

PRESES

SIONS

ET

MANCHE - MER DU NORD

IM

PACTS

PRESSIONS ET IMPACTS

MANCHE - MER DU NORD

JUIN 2012

PRESSIONS BIOLOGIQUES ET IMPACTS ASSOCIÉS

Introduction d'organismes microbiens pathogènes

Qualité microbiologique des coquillages
destinés à la consommation humaine :
contamination des coquillages par des virus

Monique Pommepuy
(Ifremer, Brest).



Les coquillages, par leur mode de nutrition, filtrent d'importantes quantités d'eau de mer et sont de ce fait susceptibles de concentrer les diverses particules, polluants et microorganismes présents dans ces eaux.

Les données concernant la contamination de l'eau et des coquillages par les virus humains sont rares. En effet, il n'existe pas de dispositif de surveillance des virus ni de critère réglementaire en France ou en Europe.

Les données utilisées ici sont issues d'études locales faisant suite à des épisodes de gastroentérites alors que les huîtres étaient incriminées (Paimpol) ou d'études ponctuelles (rade de Brest). Lorsque ces données existent, elles ne sont acquises que sur des secteurs de taille très limitée, proches du littoral, et durant de très courtes périodes (quelques mois, au mieux un an). La stratégie d'échantillonnage est adaptée à l'objet de l'étude et non à une surveillance. Enfin, nous n'avons aucune donnée sur les autres secteurs littoraux, ce qui ne préjuge en rien de l'absence de virus.

Nous tenons à souligner qu'il est impossible de généraliser l'information acquise sur les sites étudiés à d'autres sites, ni supposer que ce qui a été trouvé à une période donnée est généralisable dans le temps.

1. INTRODUCTION

1.1. RISQUE VIRAL

Les principaux virus humains susceptibles de contaminer les coquillages sont les virus nus – la présence d'une enveloppe chez un virus constituant un élément de fragilité –, capables de résister dans l'environnement, que ce soit la surface ou l'eau, donc essentiellement les virus présentant un cycle de multiplication entérique. Ces virus, excrétés dans les fèces de malades ou de porteurs sains, essentiellement responsables de gastro-entérites, sont très nombreux et appartiennent à plusieurs familles virales : les calicivirus – norovirus et sapovirus notamment –, les entérovirus, les astrovirus, les rotavirus, les adénovirus entériques, le virus Aïchi, et les virus des hépatites A et E, à transmission féco-orale [1].

Eu égard au risque pour la santé publique lié à la consommation des coquillages, un groupe de travail de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a retenu les norovirus et le virus de l'hépatite A comme étant les virus les plus importants et devant être considérés en priorité dans les mollusques bivalves. Ces espèces sont en effet régulièrement impliquées dans des gastro-entérites liées à leur consommation, plus rarement dans des hépatites A [2] [3] [4]. Chez les personnes sensibles, la dose infectieuse est très basse et serait de quelques particules virales, ce qui place ces virus parmi les micro-organismes les plus infectieux.

Les infections causées par le virus de l'hépatite A (VHA) sont peu nombreuses en Europe, les zones endémiques sont situées notamment dans les pays en voie de développement. La présence du VHA est donc rare dans les eaux usées et les rivières, et ne fait par conséquent pas l'objet de surveillance. Les données sur le VHA sont très limitées et ne permettent pas de faire un état des lieux dans le cadre de la DCSMM. En ce qui concerne les norovirus, les infections dont ils sont la cause surviennent toute l'année, avec un pic hivernal plus marqué. On dispose de quelques données localisées dans l'espace et le temps, mais comme pour le VHA, il n'existe pas de dispositif de surveillance des eaux ou des coquillages.

1.2. SOURCES DE CONTAMINATION.

Après rejet dans le milieu extérieur, les virus ne peuvent pas se multiplier, mais vont s'agréger avec d'autres virus et/ou sur la matière particulaire. Cette adsorption, couplée à leurs propriétés physico-chimiques, va leur permettre de persister dans les rejets et de résister aux procédés de traitement des eaux ainsi qu'aux agents de désinfection. Il n'est donc pas surprenant que les rejets de station d'épuration déversent dans l'environnement des quantités importantes de particules virales. Les coquillages peuvent concentrer les virus et ces derniers peuvent y persister plusieurs mois.

1.3. IMPACTS

Le VHA provoque un syndrome pseudo-grippal, des troubles digestifs tels que nausées et douleurs abdominales, et un ictère. L'hépatite fulminante est une complication possible. Le taux de décès est de 0,2 à 0,4 % des cas symptomatiques, et passe à 2 % après 40 ans. La durée des symptômes est de 2 mois. L'incubation est de 30 jours en moyenne, et l'excrétion virale peut durer jusqu'à 1 mois après le début des signes cliniques. Il existe une proportion importante de porteurs asymptomatiques : 80 à 90 % chez les enfants de moins de 5 ans, et 20 à 30 % chez les adultes.

Les norovirus provoquent, quant à eux, des gastro-entérites chez les personnes de tout âge. Les symptômes, relativement mineurs, se caractérisent par le déclenchement soudain d'un ou plusieurs épisodes de vomissements violents, puis par une diarrhée persistant pendant quelques jours. La période d'incubation est relativement brève – 12 à 72 h, mais atteint souvent 24 h –, et les signes cliniques persistent pendant environ deux à quatre jours au plus. Par contre, l'excrétion virale peut se poursuivre pendant deux à trois semaines après la fin des symptômes. Certaines personnes infectées peuvent excréter du virus sans présenter de symptômes.

2. MÉTHODE DE DÉTECTION

En raison de la faible contamination attendue, les échantillons d'eau – excepté pour les eaux brutes de station d'épuration – sont concentrés à partir d'un volume d'un litre par ultrafiltration. Les eaux collectées en entrée des stations d'épuration sont analysées directement sous un volume de 40 ml. Chaque échantillon de coquillages, soit 6 individus, est disséqué et seuls les tissus digestifs sont analysés selon une technique rRT-PCR¹ [5]. Avant toute analyse, l'efficacité d'extraction est contrôlée par un virus ajouté en début de traitement de l'échantillon. Si ces contrôles sont satisfaisants, les norovirus (NoV) sont recherchés sur l'extrait pur des acides nucléiques et après dilution au 1/10, en utilisant les amorces et sondes sélectionnées par le laboratoire et préconisées par le groupe de travail CEN-TAG4².

3. SUIVI DE LA CONTAMINATION VIRALE SUR DEUX SITES, LA BAIE DE PAIMPOL ET LA RADE DE BREST

3.1. BAIE DE PAIMPOL

3.1.1. Contexte de l'étude

Le site de la baie de Paimpol est une zone d'élevage exclusivement ostréicole, avec 500 hectares majoritairement destinées à l'élevage d'huîtres creuses *Crassostrea gigas*, dont la production annuelle atteignait en 2000 environ 7 000 tonnes. Des huîtres sauvages sont naturellement fixées au niveau des zones de pêche récréative (zone d'estran).

La synthèse ci-dessous s'appuie sur une étude menée de décembre 2009 à décembre 2010 [6], ayant pour but d'évaluer la concentration en norovirus dans les principaux rejets d'émissaire et les huîtres creuses sur l'estran ou en élevage (figure 1). La période retenue couvre l'épidémie hivernale de gastro-entérites aiguës dans la population, de façon à avoir une vision réaliste des apports d'origine humaine.

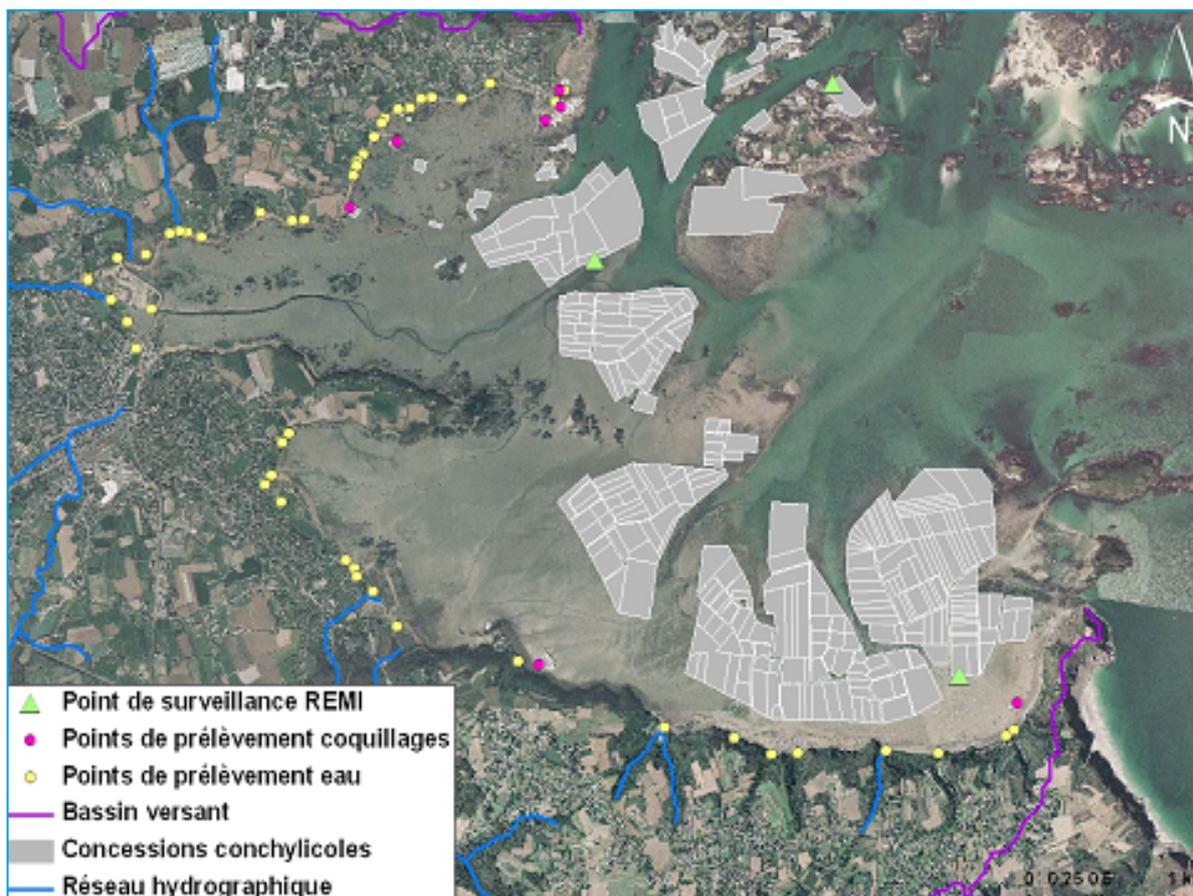


Figure 1 : Localisation des points de prélèvements d'eaux et de coquillages au cours de l'étude Baie de Paimpol (Sources : Le Saux et al, 2010 (6)).

1 rRT-PCR : Real Time-Polymerase Chain Reaction ; technique de quantification des ARN en temps réel.

2 Comité Européen de Normalisation-tâche 4 (consacrée aux virus).

Les stations de surveillance du réseau de contrôle microbiologique (REMI³) (Port Lazo, Saint-Riom, Paimpol centre) ont été suivies lorsque les possibilités d'accès le permettaient. 77 émissaires ont été identifiés, mais seuls ceux disposant d'un écoulement le jour des prélèvements ont pu être échantillonnés, soit 26 apports permanents et 29 apports temporaires sur la période considérée.

3.1.2. Résultats

Sur les émissaires échantillonnés, 74 % des prélèvements ont été trouvés négatifs en norovirus, les valeurs observées sont faibles et la valeur maximale trouvée a été de 100 copies ARN·l⁻¹⁴ (Tableau 1). Il n'y a pas de tendance saisonnière marquée concernant la présence ou l'absence de détection du virus, ce qui est en accord avec le fait que ce virus circule toute l'année, et que son introduction dans le milieu peut être liée à différents facteurs tels que des pluies ou des dysfonctionnements dans des réseaux de collecte ou de rejets sporadiques d'assainissement non collectifs (ANC).

En sortie de station d'épuration, les concentrations sont en moyenne très élevées. La station de Paimpol (traitement biologique) présente les valeurs maximales les plus basses, alors que les deux autres stations (traitement par lagunage) ont des valeurs supérieures, et des rejets parfois équivalant à des eaux brutes non épurées (107 copies ARN·l⁻¹). Ces eaux sont rejetées dans des ruisseaux ou des émissaires débouchant, après dilution, dans la baie de Paimpol. Les émissaires ayant été trouvés le plus souvent positifs correspondant à ceux recevant ces apports (émissaires de fond de baie entre autre).

Lieu	Nombre de prélèvements	Moyenne géométrique* Log copies ARN·l ⁻¹	Écart-type Log copies ARN·l ⁻¹	Maxi Log copies ARN·l ⁻¹	Mini* Log copies ARN·l ⁻¹	% < LD*
Émissaires côtiers	424	1,08	0,80	2,00	< LD	74
Rejet STEP Paimpol	46	3,80	1,22	5,11	< LD	13
Rejet STEP Plouezec	44	4,22	1,10	7,18	< LD	4
Rejet STEP Kerfot	43	3,45	1,86	7,34	< LD	37

* Limite de détection LD = 10 copies ARN/L (soit 1 log copies ARN/L).

Tableau 1 : Concentration en norovirus trouvés dans les rejets des stations d'épuration et émissaires du secteur de Paimpol (décembre 2009 à décembre 2010) – STEP = Station d'épuration.

En ce qui concerne les coquillages (Tableau 2), des norovirus ont été détectés particulièrement sur les secteurs Ploubazlanec (secteur regroupant les points de prélèvements de Porz Even et Saint-Riom au nord-est de la baie) et Paimpol (secteur plus proche du fond d'estuaire et regroupant les points de prélèvements de Paimpol Centre, Pors Don et Kerroc'h) avec un peu moins de 50 % de prélèvements positifs (supérieurs à la limite de détection). En revanche, le dernier secteur, Plouezec, situé au sud de la baie, présentait 75,6 % de résultats négatifs.

Les valeurs moyennes de contamination étaient identiques sur les trois zones (autour de 103 copies d'ARN·g⁻¹), mais des valeurs supérieures à 104 copies d'ARN·g⁻¹ ont été trouvées dans les secteurs Ploubazlanec et Paimpol.

3 http://envlit.ifremer.fr/surveillance/microbiologie_sanitaire

4 Copies ARN·l⁻¹: nombre de copies d'acide ribonucléique par litre.

Lieu	Nombre d'échantillons	Moyenne géométrique* Log copies ARN.l ⁻¹	Écart-type Log copies ARN.l ⁻¹	Maxi Log copies ARN.l ⁻¹	Mini* Log copies ARN.l ⁻¹	% < LD*
Ploubazlanec ¹	57	2,42	0,80	4,4	< LD	59,6
Paimpol ²	45	2,45	0,88	4,5	< LD	55,6
Plouezec ³	41	2,10	0,51	3,4	< LD	75,6

* Limite de détection LD = 50 copies ARN.g⁻¹ (soit 1.70 log copies ARN.g⁻¹).

¹ Ploubazlanec : données groupées des trois points Port Even (Nord, sud et médian) et St Riom.

² Paimpol : données groupées des trois points Paimpol Centre, Pors Don et Kerroc'h.

³ Plouezec : données groupées des points Port Lazo et Kerarziac.

Tableau 2 : Concentration en norovirus trouvés dans les coquillages de la Baie de Paimpol (décembre 2009 à décembre 2010).

On observe une variation saisonnière de la contamination (Tableau 3). La plus forte occurrence de présence de virus dans les coquillages coïncide avec la période épidémique de gastro-entérites (novembre-avril), contamination qui persiste jusqu'au mois d'avril. Les norovirus ont été détectés particulièrement sur le secteur de Paimpol dans 66,7 % des échantillons, et sur le secteur de Ploubazlanec avec 63,3 % des échantillons. Pour la période mai-octobre l'occurrence des norovirus dans les coquillages est plus faible (11,8 % et 14,8 % sur les même secteurs respectivement). Le secteur sud de la baie (Plouezec) est le moins touché par des apports de virus. Cette présence de virus hors période épidémique est cohérente avec la présence à toute saison des virus dans les émissaires, et avec par ailleurs la possibilité du virus à se maintenir dans les huîtres pendant des très longues périodes [2] [4].

Lieu	novembre - avril			mai - octobre		
	Nb. échantillons	% négatifs	% positifs	Nb. échantillons	% négatifs	% positifs
Ploubazlanec ¹	30	36,7	63,3	27	85,2	14,8
Paimpol ²	30	33,3	66,7	17	88,2	11,8
Plouezec ³	23	56,5	43,5	19	94,7	5,3

¹ Ploubazlanec : données groupées des trois points Port Even (Nord, sud et médian) et Saint-Riom.

² Paimpol : données groupées des trois points Paimpol Centre, Pors Don et Kerroc'h.

³ Plouezec : données groupées des points Port Lazo et Kerarziac.

Tableau 3 : Occurrence des norovirus dans les coquillages en fonction de la période de l'année (Baie de Paimpol décembre 2009 à décembre 2010).

3.1.2. Discussion et conclusion

L'étude a porté sur un secteur limité (points côtiers en baie de Paimpol) et sur une période limitée (1 an). Il n'est donc pas possible de généraliser les informations obtenues ni dans le temps, ni à l'ensemble du secteur Manche-mer du Nord dans le cadre de la DCSSM.

Les premières tendances observées [6] montrent que :

- le rejet de norovirus par les petits émissaires est récurrent sur l'ensemble de l'année, mais les concentrations sont faibles. Ces émissaires reçoivent sans aucun doute des rejets urbains, puisque ce virus est strictement d'origine humaine. Ces résultats sont cohérents également avec les données épidémiologiques montrant que ce virus circule toute l'année avec des périodes de plus forte occurrence (épidémies hivernales dans la population). La présence du virus est aléatoire ou permanente en fonction du type de rejets sur le cours d'eau (ex : présence de stations d'épuration) ;

- l'occurrence de norovirus dans les huîtres présente une tendance saisonnière marquée. Les concentrations observées sont généralement faibles, mais il faut garder à l'esprit l'extrême infectiosité de ce virus. Cependant, la courte durée de la campagne de prélèvement ne permet pas de savoir s'il s'agit d'une année « normale » ou exceptionnelle.

3.2. BAIE DE DAOULAS, RADE DE BREST

3.2.1. Contexte de l'étude

La baie de Daoulas, située en rade de Brest, reçoit les eaux d'un bassin versant de 113 km². La rivière principale, La Mignonne, a un débit moyen annuel de 1550 l·s⁻¹ (1979-2000, DDE) et draine à elle seule 43 % du bassin versant composé de 5 autres petits sous-bassins. Cette zone héberge une population de 6 562 habitants (densité moyenne 58 hab·km⁻², densité près du littoral 1 772 hab·km⁻²). Elle est le siège d'une agriculture intensive, 62 % des terrains étant dévolus à cette activité, en particulier à l'alimentation du bétail et à l'épandage de lisiers, car l'élevage est y important (cheptel : 9 443 vaches, 60 177 porcs 434 254 volailles). L'estuaire est une zone d'élevage, surtout ostréicole (294 ha, 15 exploitants, production 200 t·an⁻¹), et de pêche à pied ou professionnelle pour les palourdes (*Rudipates decussatus*).

La classification de la zone par le REMI, d'après le règlement CE n°854/2004 est B (qualité moyenne, les coquillages devant être purifiés avant d'être mis sur le marché) pour les mollusques filtreurs, et C (mauvaise qualité, les coquillages ne pouvant être mis sur le marché à moins d'avoir subi un reparaçage longue durée ou un traitement thermique adéquat) pour les fouisseurs.

La synthèse ci-dessous s'appuie sur une étude menée de décembre 2004 à mai 2006 dans le cadre d'un projet européen Seafoodplus N° FOOD-CT-2004-506359 (action REDRISK), ayant pour but d'évaluer la contamination virale d'une zone de production et de déterminer des actions pour limiter le risque sanitaire [7]. Pendant cette période, les principaux apports de rivières, celui de la station d'épuration de Daoulas rejetant dans l'estuaire, et des coquillages, ont été échantillonnés (figure 2).

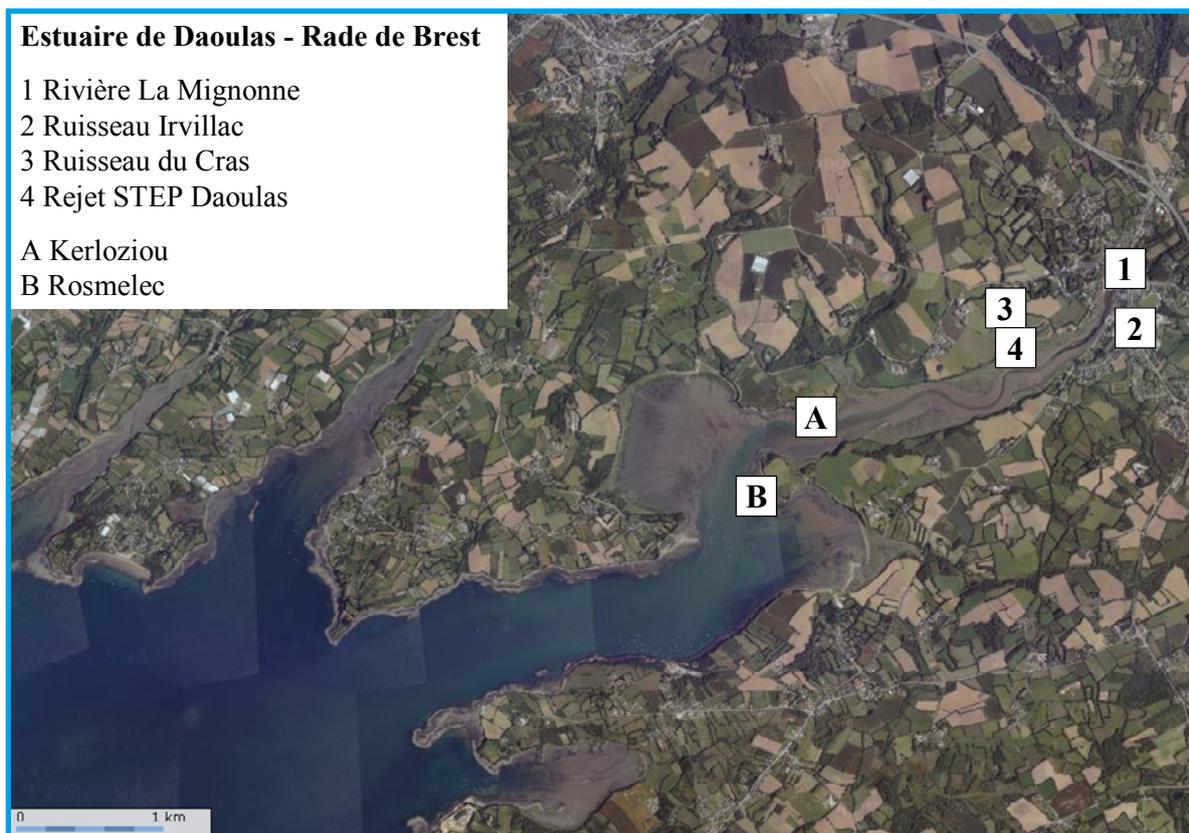


Figure 2 : Localisation des points de surveillance des eaux et des coquillages au cours de l'étude REDRISK (Sources : REDRISK, 2007).

3.2.2. Résultats

Deux stations de surveillance des huîtres (*Crassostrea gigas*) ont été placées dans l'estuaire et ont été suivies lorsque les possibilités d'accès le permettaient. Les rivières ou émissaires ont été identifiés, les résultats obtenus sur les principales rivières (La Mignonne, Irillac, Cras) ainsi que sur le rejet de la station d'épuration sont reportés ci-dessous (Tableau 4).

Lieu	Nombre de prélèvements	Moyenne géométrique Log copies ARN.l ⁻¹	Écart type Log copies ARN.l ⁻¹	Mini* Log copies ARN.l ⁻¹	Maxi Log copies ARN.l ⁻¹	% < LD*
La Mignonne	17	1,31	0,81	LD	3,01 10 ³	70,5
Irillac	16	1,06	0,24	LD	8,78 10 ¹	93,75
Cras	12	LD	0,00	LD	LD	100
Rejet STEP Daoulas	34	3,13 10 ⁴	2,54 10 ⁵	6,47 10 ⁵	6,47 10 ⁵	76,5

* Limite de détection LD = 10 copies ARN.l⁻¹ (soit 1 log copies ARN.l⁻¹).

Tableau 4 : Concentration en norovirus trouvés dans les rivières (La Mignonne, Irillac et Cras) et dans le rejet de la station d'épuration de Daoulas (décembre 2004 à décembre 2006).

On constate que dans les rivières, le niveau de contamination et d'occurrence des virus est très faible. La rivière Cras, par exemple, a été trouvée systématiquement négative. Cependant le nombre d'échantillons étant très limité, ces résultats ne peuvent être généralisés. Le rejet de la station d'épuration de Daoulas (lagunage en trois bassins) est nettement plus contaminée (concentration moyenne et maximum), mais cependant 76,5 % des résultats sont en dessous de la limite de détection [8] [9].

En ce qui concerne les coquillages, les résultats montrent l'occurrence des norovirus aussi bien en amont (point de Rosmelec) qu'en aval (Kerloziou), les valeurs trouvées en termes de concentrations moyennes ou maximales sont équivalentes sur ces deux points (Tableau 5).

Lieu	Nb. échantillons	Moyenne* géométrique Log copies ARN.g ⁻¹	écart-type Log copies ARN.g ⁻¹	Maximum Log copies ARN.g ⁻¹	Minimum* Log copies ARN.g ⁻¹	% < LD*
Rosmelec	18	2,27	0,78	3,4	< LD	11,1
Kerloziou	21	2,24	0,74	3,92	< LD	42,9

* Limite de détection LD = 50 ARN/g (soit 1.7 copies ARN/g).

Tableau 5 : Concentration en norovirus trouvés dans les coquillages de l'estuaire de Daoulas (décembre 2009 à décembre 2010).

3.2.3. Discussion et conclusion

L'étude a porté sur un secteur limité (estuaire de Daoulas) et sur une période limitée (2 ans). Il n'est donc pas possible de généraliser les informations obtenues ni dans le temps, ni à l'ensemble du secteur Manche / mer du nord dans le cadre de la DCSSM.

Les tendances observées montrent :

- un faible rejet en norovirus par les petits émissaires, mais un rejet important en termes de concentration et de pourcentage d'occurrence par la station d'épuration ;
- la présence de norovirus dans les huîtres situées en aval dans l'estuaire (zone classée B, moyenne qualité, d'après le règlement CE n°854/2004) ;
- l'absence de tendance saisonnière de la contamination, cependant la période étudiée ne permet peut-être pas de voir ces tendances. Une étude sur un intervalle de temps plus long aurait été nécessaire.

4. POUR UNE SURVEILLANCE VIROLOGIQUE

Dans le cadre de la DCSMM, si le suivi de ce type de contamination était adopté, les méthodes actuelles présentées ci-dessus et en cours de validation sur le plan européen, pourraient être utilisées selon un plan d'échantillonnage du type du réseau de contrôle microbiologique des zones de production des coquillages (REMI)⁵ et pourraient inclure des analyses d'eaux issues des principaux émissaires impactant la sous-région Manche-mer du Nord.

⁵ http://envlit.ifremer.fr/surveillance/microbiologie_sanitaire

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Le Guyader F.S., Pommepuy M., Loisy-Hamon F., 2010a. Virus entériques humains et aliments. *An. Inst. Past.*, 52, 8-11.
- [2] Le Guyader F.S., Krol J., Ambert-Balay K., Ruvoen-Clouet N., Desaubliaux B., Parnaudeau S., Le Saux J-C., Ponge A., Pothier P., Atmar R.L., Le Pendu J., 2010b. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J. Clin. Microbiol.*, 48 : 915-920.
- [3] Le Guyader F.S., Le Saux J-C., Delmas G., Krol J., Ambert-Balay K., 2009b. Virus Aichi, norovirus, astrovirus, entérovirus et rotavirus impliqués dans des cas de gastro-entérites suite à la consommation d'huîtres. *Virologie* 13 : 1-3.
- [4] Le Guyader F.S., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009c. Monitoring viral contamination in shellfish growing areas. In : *New technologies in aquaculture : improving production efficiency, quality and environment management*. G. Burnell, G. Allan (Eds), Woodhead Publishing, Cambridge, p542-569.
- [5] Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009a. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75 : 618-624.
- [6] Le Saux J.C., Mouillard G., Ollivier J., Lora M., Parnadeau S., Bougeard M. Pommepuy M., Le Guyader S., 2010. Contamination des coquillages par le virus de l'hépatite A en Baie de Paimpol : identification des voies de transfert Décembre 2009-Décembre 2010 (cofinancement ARS - Ifremer). Ed. Ifremer 52p.
- [7] REDRISK, 2007. Final report (contrat Seafoodplus N° FOOD-CT-2004-506359). Avril 2007. 2002p
- [8] da Silva A.K., Le Saux J-C., Parnaudeau S., Pommepuy M., Elimelech M. et Le Guyader F.S., 2007. Detection of norovirus in sewage treatment using real-time RT-PCR : different behavior of GI and GII. *Appl. Environ. Micorbiol.* 73, 7891-7897.
- [9] da Silva A.K., Le Guyader F.S., Le Saux J-C., Pommepuy M., Montgomery M. et Elimelech M., 2008. Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond ; *Environ. Sci. Technol.* 42, 9151-9157.