± 35	613 ± 16	NR
66	495 ± 22	504 ± 42	1144 ± 55
69	NR	NR	NR
71	421 ± 40	548 ± 13	1054 ± 57
73	NR	NR	NR
76	474 ± 41	567 ± 11	NR
88	381 ± 47	497 ± 7	1220 ± 46
92	349 ± 27	464 ± 17	NR

(1) Salinité : 24 g/litre.

(2) Résultats exprimés en cpm. Moyenne des cpm des échantillons témoins négatifs : 18 cpm ; seuil de détection : $18 \times 2,1 = 38$.

Le nombre de cpm obtenu est directement proportionnel au titre antigénique (titre antigénique : nbre de cpm/38).

(3) NR : Non réalisé.

Tableau 6 : Evolution des T50, T90 et T seuil en fonction de la température

Réduction	Temps (jours)		
	25° C	19° C	4° C (2)
T 50	40	44	ND(3)
T 90	133	146	ND
T seuil	200	203	ND

(1) La moyenne des temps est calculée à partir de l'équation de la courbe de régression. L'équation de la courbe de régression est pour 25° C : $y = 1206 e^{-0,01726 x}$ avec un coefficient de corrélation de 0,9254 (significatif au seuil de 1 %) ; pour 18° C : $y = 1258 e^{-0,01590 x}$ avec un coefficient de corrélation de 0,8237 (significatif au seuil 1 %) ; pour 4° C : $y = 1209 e^{-0,00155 x}$ avec un coefficient de corrélation de 0,2916 (non significatif au seuil de 5 %).

(2) La valeur de y est constante entre 0 et 92 jours ($P > 0,05$).

Pas de différences significatives entre 0 et 92 jours ($P > 0,05$).

(3) ND : Non déterminé.

5.2.2. Influence de la salinité

La détection en fonction du temps de l'antigène de l'hépatite A détecté par radioimmunologie à différentes salinités est présentée figures 14a, 14b, 14c et tableau 7. Pour une température de 25° C et un pH de 8,5, la diminution de la quantité d'antigène détectable est la même quelque soit la salinité étudiée. Les courbes de régression et leur coefficient de corrélation ont été calculés pour 3 salinités. Ces derniers sont significatifs au seuil de 1 % pour la durée de la mesure. Le temps au bout duquel la diminution de la quantité d'antigène atteint 50 % (T 50), 90 % (T 90) ou atteint le seuil de détection de l'antigène ($P/N = 2,1$) est présenté tableau 8. Quelque soit la salinité étudiée, le T 50 est d'environ 50 jours, le T 90 de 165 jours et le T seuil de 270 jours.

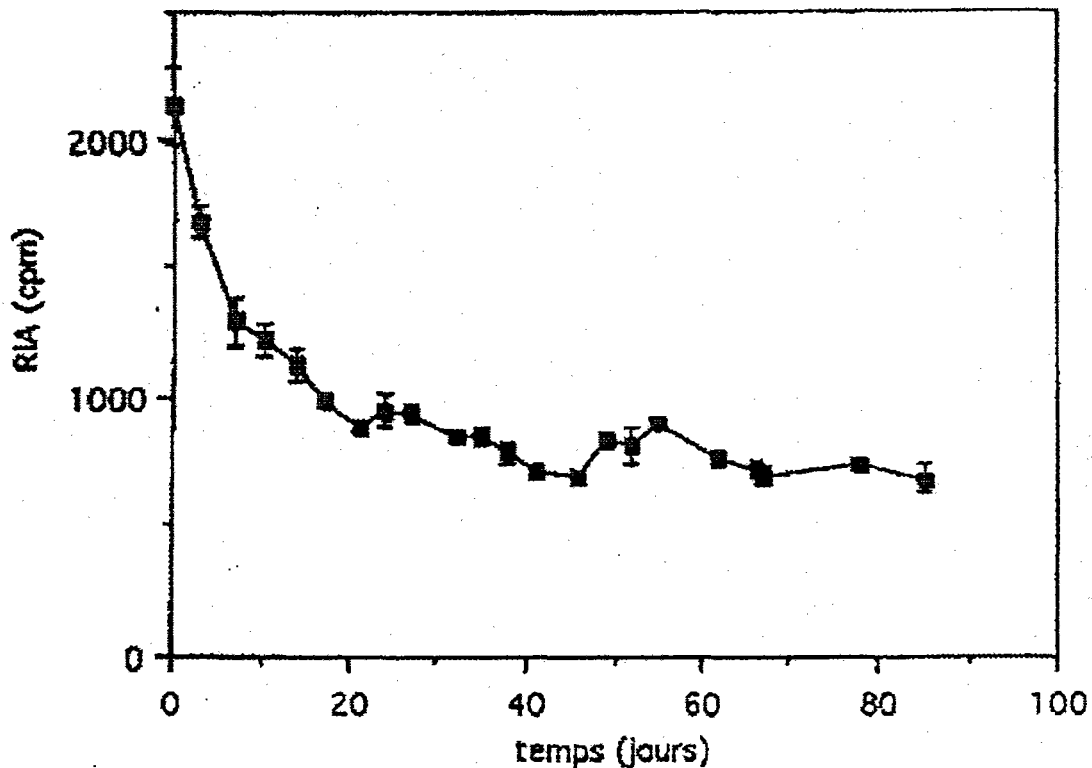


Figure 14a : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C, à l'obscurité : Salinité 33 g/l

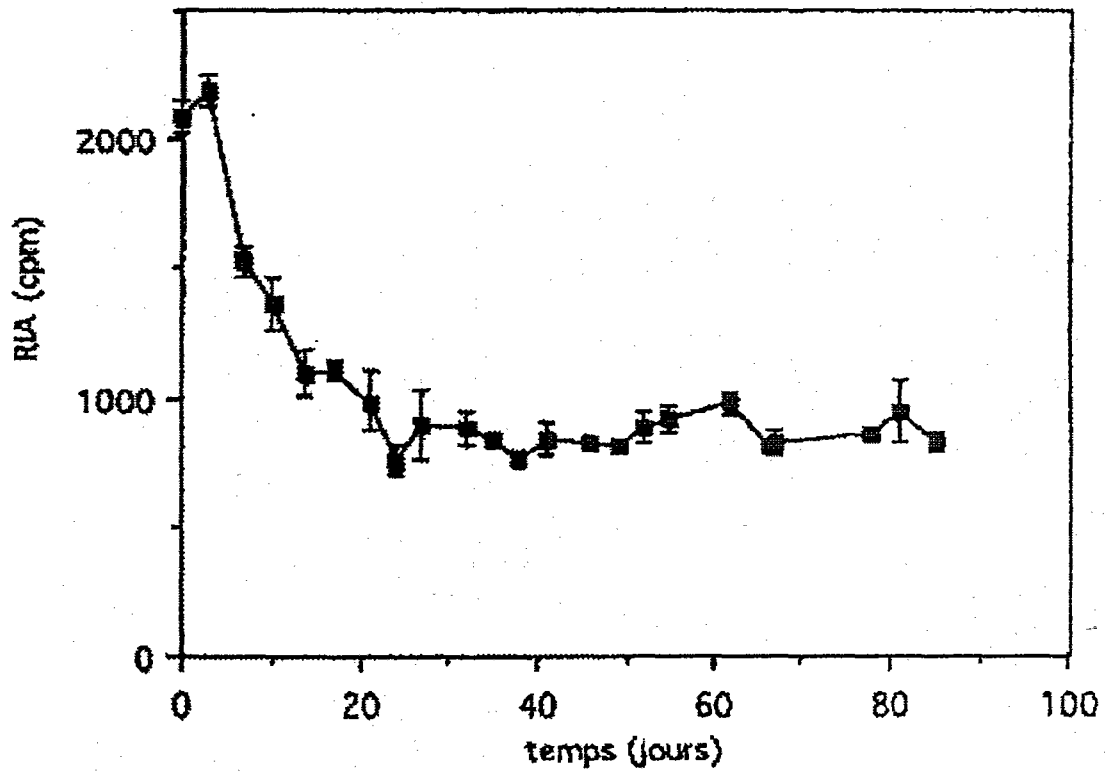


figure 14b : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C, à l'obscurité : Salinité 24 g/l

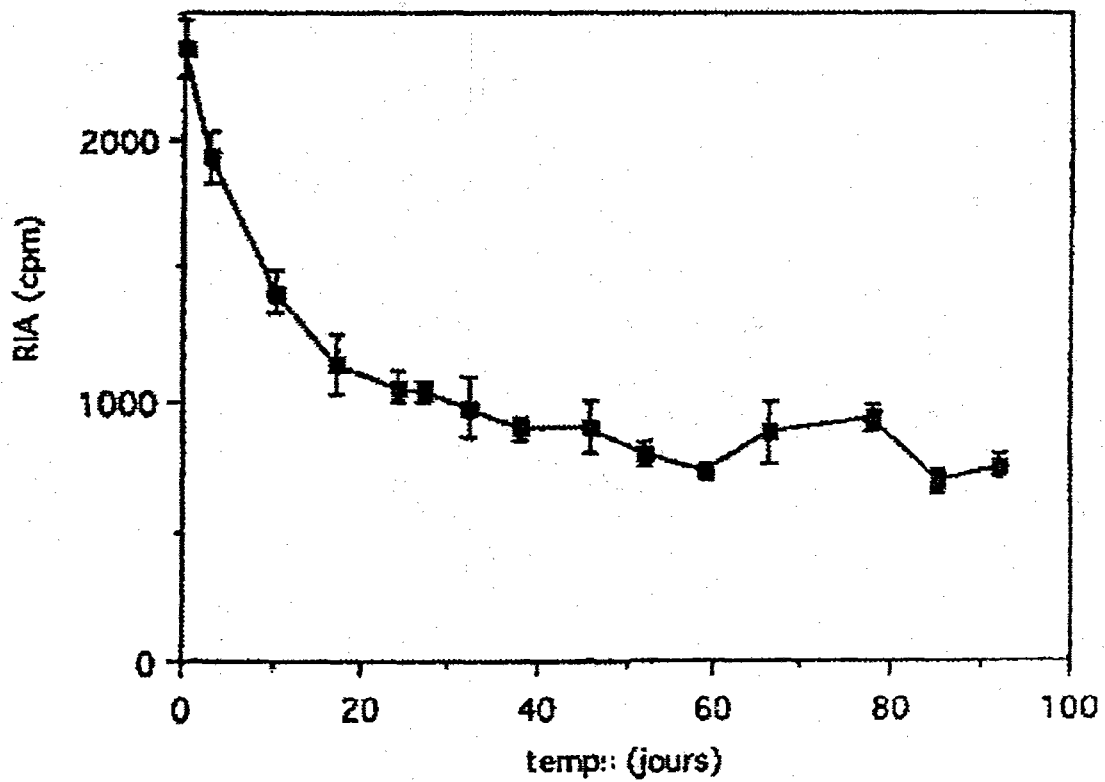


figure 14 c : Evolution du titre viral en eau de mer stérile à 25°C, à l'obscurité : Salinité 14 g/l

Tableau 7 : Détection de l'antigène du virus de l'hépatite A (Ag-VHA) par RIA, dans une eau de mer synthétique, au cours du temps, à différentes salinités (1).

Moment du prélèvement (jours)	Quantité d'Ag-VHA (cpm) (2)		
	33 g/l	24 g/l	14 g/l
0	2133 ± 156	2080 ± 66	2359 ± 110
3	1687 ± 62	2183 ± 64	1934 ± 98
7	1288 ± 97	1529 ± 55	NR(3)
10	1213 ± 62	1374 ± 100	1411 ± 85
14	1127 ± 57	1108 ± 87	NR
17	991 ± 30	1121 ± 40	1145 ± 113
21	894 ± 17	997 ± 119	NR
24	951 ± 65	759 ± 60	1059 ± 58
27	946 ± 28	902 ± 142	1045 ± 40
32	849 ± 23	887 ± 67	975 ± 114
35	855 ± 35	835 ± 23	NR
38	788 ± 42	767 ± 15	899 ± 41
41	721 ± 12	846 ± 72	NR
46	688 ± 29	823 ± 11	903 ± 103
49	840 ± 32	815 ± 12	NR
52	821 ± 76	891 ± 62	806 ± 50
55	899 ± 15	924 ± 55	NR
59	NR	NR	743 ± 10
62	765 ± 32	987 ± 40	NR
66	721 ± 26	813 ± 28	889 ± 120
67	688 ± 34	828 ± 49	NR
78	744 ± 40	862 ± 31	943 ± 54
81	NR	955 ± 122	NR
85	682 ± 56	826 ± 39	699 ± 42
92	NR	NR	759 ± 48

(1) Température : 25° C.

(2) Résultats de RIA exprimés en cpm. Moyenne des cpm des échantillons témoins négatifs : 18 cpm ; seuil de détection : $18 \times 2,1 = 38$.

Le nombre de cpm obtenu est directement proportionnel au titre antigénique.

(3) NR : Non réalisé.

Tableau 8 : Evolution des T50, T90 et T seuil en fonction de la salinité.

Réduction	Temps (jours)		
	33 g/l	24 g/l	14 g/l
T 50	49	51	48
T 90	164	168	160
T seuil	263	275	269

(1) La moyenne des temps est calculée à partir de l'équation de la courbe de régression. L'équation de la courbe de régression est pour 33 g/l : $y = 1540 e (-0,01408 x)$ avec un coefficient de corrélation de 0,8184 (significatif au seuil de 1 %) ; pour 24 g/l : $y = 1659 e (-0,01372 x)$ avec un coefficient de corrélation de 0,6971 (significatif au seuil 1 %) ; pour 14 g/l : $y = 1843 e (-0,01441 x)$ avec un coefficient de corrélation de 0,8284 (significatif au seuil de 1 %).

6. DISCUSSION.

L'objectif de ce travail était de déterminer l'influence de quatre paramètres sur la survie dans l'eau de deux virus entériques-tests : le poliovirus et le virus de l'hépatite A (HAV). Deux paramètres naturels, la température, la salinité ont été étudiés pour les 2 virus. L'influence de la lumière et l'action des ultra-violet, souvent utilisés en désinfection, notamment des coquillages, ont été envisagés pour le seul poliovirus.

Les résultats concernant l'influence de la température montrent que, dans les conditions expérimentales utilisées le devenir des virus en eau de mer est largement dépendant de la température. En effet pour le poliovirus une augmentation de température de +4°C à +25°C entraîne une chute des T90 et des T99 d'un facteur 20 environ. L'inactivation de 90% de la population virale initiale est donc 20 fois plus rapide à +25°C qu'à +4°C. Il faut aussi souligner la remarquable stabilité du virus à +4°C puisqu'à cette température, le T90 est de 731 jours alors qu'il est de 32,4 jours à +25°C.

Ces résultats rejoignent ceux obtenus par BIZIAGOS *et al* (1988) qui démontrent également un effet négatif de la température sur la persistance du poliovirus mais cette fois-ci en eau minérale. L'augmentation de température de +4°C à +23°C n'entraîne dans ce cas qu'une chute du T90 d'un facteur 6 environ, ce qui montre bien que la survie est dépendante du milieu dans laquelle elle est réalisée.

En ce qui concerne le VHA, il a été envisagé l'évolution en fonction de la température, de l'antigène lié au VHA mesuré par RIA. Cette mesure est actuellement la seule à pouvoir être appliquée d'une façon systématique pour la détection du VHA dans les échantillons de l'environnement. Les résultats obtenus ne peuvent en aucun cas être assimilés à une étude du virus infectieux. La mesure du titre infectieux en cultures cellulaires, méthode longue et délicate (plusieurs semaines de culture), actuellement en cours au laboratoire reste nécessaire pour l'étude de la survie du virus infectieux. La stabilité de l'antigène VHA apparaît nettement fonction de la température de l'eau de mer. L'antigène du VHA est extrêmement stable à +4°C puisque sur la durée de l'expérimentation aucune diminution significative de la quantité d'antigène n'a été décelée. De ce fait le T90 et même le T50 n'ont pu être déterminés. Pour les températures de 19°C et 25°C la quantité d'antigène diminue et le T90 varie respectivement de 146 à 133 jours. Il faut cependant noter que pour l'antigène du VHA il n'y a pas de différence significative entre les deux températures de 19° et 25°C, contrairement à ce qui est observé avec le poliovirus.

La salinité apparaît par contre comme un paramètre peu important. Pour le poliovirus, le passage de 14 g/l à 33 g/l provoque une diminution des T90 et des T99 d'un facteur 1,5 alors que pour l'antigène du virus de l'hépatite A, la diminution de la quantité d'antigène détectable est la même quelle que soit la salinité étudiée. Ces résultats se rapprochent ainsi de ceux trouvés par KATZENELSON (1978) pour qui la salinité n'a aucune influence sur la survie des virus.

En ce qui concerne l'influence de la lumière sur l'inactivation du poliovirus, celle-ci semble, dans notre expérimentation, inexistante. En effet, les T90 et les T99 varient seulement d'un facteur 1,2 lorsque l'expérience est réalisée à l'obscurité ou sous l'action de la lumière. Ceci est en contradiction avec l'idée généralement admise et rapportée notamment par KAPUCINSKI et MITCHELL (1983), selon laquelle la lumière constituerait un facteur défavorable aux virus.

En fait, cette faible influence de la lumière peut en partie être expliquée par le fait que, lors de nos expériences, l'eau de mer contaminée par le poliovirus se trouvait à l'intérieur de flacons en verre, matériau qui ne laisse pas passer les rayons ultra-violet.

L'action du rayonnement ultra-violet testé en pilote expérimental est en revanche extrêmement importante. En effet, les T90 et les T99 qui, pour tous les autres paramètres, sont exprimés en jours, se comptent dans le cas présent en minutes. De plus, les faibles variations obtenues pour les résultats des duplicats permettent d'avancer que cette expérience est reproductible.

La dose germicide requise pour obtenir une efficacité totale, est dans notre cas de 45 mW.s/cm². CHANG *et al* (1985) ont quant à eux déterminé que la dose nécessaire pour produire une chute de 3 log du titre du poliovirus devait être de 30 mW.s/cm².

Une étude plus poussée, prenant en compte des doses germicides plus nombreuses, devrait permettre de déterminer la dose minimale induisant une inactivation totale en un minimum de temps.

De nombreuses études ont montré que l'inactivation virale était différente selon le milieu. Il apparaît notamment une différence au niveau des temps de survie entre l'eau de mer naturelle et l'eau de mer artificielle. Ainsi, CHUNG et SOBSEY (1992) ont observé des T99 de 11 à 12 jours pour du poliovirus en eau de mer naturelle à +25°C alors que le T99 obtenu lors de notre expérience relative à la température, dans une eau de mer artificielle à 33 g/l (qui est la salinité supposée de l'eau de mer naturelle) à +25°C est de 18,6 jours.

Il semblerait donc qu'il existe dans l'eau de mer naturelle des facteurs biotiques (microorganismes, éléments particuliers, ...) ainsi que des phénomènes physico-chimiques (adsorption, ...) qui seraient responsables d'un effet inactivant vis à vis des virus et qui ne seraient pas présents dans l'eau de mer synthétique comme l'ont montré FUJIOKA *et al* (1980) et PATTI *et al* (1987).

7. CONCLUSION.

Notre travail porte sur l'étude de 4 paramètres susceptibles d'avoir une influence sur la survie des virus entériques en eau de mer artificielle et stérile. Nous avons testé :

- l'action de la température et de la salinité sur le poliovirus et l'antigène du virus de l'hépatite A,
- l'action de la lumière et du rayonnement ultra-violet sur le poliovirus.

Il a été démontré que la température avait une action antivirale prononcée lorsque celle-ci atteignait des valeurs de l'ordre de $+18^{\circ}\text{C}$ ou $+25^{\circ}\text{C}$, alors qu'à $+4^{\circ}\text{C}$ une grande stabilité du titre infectieux (Poliovirus) et du titre antigénique était constatée.

L'action de la salinité, pour les valeurs de salinité testées apparaît beaucoup plus faible (Poliovirus) voire inexistants (antigène du VHA).

Aucune action de la lumière sur le poliovirus n'a pu être mise en évidence dans les conditions expérimentales utilisées, c'est-à-dire avec une eau sous emballage en verre.

Enfin l'influence des rayons ultra-violet est fondamentale. C'est incontestablement le paramètre inactivant le plus efficace et surtout le plus rapide.

Des études ultérieures, basées sur la survie des virus en eau de mer artificielle additionnée des MES et/ou de microorganismes devraient permettre une meilleure compréhension des phénomènes inactivant constatés en eau de mer naturelle.

8. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

- BABICH H. and STOTZKY G., 1979,
Differential toxicities of mercury to bacteria and bacteriophages in seawater and in lake water,
Can. J. Microbiol., 25, 1252-1257.
- BEMISS J.A., LOGAN M.M., SAMPLE J.D. and RICHARDS G.P., 1989,
A method for the enumeration of poliovirus in selected molluscan shellfish,
J. Virol. Meth., 26, 209-218.
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J-M. and DELOINCE R., 1988,
Long-term survival of hepatitis A and poliovirus type 1 in mineral water,
Appl. Environ. Microbiol., 54, 2705-2709.
- BLOCK J.C. et SCHWARTZBROD L., 1982,
Analyse virologique des eaux,
Edit. LAVOISIER, Tec et Doc, PARIS, 170 pages.
- BLOCK J.C., 1983,
Virus in environmental waters.
in : Viral pollution of the environment, 117-146
BERG G., édit. CRC Press, BOCARATON.
- BOHER S., 1991,
Analyse virologique des huîtres et étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale,
Thèse Chimie et Microbiologie de l'eau, Université de NANCY I, 206 pages.
- BONNEFONT J.L., MARTIN Y.P. et GUIENNET B., 1990,
Etude expérimentale de la décroissance des bactéries fécales en milieu marin quantification, facteurs impliqués,
Wat. Res., 24, 267-273.
- CHAMPSAUR H., 1989,
Gastro-enterites virales,
Encycl. Med. Chir. Maladies infectieuses, 8055 a, 4, 1-13.
- CHANG J.C.H., OSSOFF S.F., LOBE D.C., DORFMAN M.H., DUMAIS C.M., QUALLS R.G., JOHNSON J.D., 1985,
UV inactivation of pathogenic and indicator microorganisms,
Appl. Environ. Microbiol., 49, 1361-1365.
- CHUNG H. and SOBSEY M.D., 1992,
Survival of F-specific coliphages, Bacteriodes fragilis phages, hepatitis A virus (HAV) and poliovirus 1 in seawater and sediment,
International Symposium Health-Related-Water-Microbiology, Washington.
- CUBBAGE C.P., GANNON J.J., COCHRAN K.W. and WILLIAMS G.W., 1979,
Loss of infectivity of poliovirus 1 in river water under simulated field conditions,
Wat. Res., 13, 1091-1099.
- DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S. and WRIGHT B.A., 1989,
Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluent in selected Puerto Rican communities,
Appl. Environ. Microbiol., 55, 503-506.
- DENIS F., BRISOU J-F et DUPUIS T., 1975,
Recherches sur l'inactivation des entérovirus dans les eaux de mer,
C. R. Acad. Sc. Paris, 281, 471-474.
- FINCH G.R. and FAIRBAIN N., 1991,
Comparative inactivation of poliovirus type 3 and MS2 coliphage in demand-free buffer by using ozone,
Appl. Environ. Microbiol., 57, 3121-3126.

- FUJIOKA R.S., LOH P.C. and LAU L.S., 1980,
Survival of human enteroviruses in the hawaiian ocean environment : evidence for virus-inactivating microorganisms,
Appl. Environ. Microbiol., 39, 1105-1110.
- FUJIOKA R.S., DOW M.A. and YONEYAMA B.S., 1986,
Comparative disinfection of indicator bacteria and poliovirus by chlorine dioxide,
Wat. Sci. Tech., 18, 125-132.
- GIRONES R, JOFFRE J and BOSCH A., 1989,
Natural inactivation of enteric viruses in seawater,
J. Environ. Qual., 18, 34-39.
- GRABOW W.O.K., GAUSS-MÜLLER V., PROZESKY O.W. and DEINHARDT F., 1983,
Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals,
Appl. Environ. Microbiol., 46, 619-624.
- HURST C.J., 1988,
Effect of environmental variables on enteric virus survival in surface freshwaters,
Wat. Sci. Tech., 20, 473-476.
- HURST C.J. and GERBA C.P., 1980,
Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water,
Appl. Environ. Microbiol., 39, 1-5.
- KAPUSCINSKI R.B. and MITCHELL R., 1983,
Sunlight-induced mortality of viruses and Escherichia coli in coastal seawater,
Environ. Sci. Technol., 17, 1-6.
- MATOSSIAN A.M. and GARABEDIAN G.A., 1967,
Virucidal action of seawater,
Am. J. Epidemiol., 85, 1-8.
- MENG Z.D., BIRCH C., HEATH R. and GUST I., 1987,
Physiochemical stability and inactivation of human and simian Rotavirus,
Appl. Environ. Microbiol., 53, 727-730.
- PATTI A.M., SANTI A.L., GABRIELI R., FIAMMA S., CAULETTI M. and PANA A., 1987,
Hepatitis A virus and Poliovirus 1 inactivation in estuarine water,
Wat. Res., 21, 1335-1338.
- PURCELL R.H., WONG D.C., MORITSUGU Y., DIENSTAG J.L., ROUTENBERG J.A., BOGGS J.D., 1976,
A microtiter solid phase radio-immunoassay for hepatitis A antigen and antibody.
J. Immunol., 116, 349-356.
- SALO R.J. and CLIVER D.O., 1976,
Effects of acid pH on the infectivity and physical integrity of enteroviruses,
Arch. Virol., 52, 269-282.
- SCHWARTZBROD J., LUCENA F., BOSCH A., BERIL C., SCHWARTZBROD L et PARES R., 1987,
Influence des eaux continentales et des eaux usées sur la contamination microbiologique des sédiments,
Journal Français d'Hydrologie, 18, 141-156.
- SCHWARTZBROD L., 1984,
Epidémiologie des maladies virales à transport hydrique,
Microbiologie. Aliments. Nutrition., 2, 217-231.
- SCHWARTZBROD L., 1991,
Virologie des milieux hydriques,
Edit. LAVOISIER, Tec et Doc, PARIS, 303 pages.
- WARD R.L., ASHLEY C.S. and MOSELEY R.H., 1976,
Heat inactivation of Poliovirus in wastewater sludge,
Appl. Environ. Microbiol., 32, 339-346.

Annexe 1 : Comparaison Instant Océan - eau de mer naturelle

Eléments	Instant Océan en mg/l	eau de mer naturelle en mg/l
chlore	19600	19000
calcium	420	400
potassium	360	380
magnésium	1400	1350
sodium	10400	10500
barium	<0,05	0,03
cadmium	<0,01	0,0001
cobalt	<0,03	0,00008
lithium	0,18	0,18
molybdène	2,2	0,1
nickel	<0,04	0,007
phosphore	0,19	0,07
plomb	<0,08	0,00003
ruthénium	0,1	0,12
antimoine	0,2	0,0003
silicone	0,34	2
étain	0,15	0,0008
strontium	7,1	8,5
vanadium	<0,04	0,002
aluminium	<0,04	0,01
cuivre	0,011	0,003
fer	0,012	0,003
manganèse	0,004	0,002
zinc	0,018	0,01

Annexe 2 : Signification d'un coefficient de corrélation
d'après GELLER S., 1983, Statistique, édit. Masson, Paris, 4e édition, p.217.

n-2	r _{0,05}	r _{0,01}	n-2	r _{0,05}	r _{0,01}
1	0,9969	0,9999	16	0,4683	0,5897
2	0,9500	0,9900	17	0,4555	0,5751
3	0,8783	0,9587	18	0,4438	0,5614
4	0,8144	0,9172	19	0,4329	0,5487
5	0,7545	0,8745	20	0,4227	0,5368
6	0,7067	0,8343	25	0,3809	0,4869
7	0,6664	0,7977	30	0,3494	0,4487
8	0,6319	0,7646	35	0,3246	0,4182
9	0,6021	0,7348	40	0,3044	0,3982
10	0,5760	0,7079	45	0,2875	0,3721
11	0,5529	0,6835	50	0,2732	0,3541
12	0,5324	0,6614	60	0,2500	0,3248
13	0,5139	0,6411	70	0,2319	0,3017
14	0,4973	0,6226	80	0,2172	0,2830
15	0,4821	0,6055	90	0,2050	0,2673
			100	0,1946	0,2540

n-2 : nombre d'échantillon - 2