



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

DB 3401

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ - NANCY I
1996

ECOLE DOCTORALE "BIOLOGIE ET SANTÉ"

THÈSE

présentée et soutenue publiquement
le 16 décembre 1996
pour obtenir le titre de

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
HENRI POINCARÉ - NANCY I**

mention

Chimie et microbiologie de l'eau
par

Christophe GANTZER

titulaire du Diplôme d'Études Approfondies
Chimie et Microbiologie de l'Eau



Sujet :

Persistence du génome d'entérovirus et des bactériophages de *Bacteroides fragilis* dans les eaux. Intérêt de ces marqueurs en tant qu'indicateurs de contamination virale.

MEMBRES DU JURY

Juges : Pr Jean-Claude BLOCK (UHP - Nancy)
Dr Yves LÉVI (CIRSEE - Lyonnaise des eaux - Le Pecq)
Pr Armand MAUL (U. Metz)
Pr Louis SCHWARTZBROD (UHP - Nancy)

Rapporteurs : Pr Michèle AYMARD (UCB - Lyon)
Pr Juan JOFRE (U. Barcelone - Espagne)



"L' une est exhalative et l'autre essencie, congélative et générative, lesquelles deux eaux sont entretenues l'une parmi l'autre, en telle sorte qu'il est impossible de les distinguer auparavant que l'une des deux soit congelée. Quand tu auras bien examiné toutes choses par les effets du feu, tu trouveras mon dire véritable, et me confesseras que le commencement et origine de toutes choses naturelles est eau."

Bernard Palissy (1510-1589)

"Discours admirables de la nature des eaux et fontaines, tant naturelles qu'artificielles, des métaux, des sels et salines, des pierres, des terres, du feu et des émaux, avec plusieurs autres excellents secrets des choses naturelles."

"L' eau doit s'appeler "ignis mollis", puisque vous même vous disiez les mixtes comme feroit le feu, et c'est avec raison qu'on a dit c'est un feu mou ; elle est notre véritable mercure, puisqu'à l'exemple du dieu de ce nom elle s'élève si facilement dans les airs; elle est molle et dure à la fois ; ne riez point, continue-t-il, il n'y a point de contradiction, elle est molle parce qu'elle est liquide ; elle est dure quand elle est enfermée dans un Mixte ; (j'ajouterai et quand elle est glacée) ; le vent la porte dans son sein, les nues sont portées par le vent, et les nues ne sont que de l'eau. Elle est cet esprit universel qui agite toute la masse du monde, puisqu'elle se mêle à tous les corps."

*M.L.C.D.L.G. Chimie hydraulique pour extraire les sels essentiels des végétaux, animaux et minéraux, avec l'eau pure - Jean-Baptiste Coignard
Paris - 1745*

Remerciements

Mes remerciements vont tout d'abord aux membres du Jury qui m'ont fait l'honneur de bien vouloir accepter cette tâche.

A mon directeur de thèse, Monsieur Louis Schwartzbrod pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire. Sa passion pour la virologie qu'il partage avec enthousiasme et son soutien tant scientifique que moral auront été pour moi une source de motivation tout au long de ce travail. Qu'il trouve ici le témoignage de ma grande reconnaissance.

A mon co-directeur de thèse, Monsieur Arnaud Maul qui a su éclairer les nombreux problèmes statistiques qui ont jalonné cette étude. Sa disponibilité et sa gentillesse sont des vertus que je rendrais volontiers obligatoires tant elles vous rendent la vie plus facile et plus agréable. Qu'il en soit ici remercié.

A mes rapporteurs, Madame Michèle Aymard et Monsieur Juan Jofre qui ont accepté cette tâche toujours quelque peu contraignante et ont apporté un regard critique, précieux à ce travail. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sincère gratitude.

A Monsieur Jean-Claude Block, qui malgré ses nombreuses occupations, a sacrifié de son temps pour siéger au sein de ce jury. Son dynamisme stimulant et communicatif m'aura donné, au cours de ces années, le goût d'en savoir d'avantage. Qu'il en soit ici remercié.

A Monsieur Yves Lévi pour la confiance qu'il m'a témoignée tout au long de ce travail. Je lui exprime toute ma gratitude, particulièrement pour ces remarques toujours pertinentes et ces conseils judicieux.

Mes remerciements vont également :

A la société Lyonnaise des Eaux qui a garanti le support financier de cette étude et en particulier à Monsieur Jean-Marc Audic qui a soutenu ce projet, à Mademoiselle Nadine Dumouttier et Monsieur Laurent Kiéné qui ont suivi l'évolution de ce travail et qui m'ont apporté leur aide constructive et dynamique.

A Monsieur Deloince et à Madame Lévêque pour m'avoir accueilli au CRESSA et m'avoir initié aux joies de la Biologie Moléculaire.

A Monsieur Lefaou et à toute l'équipe du laboratoire de virologie du CHRU de Brabois pour m'avoir permis de disposer de l'animalerie.

A Monsieur Laveran qui m'a accueilli avec gentillesse au sein de son laboratoire et m'a permis d'observer les virus par microscopie électronique. A défaut d'avoir permis une quantification des particules virales... Ces images resteront gravées dans ma mémoire.

*A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie de Barcelone et en particulier à Monsieur Francisco Lucena pour m'avoir initié à la mise en évidence des phages de *Bacteroides fragilis*, mais aussi pour leur accueil chaleureux.*

A Chantal Béril qui m'a initié aux techniques de l'analyse virologique, à Michel Gauché dont le dévouement a facilité l'avancement de mes travaux et à Stéphanie Schemmel qui a contribué à la réalisation de certaines analyses. Qu'ils trouvent ici le témoignage de ma sympathie pour leur soutien et leur gentillesse.

Enfin, je tiens à remercier Météo France pour m'avoir permis de disposer des données pluviométriques, et les responsables des stations d'épuration de Nancy et d'Epinal, en particulier Monsieur Orain et Monsieur Aubertain pour m'avoir permis de réaliser les prélèvements d'eaux et de disposer des analyses biochimiques.

A Laurence et au petit être qu'elle porte, pour m'avoir soutenu, donné la force d'achever ce travail et surtout pour m'avoir supporté durant cette période..... Qu'ils trouvent ici le gage de mon amour.

A la mémoire de ma mère qui durant toutes ces années m'a chéri, aidé et réconforté. Que ce travail lui soit dédié et rende hommage à sa force et son courage.

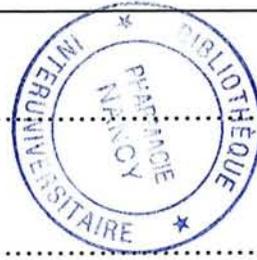
A mon père qui m'a toujours soutenu et fait confiance. Qu'il trouve ici la preuve de mon affection et de mon attachement.

A Michèle et Bernard qui ont su m'apporter leur soutien durant toutes ces années. Qu'ils en soient ici chaleureusement remerciés.

A mes beaux-parents, à Marie-Paule et Benoit, qui m'ont soutenu et aidé tout au long de ce travail. Qu'ils trouvent ici toute ma reconnaissance et mon affection.

A Séverine, Jacques, Jérémie, Nicolas et Sébastien. Qu'ils trouvent ici le courage et l'envie d'aller toujours au bout de leurs efforts.

Au reste de ma famille, au personnel du laboratoire de virologie de la Faculté de Pharmacie de Nancy et à tous mes amis, en particulier à Céline qui a toujours su m'écouter et me conseiller, à Frédéric pour nos discussions souvent très longues ... mais toujours enrichissantes, à Virginie et Duche pour leur aide et leur réconfort, à Sébastien pour m'avoir initié à Power Point..., à Abdel pour avoir entretenu ma forme physique... et à Anne et Titi pour leur soutien moral. Qu'ils trouvent ici toute ma gratitude et mon affection.



<i>Introduction</i>	1
<i>Etude bibliographique</i>	3
<i>I Risque viral d'origine hydrique</i>	4
I.1 <i>Origine de la contamination</i>	4
I.2 <i>Virus du milieu hydrique</i>	7
I.2.1 <i>Virus entériques</i>	7
I.2.1.1 <i>Entérovirus</i>	7
I.2.1.2 <i>Virus des hépatites</i>	8
I.2.1.3 <i>Virus des gastro-entérites</i>	9
I.2.1.4 <i>Adénovirus</i>	11
I.2.2 <i>Bactériophages</i>	11
I.3 <i>Epidémiologie</i>	13
I.3.1 <i>Transmission directe</i>	13
I.3.2 <i>Transmission indirecte</i>	17
<i>II Détection des virus dans le milieu hydrique</i>	18
II.1 <i>Méthodes de concentration</i>	19
II.1.1 <i>Concentrations primaires</i>	19
II.1.1.1 <i>Méthodes d'adsorption-élution</i>	19
II.1.1.2 <i>Ultrafiltration</i>	24
II.1.1.3 <i>Conclusion</i>	25
II.1.2 <i>Concentrations secondaires</i>	26
II.1.2.1 <i>Floculation organique</i>	26
II.1.2.2 <i>Précipitation par le sulfate d'ammonium</i>	27
II.1.2.3 <i>Précipitation par le Polyéthylène glycol (PEG)</i>	27
II.1.2.4 <i>L'ultracentrifugation</i>	27
II.2 <i>Mise en évidence des virus</i>	28
II.2.1 <i>Microscopie électronique</i>	29
II.2.2 <i>Culture cellulaire</i>	29
II.2.3 <i>Inoculation à l'animal</i>	31
II.2.4 <i>Techniques immunologiques</i>	32
II.2.5 <i>Détection des acides nucléiques viraux</i>	32
<i>III Survie des virus dans l'environnement</i>	33
III.1 <i>Facteurs physiques</i>	34

III.1.1 Chaleur.....	34
III.1.2 Adsorption virale.....	35
III.2 Facteurs biologiques.....	36
III.3 Facteurs chimiques.....	39
III.3.1 pH et sels.....	39
III.3.2 Chlore.....	40
III.3.3 Ozone.....	43
III.3.4 Rayonnement ultra-violet.....	44
IV Indicateurs de contamination virale.....	45
IV.1 Indicateurs bactériens.....	46
IV.1.1 Coliformes totaux et thermotolérants.....	46
IV.1.2 <i>Escherichia coli</i>	47
IV.1.3 Streptocoques fécaux.....	48
IV.1.4 <i>Clostridium perfringens</i>	49
IV.2 Indicateurs viraux.....	50
IV.2.1 Coliphages somatiques.....	50
IV.2.2 Bactériophages à ARN F-spécifiques.....	52
IV.2.3 Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	53
Objectifs.....	56
Matériels et Méthodes.....	58
I Virus.....	59
I.1 Coxsackievirus B3 (cox B3).....	59
I.2 Phage B40-8.....	59
II Argile.....	59
III Filtrat bactérien.....	60
IV Milieux hydriques.....	61
IV.1 Milieux tamponnés stériles.....	61
IV.2 Eaux de forage.....	61
IV.3 Eaux de distribution.....	61

IV.4 Eaux usées traitées.....	61
IV.4.1 Station de Nancy.....	62
IV.4.2 Station d'Epinal.....	62
V Détection des virus.....	63
V.1 Entérovirus.....	63
V.1.1 Inoculation sur culture cellulaire.....	63
V.1.2 Inoculation aux souriceaux nouveau-nés.....	67
V.1.3 Détection d'ARN d'entérovirus par RT semi-nested PCR.....	67
V.1.4 Détection d'ARN d'entérovirus par le kit « amplicor enterovirus test ».....	72
V.2 Bactériophages B40-8 de <i>Bacteroides fragilis</i> HSP40.....	74
V.2.1 Culture de <i>Bacteroides fragilis</i> HSP40.....	75
V.2.2 Détection des phages B40-8.....	76
V.3 Coliphages somatiques.....	78
V.3.1 <i>Escherichia coli</i>	79
V.3.2 Détection des coliphages somatiques.....	79
VI Echantillonnage.....	80
VI.1 Eaux artificiellement contaminées.....	80
VI.2 Eaux usées traitées.....	81
VII Concentration des eaux usées traitées.....	81
VII.1 Concentrations primaires.....	81
VII.1.1 Concentration sur poudre de verre.....	82
VII.1.2 Concentration sur laine de verre.....	82
VII.2 Concentration secondaire.....	83
VII.3 Concentration sur membrane inorganique.....	83
VIII Décontamination des échantillons.....	84
IX Filtration stérilisante des eaux.....	84
X Dosage du chlore libre.....	85
XI Analyse statistique.....	85
XI.1 Comparaison des pentes d'inactivation.....	85

XI.1.1 Test de Fisher-Snedecor.....	85
XI.1.2 Test de Student.....	86
XI.2 Test du χ^2	86
XI.3 Test de Mann-Withney.....	87
Résultats.....	88
I Etude méthodologique.....	89
I.1 Conditions optimales de détection du génome d'entérovirus.....	90
I.1.1 Extraction.....	90
I.1.1.1 Intérêt de l'extraction.....	90
I.1.1.2 Comparaison de deux méthodes d'extraction.....	91
I.1.2 Choix des amorces pour la PCR.....	93
I.1.3 Choix des amorces pour la rétro-transcription.....	96
I.1.4 Sensibilité du protocole d'amplification préconisé.....	98
I.2 Détection des génomes d'entérovirus dans les eaux : étude comparative de deux méthodes de concentration.....	99
I.2.1 Interférences des solutions utilisées lors des concentrations avec la détection des génomes.....	100
I.2.2 Détection du génome dans les eaux usées épurées directement.....	101
I.2.3 Détection du génome après concentration primaire et secondaire.....	102
I.2.4 Discussion.....	103
I.3 Comparaison RT semi-nested PCR « labo » et « enterovirus detection kit ».....	105
I.3.1 Analyse directe des eaux usées traitées.....	107
I.3.2 Analyse des eaux usées traitées après concentration.....	108
I.3.3 Discussion-conclusion.....	110
II Influence de la chaleur sur le devenir du virus et du génome viral.....	112
II.1 Influence de la chaleur sur le génome encapsidé et sur le virus infectieux.....	113
II.1.1 Protocole expérimental.....	113
II.1.2 Résultats.....	114

II.2 Influence de la chaleur sur le génome	
« nu ».....	115
II.2.1 Protocole expérimental.....	116
II.2.2 Résultats.....	116
II.3 Influence d'un autoclavage à 110°C et 120°C	
sur le genome viral.....	117
II.3.1 Protocole expérimental.....	117
II.3.2 Résultats.....	117
II.4 Discussion-conclusion.....	118
III Devenir du coxsackievirus B3 en milieu tamponné.....	120
III.1 Sensibilité des méthodes de détection.....	122
III.1.1 Détection par inoculation aux souriceaux	
nouveau-nés.....	122
III.1.1.1 Doses infectantes.....	122
III.1.1.2 Sensibilité du protocole dans les différents milieux.....	124
III.1.2 Isolement sur cultures cellulaires.....	126
III.1.3 Détection du génome par RT semi-nested PCR.....	127
III.2 Estimation du T90 pour le génome viral.....	128
III.3 Survie du coxsackievirus B3 et de son génome	
dans le PBS.....	130
III.3.1 Influence du filtrat bactérien.....	133
III.3.2 Influence de l'argile.....	136
III.3.3 Influence simultanée des matières en	
suspension et du filtrat bactérien.....	139
III.4 Discussion.....	141
IV Devenir du coxsackievirus B3 en milieu naturel.....	143
IV.1 Devenir du matériel viral en eau de distribution.....	144
IV.1.1 Dosage du chlore résiduel.....	145
IV.1.2 Devenir du virus infectieux et de son génome.....	145
IV.1.2.1 Influence de l'autoclavage.....	147
IV.1.2.2 Influence du thiosulfate de sodium.....	149
IV.1.2.3 Influence des RNases.....	150
IV.1.2.4 Discussion.....	152
V Devenir du phage de <i>Bacteroides fragilis</i> en	
milieu hydrique.....	159

<i>V.1 Survie dans le PBS.....</i>	160
<i>V.2 Survie dans de l'eau de distribution</i>	161
<i>V.2.1 Influence de l'autoclavage.....</i>	162
<i>V.2.2 Influence de l'ajout de thiosulfate de sodium</i>	164
<i>V.3 Survie dans de l'eau de forage.....</i>	165
<i>V.4 Discussion.....</i>	166
<i>VI Entérovirus et indicateurs de contamination virale dans les eaux usées traitées.....</i>	170
<i>VI.1 Analyse directe des eaux usées traitées.....</i>	172
<i>VI.1.1 Recherche de coliphages somatiques.....</i>	172
<i>VI.1.2 Recherche de phages de <i>Bacteroides fragilis</i>.....</i>	172
<i>VI.1.3 Recherche des entérovirus.....</i>	174
<i>VI.1.4 Recherche des génomes d'entérovirus</i>	174
<i>VI.1.5 Conclusion</i>	174
<i>VI.2 Analyse globale des eaux usées traitées après concentration.....</i>	175
<i>VI.3 Analyse des eaux de Nancy secondaire.....</i>	176
<i>VI.3.1 Résultats.....</i>	176
<i>VI.3.2 Conclusion.....</i>	178
<i>VI.4 Analyse des eaux d'Epinal secondaire.....</i>	178
<i>VI.4.1 Résultats.....</i>	178
<i>VI 4.2 Conclusion.....</i>	179
<i>VI.5 Analyse des eaux d'Epinal tertiaire.....</i>	180
<i>VI.5.1 Résultats.....</i>	180
<i>VI.5.2 Conclusion.....</i>	181
<i>VI.6 Discussion.....</i>	181
<i>Conclusion.....</i>	185
<i>Références bibliographiques.....</i>	192
<i>Annexes.....</i>	214

Glossaire.....221

Publications et communications.....222

Introduction

Parmi les nombreuses dégradations que subit notre environnement, la plus préoccupante est sans doute celle du milieu hydrique. La pollution des eaux est due à une activité humaine sans cesse croissante et peut être aussi bien d'origine chimique par le rejet de déchets industriels, que microbiologique par le rejet d'eaux usées urbaines.

La prise de conscience collective et les mesures appliquées par les autorités sanitaires ont permis, à l'appui de données épidémiologiques, de réduire le risque de contamination humaine et notamment le risque bactérien et chimique.

Malheureusement en ce qui concerne le risque virologique, le même optimisme ne peut pas être affiché. En effet, si une surveillance de la qualité bactérienne et chimique d'une eau est relativement aisée à mettre en place, il n'en est pas de même pour la qualité virologique.

En dépit des traitements des eaux usées brutes et des traitements de potabilisation, l'importance du milieu hydrique comme voie de transmission de maladies virales est à l'heure actuelle encore parfaitement reconnue. Cependant en pratique, ce problème est relativement difficile à cerner, du fait des faibles rendements des méthodologies de mise en évidence des virus, et aux limites des études épidémiologiques. En effet, si l'origine de la contamination est bien connue, la diversité des virus rencontrés dans le milieu hydrique, les nombreuses infections asymptomatiques qu'ils provoquent et le faible pourcentage de maladies cliniques déclarées aux autorités sanitaires sont susceptibles de masquer certains épisodes épidémiques et de biaiser les résultats.

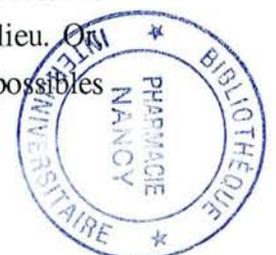
Ces faiblesses tant techniques qu'épidémiologiques sont à l'origine du vide législatif qui entoure la qualité virologique des eaux.

Or selon les normes européennes, les eaux destinées à la consommation humaine doivent être exemptes de tout organisme pathogène présentant un risque pour la santé publique. A l'heure actuelle, le respect de cette norme est basé uniquement sur des indicateurs bactériens, qui sont reconnus comme étant de mauvais indicateurs de contamination virale.

De façon exemplaire, des travaux font état d'épidémies locales dues à l'eau distribuée (après traitement en filière classique) alors même que les normes bactériologiques et chimiques sont respectées (Rose *et al.*, 1986 ; Stetler *et al.*, 1992). De même, la présence de virus entériques a été décélée dans des eaux d'adduction alors que celles-ci ne renfermaient pas de bactéries indicatrices de contamination fécale (Schwartzbrod *et al.*, 1985).

Les épidémies observées sont dues à la consommation d'eau de puits ou d'eau non traitée, mais aussi à des défaillances ponctuelles du traitement de potabilisation ou du système de distribution.

Ces observations justifient une surveillance de tous les instants. Il est donc nécessaire de disposer d'outils fiables pour analyser rapidement la contamination virale du milieu. Or les méthodes classiques de détection des virus, comme la culture cellulaire, sont impossibles



à proposer pour l'analyse virologique de routine. Cette méthodologie est en effet longue, coûteuse et ne permet pas la détection de tous les sérotypes viraux.

La communauté scientifique recherche donc un indicateur spécifique de contamination virale, et de nombreuses études sont actuellement réalisées afin de déterminer si certains bactériophages pourraient constituer cet indicateur. Ces micro-organismes font d'ailleurs leur apparition dans un projet de norme CEE relative aux eaux de baignade, montrant ainsi que la réglementation évolue vers la prise en compte du risque virologique. Aucun type particulier de bactériophage n'est encore cité, mais les candidats potentiels sont les phages de *Bacteroides fragilis*, les coliphages somatiques et les phages à ARN F-spécifiques.

L'émergence des techniques de biologie moléculaire, telle que la Polymerase chain reaction (PCR), permet depuis une dizaine d'années de disposer d'une méthode de détection rapide et sensible du génome viral. Cette technologie ouvre de nouvelles perspectives pour l'analyse virologique dans l'environnement et plus particulièrement dans l'eau. Néanmoins des points d'ombre subsistent, et il est notamment fondamental de savoir si la présence de génome peut témoigner de la présence de virus réellement infectieux, ou si elle indique simplement l'existence d'une contamination virale plus ou moins récente.

Notre travail se situe dans ce cadre et comporte deux grandes parties. Une première partie bibliographique, où il nous a paru opportun de situer le risque viral d'origine hydrique, de rapporter les méthodologies existantes pour analyser la contamination virale, d'évaluer la survie des virus dans l'environnement et enfin de déterminer l'intérêt de différents indicateurs potentiels de contamination virale.

Une deuxième partie expérimentale vise à apporter des informations sur la signification de la présence de génome viral dans l'environnement. Nous chercherons notamment à déterminer, dans diverses conditions, si la présence de génome permet de témoigner de la présence de virus infectieux. En cas de réponse négative, nous tenterons d'évaluer l'intérêt de sa détection en tant qu'indicateur de contamination virale.

Etude bibliographique

I Risque viral d'origine hydrique

Près de 140 sérotypes de virus différents par leur structure, leur composition et leurs propriétés sont regroupés sous le terme de virus entériques. Leurs points communs sont leur mode de transmission par voie oro-fécale et leur présence en grande quantité dans les selles d'individus infectés.

Par le biais des fèces, ces virus se retrouvent dans le milieu hydrique et constituent un risque de contamination pour l'homme, contamination qu'il a lui-même créée.

L'organisation mondiale de la santé estime que près de 500 millions d'individus, chaque année sont confrontés à des maladies infectieuses associées au milieu hydrique et aux mauvaises conditions d'hygiène et que 20 millions de ces individus meurent. Selon les données épidémiologiques, les virus entériques constituent une part non négligeable de ces maladies.

I.1 Origine de la contamination

La contamination virale du milieu hydrique est un phénomène naturel lié à la vie elle-même, où l'homme et les animaux sont les réservoirs principaux par leurs déchets. Les eaux usées constituent le premier maillon du cycle de contamination virale où l'homme joue le rôle de contamineur primaire mais aussi de récepteur secondaire des virus présents dans l'eau. La figure 1 résume les possibilités de contamination humaine oro-fécale par des virus entériques, via la voie hydrique.

La contamination de l'homme s'effectue principalement :

- ⇒ par consommation d'eau d'alimentation insuffisamment ou non traitée ;
- ⇒ par consommation de fruits de mer élevés dans des zones conchylicoles contaminées ;
- ⇒ par consommation de produits maraîchers irrigués avec des eaux contaminées ;
- ⇒ par baignade dans des zones contaminées (eaux superficielles ou eaux de mer) ;
- ⇒ par contact avec les boues et les eaux usées pour le personnel pratiquant l'irrigation, l'aspersion et l'épandage. La contamination peut s'effectuer par les aérosols ou être due à une mauvaise hygiène.

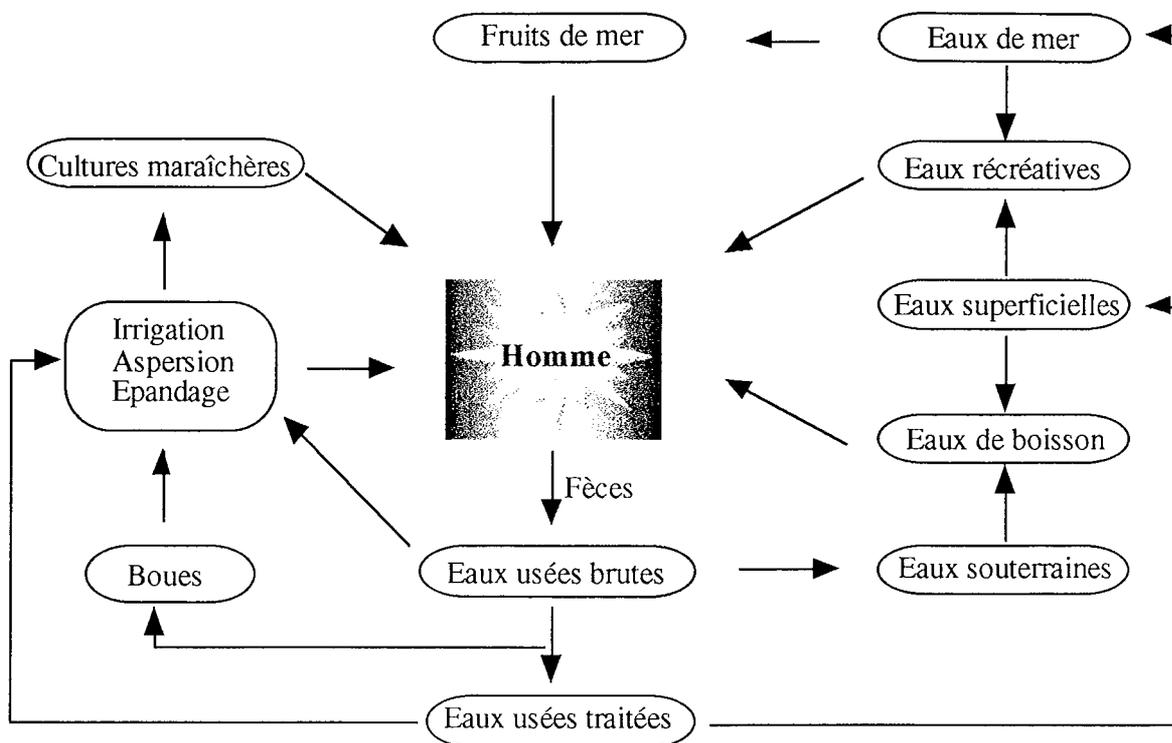


Figure 1 : Cycle de contamination du milieu hydrique (d'après Schwartzbrod, 1991)

Un individu infecté par des virus entériques tels que les rotavirus ou les adénovirus, qu'il présente ou non des symptômes cliniques, est susceptible de rejeter jusqu'à 10^{11} particules virales par gramme de selles (Flewett et Woode, 1978 ; Peigue-Lafeuille, 1991). Si l'on tient compte que les Européens produisent en moyenne entre 100 et 200g de fèces par jour, il apparaît que la quantité de virus rejetée est de l'ordre de 10^{13} particules virales par jour et par personne infectée.

Par ailleurs, la période et la durée d'excrétion virale sont variables. Ainsi le virus de l'hépatite A est retrouvé dans les selles d'individus infectés de deux ou trois semaines avant l'ictère jusqu'à une semaine après, le taux maximal de virus étant obtenu 2 à 3 jours avant l'apparition de l'ictère. Pour le poliovirus, l'excrétion commence 24 heures après le début de l'infection et persiste plusieurs semaines voir plusieurs mois. Les adénovirus sont présents dans les selles pendant une à deux semaines après l'apparition des signes cliniques. Enfin, l'excrétion de rotavirus est maximale de 3 à 4 jours après le début de la diarrhée mais peut continuer pendant 20 jours.

Ceci se traduit par une libération massive de virus dans les eaux usées (Mehnert et Stewien, 1993) et ces virus entériques sont retrouvés classiquement dans 100% des échantillons d'eaux usées brutes (Martins *et al.*, 1983 ; Payment et Trudel, 1985b ; Payment *et al.*, 1986 ; Bosh *et al.*, 1988 et 1986 ; Dahling *et al.*, 1989) à des concentrations variant de 1 à 10^5 UFP.L⁻¹.

Dans les pays industrialisés, les eaux usées brutes subissent un traitement d'épuration physique et biologique. Ces traitements ont pour effet d'une part une amélioration de la qualité microbiologique de l'eau rejetée dans l'environnement, et d'autre part la production de grandes quantités de boues qui sont soit stockées, soit épandues, soit traitées (déshydratation). Ces traitements permettent en fait un transfert d'une partie des micro-organismes de la phase eau à la phase boue.

Compte tenu des traitements, il apparaît clair que les boues obtenues contiennent de grandes quantités de virus entériques variant de 10^3 à 10^6 UFP.kg⁻¹ (Goddard *et al.*, 1981 ; Bosh *et al.*, 1986 ; Schwartzbrod *et al.*, 1987), avec une moyenne de 10^3 UFP.kg⁻¹. La pratique de l'épandage des boues peut donc entraîner un risque de contamination humaine non seulement par génération d'aérosols (Boutin *et al.*, 1984), mais surtout par contamination des eaux de surface par ruissellement et des eaux souterraines par infiltration (Gerba *et al.*, 1991 ; Collins et Kennedy, 1992 ; Hrudehy *et al.*, 1992).

Malgré les traitements d'épuration, la quantité de virus rejetée dans les eaux superficielles est loin d'être négligeable puisque pour une agglomération de 300000 habitants, elle a pu être évaluée à 10^9 virus par 24 heures (Schwartzbrod *et al.*, 1979).

Au niveau des eaux superficielles, grâce au phénomène de dilution, les concentrations virales répertoriées dans la littérature dépassent rarement 10^2 particules par litre (Grabow *et al.*, 1989 ; Lord *et al.*, 1989 ; Walter *et al.*, 1989).

Cependant, la majorité des virus présents dans les eaux est associée à des matières en suspension susceptibles de sédimenter. Albert (1989) rapporte une concentration en entérovirus dans les sédiments fluviaux (Meurthe) de 7 à 90 UFP.kg⁻¹, mais des valeurs de 10^2 à 10^3 UFP kg⁻¹ ne sont pas rares (Schwartzbrod *et al.*, 1988 ; Jofre *et al.*, 1989 ; Rao *et al.*, 1984 et 1986).

Les phénomènes d'adsorption entraînent une diminution de la concentration virale dans la phase eau mais n'entraînent pas une inactivation, bien plus, ils favorisent la dissémination des virus en aval du site de pollution.

La présence de virus dans les eaux superficielles, entraîne un risque de contamination pour l'homme principalement à deux niveaux. D'une part lorsque l'eau est utilisée comme réservoir pour la production d'eau potable et d'autre part lorsque l'eau contamine des zones de conchyliculture.

La raréfaction des réserves d'eaux douces oblige de plus en plus souvent à produire de l'eau potable à partir d'eau de rivière ou de lac. Malgré des traitements de potabilisation très performants, le risque de contamination virale au robinet du consommateur n'est pas nul,

et des virus entériques peuvent être détectés dans les eaux potables (Festey, 1984 ; Schwartzbrod *et al.*, 1985 ; Payment *et al.*, 1985 ; Toranzos *et al.*, 1986 ; Rose *et al.*, 1986 ; Payment *et al.*, 1988).

En cas de contamination de zones conchylicoles, les fruits de mer peuvent, du fait de leur mode d'alimentation par filtration de grandes quantités d'eaux, constituer un risque de contamination pour l'homme. La présence de virus entériques dans les mollusques a été rapportée en de nombreuses occasions (Wait *et al.*, 1983 ; Biziagos, 1989 ; Jofre *et al.*, 1989) et l'association d'épidémie virale avec la consommation de fruits de mer est clairement démontrée (Sockett *et al.*, 1985 ; Halliday *et al.*, 1991 ; Niuauouet *et al.*, 1993).

1.2 Virus du milieu hydrique

Les virus rencontrés dans le milieu hydrique peuvent être séparés en deux groupes : les virus entériques et les bactériophages.

Les virus entériques présentent un intérêt direct en santé humaine, car ils sont capables de provoquer des lésions chez l'homme. Par contre, les bactériophages, dans l'état actuel des connaissances, ne sont pas impliqués en pathologie humaine ou animale, mais ils jouent certainement un rôle important dans le maintien d'un équilibre au niveau de l'écosystème. De plus, certains bactériophages sont susceptibles d'être utilisés comme indicateur de contamination virale.

1.2.1 Virus entériques

Les virus entériques regroupent tous les virus excrétés dans les selles d'individus infectés. Au total près de 140 sérotypes ont pu être isolés, ils appartiennent à des familles virales et à des genres différents (tableau 1).

1.2.1.1 Entérovirus

Les entérovirus ont un diamètre de 20 à 30nm et appartiennent à la famille des *Picornaviridae*. Ce sont des virus à ARN monocaténaire, nus, à capsidie icosaédrique. Ils sont responsables d'infections inapparentes en général, surtout pendant l'enfance. Leur domaine pathologique est peu spécifique.

La plupart de ces virus sont cultivables : poliovirus 1 à 3, coxsackievirus B₁ à B₆, certains coxsackievirus de type A, Echovirus et entérovirus 68 à 71.

Famille	Genre	Espèce	Nombre de sérotypes	Symptômes et maladies
<i>Picornaviridae</i>	Entérovirus	Poliovirus	3	Paralysie, méningite, fièvre poliomyélitique
		Coxsackievirus A	24	Méningite, infection respiratoire, herpangine
		Coxsackievirus B	6	Myocardite, éruption cutanée, fièvre, méningite, infection respiratoire, pleurodinie
		Echovirus	32	Méningite, infection respiratoire, éruption cutanée, fièvre, diarrhée
	Hépatovirus	Entérovirus 68 à 71	4	Méningite, encéphalite, infection respiratoire, conjonctivite hémorragique
		Virus de l'hépatite A	1	Hépatite infectieuse
<i>Réoviridae</i>	Réovirus	Réovirus humains	3	non établi
	Rotavirus	Rotavirus humains	6	Gastro-entérite
<i>Caliciviridae</i>	Calicivirus	Calicivirus humains	3 (5)	Gastro-entérite
		Virus de Norwalk	1	Gastro-entérite
		Small round virus	13	Gastro-entérite
		Virus de l'hépatite E	1	Hépatite infectieuse
	Astrovirus	Astrovirus humain	5	Gastro-entérite
	?	Parvovirus-like	1	Gastro-entérite
<i>Coronaviridae</i>		Coronavirus humains	1	Entérocolite
<i>Toroviridae</i>		Coronavirus-like	?	Gastro-entérite
<i>Adenoviridae</i>	Mastadénovirus	Adénovirus humains	41	Infection respiratoire, conjonctivite, gastro-entérite

Tableau 1 : Virus pathogènes pour l'homme, susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique (d'après Schwartzbrod, 1991)

1.2.1.2 Virus des hépatites

Le virus de l'hépatite A (VHA) appartient à la famille des *Picornaviridae*. C'est un virus nu à ARN et à capsidie icosaédrique, sa taille est de 27nm. Le virus de l'hépatite E (VHE) de la famille des *Caliciviridae* a un diamètre compris entre 27 et 34nm, son ARN est monocaténaire et sa capsidie icosaédrique.

Le VHE est particulièrement grave chez la femme enceinte puisqu'il provoque la mort dans 20% des cas.

Le VHA provoque une hépatite infectieuse qui, dans la majorité des cas, guérit sans séquelles. Mais, dans certains cas, des complications peuvent apparaître comme la forme cholestatique (< 5% des cas), les formes à rechute (6 à 10% des cas) et la forme fulminante (< 1% des cas) qui est associée à une mortalité de 50%. Or, une analyse des données fournie par le CDC (Center Disease Control cité par Apaire-Marchais, 1994) démontre qu'il existe une corrélation entre l'âge et le taux de décès par hépatite A fulminante (>2% pour les plus de 40 ans). Si on considère de plus que la présence d'anticorps anti HAV a diminué de manière très sensible dans la population française (de 50% à 16% chez les appelés du contingent), et corrélativement que l'âge de la survenue de l'infection a augmenté (Joussemet *et al.*, 1991), il apparaît que le risque d'hépatite A fulminante est en hausse dans un pays comme la France.

I.2.1.3 Virus des gastro-entérites

Les virus rassemblés sous cette appellation ont pour point commun de provoquer des diarrhées épidémiques et des vomissements.

- Rotavirus

Leurs propriétés morphologiques et leurs caractéristiques biochimiques ont permis de classer les rotavirus parmi la famille des *Reoviridae* (Holmes, 1991). Ce sont des virus de taille comprise entre 70 et 80nm, à ARN bicaténaire composé de 11 segments (Estes et Cohen, 1989) et d'une double capsid.

Depuis leur découverte, les rotavirus ont été associés aux gastro-entérites infantiles. Ces virus sont responsables de 35 à 50% des hospitalisations de jeunes enfants présentant une diarrhée sévère. Kapikian et Chanok (1990) rapportent en outre que chez les enfants âgés de 6 mois à 2 ans, l'infection est symptomatique dans 88% des cas alors que pour l'adulte, les symptômes n'apparaissent que dans 45% des cas.

- Réovirus

Ces virus appartiennent à la famille des *Reoviridae*, leur génome est constitué d'ARN bicaténaire segmenté en 10 fragments, leur capsid à symétrie icosaédrique est double. La taille de ces virus est de l'ordre de 70nm.

Les réovirus sont isolés du tractus respiratoire et entériques d'individus le plus souvent bien portants mais parfois atteints d'infections respiratoires ou digestives. En fait, la relation entre

la présence de ces virus et la survenue de gastro-entérites chez l'homme est peu claire (Champsaur, 1985).

- Virus de Norwalk

Les virus de Norwalk appartiennent à la famille des *Caliciviridae*, leur génome est constitué d'ARN monocaténaire et leur capsid est icosaédrique de taille comprise entre 26 et 32nm. Les manifestations cliniques qu'ils provoquent, surviennent après une incubation d'environ 48 heures et sont marquées par des nausées, vomissements, diarrhées, asthénies et fièvres.

Ce virus est souvent associé à des épidémies à transmission hydrique (Cannon *et al.*, 1991 ; Hedberg et Osterholm, 1993 ; Charlei et Ferchaud, 1994). Cependant, leur faible concentration, et le fait qu'ils ne sont pas cultivables sur cultures cellulaires, rendent leur détection difficile dans l'environnement.

- Calicivirus

Les calicivirus en forme d'étoile à 6 branches, appartenant à la famille des *Caliciviridae*, de taille comprise entre 30 et 38nm, sont associés à des épidémies de diarrhées cliniquement et épidémiologiquement proches de celles provoquées par le virus de Norwalk. Un ARN monocaténaire est présent dans la capsid icosaédrique.

- Astrovirus

Les astrovirus en forme d'étoile à 6 branches, nus à capsid icosaédrique de diamètre 28nm, ont un génome à ARN monocaténaire. Ils sont responsables de gastro-entérites chez l'enfant et chez l'adulte.

- Parvovirus-like

Les parvovirus-like associés à certaines épidémies dues à l'absorption de fruits de mer sont des virus non enveloppés à ADN monocaténaire et à capsid icosaédrique d'un diamètre de 20 à 25nm.

- Coronavirus

Les coronavirus sont des virus à ARN monocaténaire et contrairement à la majorité des virus entériques, ils possèdent une capsid tubulaire de longueur 120nm. Ils font partie de la famille de *Coronaviridae* et ont été associés à des gastro-entérites en particulier chez le nouveau-né.

- Coronavirus-like

Leur taille et leur structure sont similaires à celles des coronavirus, mais ils font partie de la famille des *Toroviridae* et sont responsables de gastro-entérite chez l'enfant et l'adulte.

I.2.1.4 Adénovirus

Les virus de la famille des *Adenoviridae* possèdent un ADN bicaténaire, à l'intérieur d'une capsid icosaédrique de diamètre 70 à 80nm. Ils provoquent pour la plupart, des infections conjonctivales et respiratoires, certains sérotypes possèdent également un pouvoir oncogène. Parmi les 41 sérotypes de Mastadénovirus susceptibles d'infecter l'homme, les adénovirus 40 et 41, dits « fastidieux » car difficilement cultivables, sont impliqués dans 4 à 8% des diarrhées aiguës chez le nourrisson âgé de moins de 2 ans (Adrian *et al.*, 1987). Après les rotavirus, les adénovirus 40 et 41 seraient la cause la plus fréquente de gastro-entérite chez les enfants (Uhnoo *et al.*, 1986 ; Cruz *et al.*, 1990). De plus, il semble que ces virus soient très résistants dans l'environnement (Enriquez *et al.*, 1995) et même si les données épidémiologiques sont rares, leur transmission par voie hydrique est actuellement fortement suspectée.

I.2.2 Bactériophages

Les bactériophages constituent un groupe viral extrêmement hétérogène et ne sont pas pathogènes pour l'homme. Leur classification en 9 familles est fondée sur la nature de leur acide nucléique et sur leur morphologie (Tableau 2).

Ces virus ont une taille qui varie de 20nm (*Leviviridae*) à 110 x 20nm (*Myoviridae*). Les phages les plus fréquemment décrits sont ceux qui possèdent une queue, et parmi ceux-ci les *Syphoviridae* qui représentent environ la moitié des 2000 phages connus.

Ce type de virus, constitué au minimum d'une molécule d'acide nucléique entourée d'une capside de nature protéique, infecte les bactéries à l'intérieur desquelles il se multiplie de la même manière que les virus d'animaux. Partout où il y a flore bactérienne, des bactériophages autochtones spécifiques de ces bactéries sont susceptibles d'être présents. La spécificité phagique peut être plus large ou plus étroite que les limites de la classification qui séparent les genres et les espèces bactériennes. En effet, certains phages ne peuvent se multiplier que sur une souche donnée d'*E. coli* alors que d'autres phages peuvent se multiplier sur de nombreuses souches différentes d'*E. coli* et même de *Salmonella* et *Shigella*.

Certains bactériophages tels que les coliphages, les phages à ARN F-spécifique et les phages de *Bacteroides fragilis* sont présents dans les selles de l'homme ou d'homéothermes. Ces phages présentent donc une alternative intéressante pour évaluer la contamination d'un milieu hydrique car ils sont en effet, présents en plus grande quantité que les virus entériques et leur détection est facile, rapide et de faible coût. L'évaluation de ces trois types de phages en tant qu'indicateurs de contamination virale sera abordée dans le paragraphe indicateurs de contamination virale.

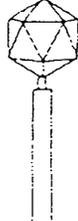
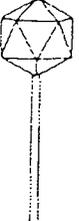
Myoviridae 1/4/6/7*  (P1, P2)		Siphoviridae 1/4/6/7*  (λ)		Podoviridae 1/4/6/7*  (T7)
Tectiviridae 1/5/6*  (PRD1)	Corticoviridae 1/4/6/7*  (PM2)	Microviridae 2/4/6/7*  (φX174)	Leviviridae 3/5/6/7*  (MS2, f2)	
Inoviridae 2/5*  (fd)			Cystoviridae 3/4/6*  (φ6)	
* 1 ADN bicaténaire * 2 ADN monocaténaire * 3 ARN bicaténaire * 4 Récepteurs spécifiques situés au niveau de la paroi bactérienne		* 5 Récepteurs spécifiques situés au niveau des pili sexuels * 6 Libération par lyse de la bactérie-hôte * 7 Absence de lipides dans la structure virale.		

Tableau 2 : Classification et caractéristiques des principaux groupes de bactériophages rencontrés dans le milieu hydrique d'après Jofre (1991).

I.3 Epidémiologie

La transmission des maladies virales par voie hydrique se fait essentiellement :

- directement par les eaux (consommation, baignade)
- indirectement par la consommation de fruits de mer ou de produits maraîchers irrigués avec des eaux usées ou provenant de sols amendés avec des boues d'épuration.

I.3.1 Transmission directe

La transmission directe de pathologie d'origine hydrique s'effectue dans la majorité des cas, soit par consommation d'eau, soit par baignades dans des zones contaminées.

Les traitements de potabilisation de plus en plus efficaces dans les pays industrialisés permettent de limiter le risque de contamination virale par la consommation d'eau potable. D'ailleurs, le fait que la prévalence du VHA chez les jeunes adultes français ait diminué ces dix dernières années de manière significative, traduit une amélioration des conditions d'hygiène individuelles et collectives, et en particulier de la qualité de l'eau (Dubois *et al.*, 1992). De plus, l'importance des traitements est soulignée par Tulchinsky *et al.* (1993) qui observent une diminution du nombre d'épidémies locales d'origine hydrique en Israël depuis que l'état a instauré la pratique obligatoire de la chloration.

Cependant si le risque virologique est extrêmement faible en sortie de filière de potabilisation moderne, il n'en est pas de même au niveau du robinet du consommateur.

Dans ce cadre, l'étude épidémiologique réalisée par Payment *et al.* (1991) est tout à fait éloquente. Ces auteurs ont sélectionné deux groupes de 300 familles. Le premier groupe consomme l'eau de robinet qui est exempte d'indicateurs de contamination fécale en sortie de station, le deuxième groupe est équipé de systèmes individuels de purification de l'eau par osmose inverse et consomme la même eau ainsi purifiée.

Il est observé une réduction globale de 30% des cas de gastro-entérites et d'infections respiratoires dans le deuxième groupe. La même réduction est observée chez des familles qui consomment l'eau directement prélevée à la sortie de la station de traitement (Payment, 1996). Dans le même temps, il n'est pas observé d'épidémies même locales, car les cas de maladies ne sont pas confinés ni dans le temps, ni dans l'espace. Cette observation limite l'hypothèse d'une contamination à la sortie de la station qui s'amplifierait tout au long du système de distribution.

Le questionnaire rempli par les malades a permis de déterminer que le taux d'hospitalisation pour des gastro-entérites ou d'infections respiratoires est de 0,7%, et que le taux de consultation chez un médecin est de 19%. De plus, 25% des personnes infectées ont fait l'objet d'un arrêt de travail d'au moins un jour.

Dans ces conditions, si on admet que 30% des infections sont dues à la consommation de l'eau du robinet, le coût associé à ce phénomène est estimé à plusieurs millions de dollars par an au Canada pour une population de 30 millions.

Même si l'agent infectieux n'est pas mis en évidence dans cette étude, celle-ci présente l'avantage de souligner que le risque d'infection par consommation d'eau de distribution est loin d'être négligeable et constitue un coût élevé pour la société.

Des bilans statistiques des différentes épidémies liées à la consommation d'eau, ont cependant pu être dressés par d'autres auteurs.

En Europe, Andersson et Stenström (1987) rapportent qu'en Suède la ressource souterraine est utilisée pour environ 50% de la production d'eau potable et que cette ressource souterraine non chlorée dans la moitié des cas est une cause majeure d'épidémies locales. Ils constatent que, entre 1975 et 1984, les virus ont été responsables de 27,1% des maladies d'origine hydrique, alors que 53,2% de ces maladies étaient d'origine indéterminée, 19,2% étaient d'origine bactérienne et 0,5% dues à des parasites.

Aux USA, l'étiologie des épidémies d'origine hydrique entre 1920 et 1992 est rapportée dans le tableau 3. Il apparaît que durant la période 1920-1940, 72% des épidémies étaient d'origine bactérienne, 0,4% d'origine parasitaire et 0,2% d'origine virale, alors que 27% étaient d'origine inconnue. A partir de cette période, le nombre d'épidémies d'origine bactérienne n'a cessé de décroître pour atteindre 10,3% entre 1985 et 1992, celui d'origine virale augmente jusqu'à la période 1961-1970 puis décroît pour atteindre 5,6% entre 1985 et 1992, enfin celui d'origine parasitaire n'a cessé d'augmenter pour atteindre 21,4% durant la période 1985-1995.

L'impact de ces épidémies sur le nombre de malades montre que les infections bactériennes diminuent légèrement depuis la période 1941-1960, alors que les infections virales et parasitaires augmentent depuis 1920. Il est intéressant de noter que cette augmentation est associée à une diminution d'infections d'étiologie inconnues. En raison de la difficulté de mise en évidence, notamment des virus des hépatites et des gastro-entérites, on peut raisonnablement considérer qu'une proportion importante d'épidémies d'étiologie non identifiée est de nature virale.

Il semblerait donc que si la généralisation des pratiques de chloration aux USA a permis d'abaisser l'incidence relative des infections bactériennes, elle apparaît insuffisante pour enrayer l'augmentation de l'incidence relative des infections virales et parasitaires.

Période	Etiologie	Impact sur le nombre d'épidémies	Impact sur le nombre de malades
1920-1940	B	72%	8,7%
	V	0,2%	<0,1%
	GEEI	27%	90,5%
	P	0,4%	0,7%
1941-1960	B	30%	16,5%
	V	5,7%	1,4%
	GEEI	62,5%	82%
	P	0,7%	<0,1%
1961-1970	B	35,4%	10,2%
	V	23,1%	1,9%
	GEEI	30%	57,2%
	P	4,6%	0,5%
1971-1988	B	10,8%	9,1%
	V	8,9%	9,1%
	GEEI	49,5%	47%
	P	20,9%	32%
1985-1992	B	10,3%	7,5%
	V	5,6%	13%
	GEEI	55,6%	39,4%
	P	11,4%	39,2%

Tableau 3 : Etiologie des épidémies d'origine hydrique aux USA entre 1920 et 1992 d'après Quignon 1995 (B = bactéries ; V = virus ; GEEI = gastro-entérites d'origine indéterminée ; P = parasites).

En ce qui concerne les eaux de loisirs, une relation entre baignades et survenue d'infections virales est plus rarement constatée (Cabelli *et al.*, 1982 ; Koopman *et al.*, 1982 ; Cabelli *et al.*, 1983 ; Fattal et Shuval, 1989). Cependant, certaines études démontrent un taux de gastro-entérites et d'infections respiratoires plus élevé lorsque les nageurs évoluent dans des eaux contenant des concentrations importantes en indicateurs de contamination fécale (Medema *et al.*, 1996 ; Ashbolt *et al.*, 1996 ; Lee *et al.*, 1996).

Les virus essentiellement responsables des épidémies à transmission directe sont les entérovirus, les virus des hépatites A et E, le virus de Norwalk, les rotavirus et les adénovirus 40 et 41. (tableau 4).

Virus	Types d'eaux	Mise en évidence du virus	Preuves d'épidémies	Auteurs
Poliovirus	EA	+	(+)	Lippy and Waltrip (1984)
Virus coxsackie	EA EP	+	(+)	Hejkal <i>et al.</i> (1982) Cabelli <i>et al.</i> (1983)
Echovirus	EA	+	(+)	Cliver (1984)
VHA	EA	+	+	Craun (1988) Birch and Gust (1989) Bosch <i>et al.</i> (1991)
VHE	EA	-	+	Wong <i>et al.</i> (1980) Khuroo <i>et al.</i> (1980) Ramalingaswami and Purcelle (1988)
Rotavirus	EA EP	+	+	Tulchinsky <i>et al.</i> (1982) Murphy <i>et al.</i> (1983) Hung <i>et al.</i> (1984) Gerba <i>et al.</i> (1985) Anderson and Strenström (1987)
Virus de Norwalk	EA EP	-	+	Koopman <i>et al.</i> (1982) Kaplan <i>et al.</i> (1982) Blacklow and Cukor (1982)
Adénovirus	EA EP	+	+	Murphy <i>et al.</i> (1983) Payne <i>et al.</i> (1984)

EA : Eaux d'alimentation ; EP : Eau de piscine ; (+) : peu d'information

Tableau 4 : Cas de maladies virales d'origine hydrique d'après Jehl-Pietri (1992).

Les entérovirus « classiques » (coxsackievirus, Echovirus) sont facilement mis en évidence sur culture cellulaire, mais paradoxalement les preuves épidémiologiques d'une infection par ces virus à la suite de consommation d'eau dans les pays industrialisés restent exceptionnelles. Hejkal *et al.*(1982) et Cliver (1984) font cependant état d'épidémies ayant pour origine la consommation d'une eau d'adduction contaminée respectivement par des coxsackievirus B₁ et B₂ et par un virus Echo 4.

A l'inverse, les virus des hépatites et des gastro-entérites difficilement mis en évidence sont impliqués dans de nombreuses épidémies à transmission hydrique directe. Le virus de l'hépatite A a été isolé de l'eau de boisson, notamment par Gerba *et al.* (1985) et a été reconnu comme responsable de plusieurs épidémies (Batik *et al.*, 1980 ; Hejkal *et al.*, 1982 ; Morgado *et al.*, 1982 ; Bergeisen *et al.*, 1985 ; Anderson et Strenström, 1987 ; Arce-Gomez *et al.*, 1987 ; Craun, 1988 ; Bosch *et al.*, 1991).

Le virus de l'hépatite E a été reconnu comme responsable d'une épidémie survenue à New Dehli en 1955-56 où 30000 personnes ont été atteintes (Wiswanathan, 1957 ; Wong *et al.*, 1980).

Bon nombre d'épidémies de gastro-entérites dues à la présence de virus de Norwalk ou de virus apparentés ont été rapportées (Gerba *et al.*, 1985 ; Hedberg et Osterholm, 1993 ; Hunter, 1994) comme étant d'origine hydrique.

Les rotavirus ont été également associés à ce type d'épidémie (Ansari *et al.*, 1991 ; Gerba *et al.*, 1985). La plus importante épidémie à rotavirus décrite à ce jour, a eu lieu en Chine avec plus d'un million de personnes contaminées (Hung, 1988). Cette épidémie a débuté par la consommation d'eau contaminée, puis les infections se sont transmises d'individu à individu.

Enfin, en ce qui concerne les adénovirus, ils ont été clairement associés à des pharyngo-conjonctivites à la suite de baignades en piscine (Payne *et al.*, 1984). De plus, les adénovirus 40 et 41 sont fortement suspectés d'être à l'origine d'épidémies de gastro-entérites transmises à l'homme par voie hydrique.

1.3.2 Transmission indirecte

La contamination virale par voie hydrique indirecte s'effectue pour une grande partie par la consommation de fruits de mer. Là encore, les virus responsables sont essentiellement les virus des gastro-entérites et des hépatites, mais des Echovirus ont pu être isolés à partir de clams (Wait *et al.*, 1983) et des coxsackievirus A dans les huîtres et les moules (Denis et Brisou, 1976).

En ce qui concerne le virus de l'hépatite A, il a été montré en Italie que la consommation de moules constituait un facteur de risque (Mele *et al.*, 1987).

En France, des épidémies d'hépatite A sont survenues en Loire Atlantique et dans le Morbihan de fin décembre 1991 à mars 1992. Environ 800 cas d'hépatite A ont été recensés sur les 2 départements et la cause la plus probable évoquée est l'ingestion de coquillages (Niuouet *et al.*, 1993).

L'épidémie d'hépatite A la plus spectaculaire a eu lieu à Shangai en 1988 avec 300000 cas d'hépatite A, dont 32 mortels. L'épidémie a été provoquée par l'ingestion de palourdes crues contaminées (Halliday *et al.*, 1991 ; Tang *et al.*, 1991).

Les épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de fruits de mer sont nombreuses. Parmi les virus en cause, on distingue le virus de Norwalk (Linco and Grohmann, 1980 ; Gunn *et al.*, 1982 ; Morse *et al.*, 1986), et les « small round » virus (Gill *et al.*, 1983 ; Sekine *et al.*, 1989).

A notre connaissance, aucune épidémie n'a été associée à la présence de rotavirus dans les coquillages. Cependant, les coquillages sont rarement consommés par les jeunes enfants et chez l'adulte, l'infection est le plus souvent asymptomatique (Ansari *et al.*, 1991).

D'après Richard (1985) et Gerba (1988), il serait constaté aux USA une augmentation des épidémies de gastro-entérites liées à la consommation de fruits de mer. En effet, une dizaine d'épidémies était recensée entre 1966 et 1970, une vingtaine entre 1976 et 1980 et plus de 50 entre 1981 et 1985.

Le nombre important d'épidémies liées à la consommation de fruits de mer est parfaitement compréhensible, si on se fonde sur le mode d'alimentation de ces mollusques. En effet, ils peuvent filtrer jusqu'à 20 litres d'eau par heure et concentrer ainsi les micro-organismes présents dans l'eau de mer.

Pour limiter la contamination humaine liée à ce phénomène, il existe des traitements de dépuración, qui consistent à placer les fruits de mer dans une eau exempte de micro-organismes pathogènes ou dans un courant d'eau désinfecté en permanence par un traitement UV. Cependant, des épidémies liées à la présence de virus entériques ont été mises en évidence (Gill *et al.*, 1983 ; Sockett *et al.*, 1985 ; Pain, 1986 ; Heller *et al.*, 1986) à la suite de consommation de coquillages ayant subi une dépuración.

Des contaminations par d'autres aliments ont été rapportées notamment des épidémies d'hépatite virale consécutives à la consommation de fraises (Niu *et al.*, 1992), de cresson (Hutcheson, 1971) et de salades (Rosenblum *et al.*, 1990). De plus, une épidémie due au virus de Norwalk à la suite de la consommation de glace a été rapportée aux USA (Cannon *et al.*, 1991).

II Détection des virus dans le milieu hydrique

Dans les échantillons d'eaux provenant de l'environnement, la densité virale est souvent peu élevée, et dans ces conditions, mis à part pour les eaux usées brutes, il est nécessaire de concentrer sous un faible volume, les virus présents dans un volume plus important avant de procéder à leur détection.

II.1 Méthodes de concentration

Il existe de nombreuses méthodes de concentration répertoriées dans la littérature, celles décrites dans cette partie sont les plus utilisées. La méthode de concentration doit être choisie en fonction :

- du type de virus recherché, en effet certaines méthodes nécessitent une acidification de l'eau avant concentration et certains virus comme les rotavirus et les bactériophages risquent d'être inactivés dans ces conditions ;

- du type d'eau à analyser. La présence de matières en suspension peut provoquer le colmatage rapide notamment des filtres ;

- de la méthode de détection. Les méthodes de détection du génome viral mettent en jeu des réactions enzymatiques très sensibles aux inhibiteurs tels que acides humiques, protéines, glycoènes...

Les méthodes de concentration utilisant de grands volumes permettent la concentration primaire, celles utilisant de faibles volumes sont plutôt adaptées à la concentration secondaire.

II.1.1 Concentrations primaires

II.1.1.1 Méthodes d'adsorption-élution

Ces méthodes sont fondées sur le principe d'adsorption-élution des virus sur différents supports. Les supports utilisés varient par leur nature et leur charge.

La plupart des virus présents dans le milieu hydrique sont des virus nus entourés d'une capsidie protéique (entérovirus, HAV...). La capsidie composée de polypeptides contenant des acides aminés à groupements ionisables fournit au virus une charge électrique pH dépendante. Le pH isoélectrique (pHi) fournit une information concernant la charge globale dans des conditions de pH donné. Il varie non seulement avec le type viral mais aussi avec la souche. Ainsi, le poliovirus 1 souche Mahoney, le poliovirus 1 souche Sabin et le bactériophage T₂ ont un pHi respectivement de 8,2 ; 6,6 et 4,2 (Gerba, 1984).

De plus la capsidie protéique des *Picornaviridae* comprend de 40 à 50% d'acides aminés non polaires (Wait *et al.*, 1983), susceptibles de provoquer des interactions hydrophobes avec un support donné.

Ces données indiquent que les interactions virus-solide peuvent être électrostatiques ou hydrophobes. Shields et Farrah (1983) montrent qu'à pH9, l'ajout de sels anti-chaotropes augmente la rétention du poliovirus sur filtre membranaire. Cette rétention du poliovirus est

compensée par l'ajout de sels chaotropes. A pH4, aucun de ces sels n'affecte l'adsorption virale.

Ces auteurs concluent qu'à pH4, les interactions électrostatiques dominent et qu'à pH9, dominent les interactions hydrophobes.

Des agents chaotropes comme des détergents (Tween 80, NP40, urée) ou des gros ions (Cl_3COO^- , SCN^- ...) et des agents antichaotropes comme des petits ions (F^- , H_2PO_4^- , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} ...) ont été utilisés respectivement pour la désorption et l'adsorption virales vis à vis de filtres membranaires (Wait et Sobsey, 1983). Les agents chaotropes défavorisent les interactions hydrophiles et peuvent être utilisés pour éluer les virus (Vanden Bossche *et al.*, 1994). Les agents antichaotropes favorisent les interactions hydrophiles et peuvent favoriser l'adsorption virale.

- **Supports à charge négative.**

La concentration des virus sur ce type de support nécessite une acidification de l'eau à analyser à pH environ 3,5 et une addition d'agents chaotropes de type MgCl_2 , AlCl_3 ...

Ces conditions expérimentales ont pour but d'obtenir une charge globale positive au niveau des capsides virales et de favoriser l'adsorption par la présence d'agents chaotropes.

Les interactions virus-support dans ces conditions sont essentiellement de type électrostatique.

⇒ *Filtres électronégatifs*

Les filtres électronégatifs sont composés de mélange d'esters de cellulose, d'époxy-fibre de verre ou de microfibre de verre borosilicaté-résine époxy. Ils permettent l'adsorption des virus à des pH inférieurs à leur pHi. Ce type de méthodologie nécessite donc une acidification de l'eau à concentrer généralement en présence d' AlCl_3 qui favorise l'adsorption virale (Guttman-Bass *et al.*, 1984). Les virus sont élués des filtres à l'aide de solutions alcalines (Toranzo et Gerba, 1989).

Ces filtres seuls sont d'un intérêt limité car inadaptés à la concentration virale d'eaux chargées en matières en suspension (MES) de type eaux usées brutes ou traitées (colmatage des filtres). De plus, pour les autres types d'eaux, l'acidification de l'échantillon a pour effet de précipiter les acides humiques qui colmatent rapidement les filtres (Ma *et al.*, 1994a). Ces filtres ne peuvent donc être utilisés que pour des eaux faiblement chargées en MES et en matières organiques. Il est possible cependant d'utiliser des préfiltres permettant d'augmenter le volume filtré. Il existe, en effet toute une gamme de préfiltres selon le type d'eau à analyser

et il appartient au manipulateur de choisir la bonne gamme selon les conditions expérimentales (Schwartzbrod, 1991).

Ce type de filtres est souvent utilisé pour concentrer les entérovirus ou le virus de l'hépatite A à partir de grands volumes d'eaux d'alimentation (200 à 1000 litres) et est associé à une concentration secondaire (Stetler *et al.*, 1992 ; Prevot *et al.*, 1993).

Des rendements de l'ordre de 40 à 60% sont rapportés lors de la concentration du coxsackievirus B₅ dans des eaux d'alimentation (Stetler *et al.*, 1992). Cependant pour les coliphages, ce rendement est de l'ordre de seulement 4 à 12%.

⇒ *Poudre de verre*

La poudre de verre est composée de verre pyrex borosilicaté concassé à une granulométrie comprise entre 100 et 200 μm . Ce support est chargé négativement et permet l'adsorption des virus à des pH inférieurs à leur pHi (Sarrette *et al.*, 1977). Comme pour les filtres électronégatifs, cette méthodologie demande l'acidification de l'eau à pH acide, et l'élution est réalisée en milieu alcalin en présence de protéines.

La différence majeure avec les filtres électronégatifs se situe au niveau de l'appareillage. En effet, la filtration s'effectue de manière ascensionnelle au travers d'une masse de poudre de verre en lit fluide.

Depuis 1978 (Schwartzbrod et Lucena, 1978), de nombreux auteurs ont apporté des modifications à l'appareillage, Hugues *et al.* en 1979, Ribas *et al.* en 1986 et enfin Senouci et Schwartzbrod en 1996 (com. pers.).

Ce type de concentration est difficile à utiliser sur le terrain mais présente un grand intérêt au niveau du laboratoire. En effet, la concentration sur filtre dynamique évite tout problème de colmatage et peut donc être adaptée à tous les types d'eaux.

Cette méthodologie permet d'obtenir 100% d'échantillons positifs lors de la recherche d'entérovirus dans des eaux usées traitées avec un meilleur rendement sur la poudre de verre que sur des filtres chargés négativement (Joret *et al.*, 1980). Elle est donc préconisée pour la détection de virus à partir d'eaux chargées en matières en suspension et qui permettent une analyse sur des volumes transportables en laboratoire (10 à 50 litres). Cependant, elle permet aussi d'obtenir de bons rendements en eaux d'alimentation qui sont supérieurs à 98% pour le poliovirus 1 (Senouci com. pers.), tandis que pour le coliphage somatique T6 ces mêmes auteurs obtiennent des rendements de 6 à 8%.

Hugues *et al.* (1993) utilisent la poudre de verre pour la mise en évidence sur culture cellulaire des entérovirus dans des eaux usées traitées et obtiennent 46% d'échantillons

positifs. De même Puig *et al.* (1994) détectent des entérovirus et des adénovirus respectivement par RT-PCR et PCR dans 100% d'échantillons d'eau de rivière concentrée de cette manière.

Cette méthode de concentration est souvent associée à une étape de concentration secondaire de type précipitation par le polyéthylène glycol (PEG), floculation organique ou ultrafiltration.

Ces supports à charge négative ne semblent pas adaptés pour la concentration de virus relativement fragiles et sensibles aux pH acides comme les bactériophages et les rotavirus. Cependant, ces derniers ont pu être isolés dans des eaux usées traitées après concentration par Bosch et al. en 1986 et par Schwartzbrod et al. en 1983.

- **Supports à charge mixte (laine de verre)**

L'adsorption des virus s'effectue dans ce cas, sur laine de verre sodocalcique ensimée définie comme support à charge mixte. L'adsorption virale est réalisée au pH naturel de l'eau par l'intermédiaire de charges électrostatiques et hydrophobes présentes à la fois à la surface des particules virales et de la laine de verre.

La concentration s'effectue par filtration de l'eau à analyser sur de la laine de verre prétraitée, compactée dans une cartouche en acier inoxydable. L'élution des virus est réalisée en milieu alcalin et en présence d'extrait de boeuf.

Cette méthodologie dont les modalités techniques sont rapportées dans la norme AFNOR XTP 90-451, ne nécessite aucun prétraitement de l'eau à concentrer évitant ainsi la sélection des virus acido-résistants. Elle présente des risques de colmatage qui sont cependant moins importants qu'avec les filtres classiques. La concentration sur laine de verre est adaptée à l'étude sur le terrain et permet la filtration de grands volumes de tous les types d'eaux.

Le rendement de la méthode est de l'ordre de 74% pour le poliovirus 1 dans de l'eau d'alimentation, de 48% dans des eaux résiduaires brutes et de 56% dans les eaux résiduaires traitées (Vilaginès *et al.*, 1992). Il faut cependant noter que le rendement de 56% obtenu dans les eaux résiduaires traitées est obtenu après une concentration secondaire par floculation organique selon Katzenelson *et al.* (1976).

Selon Hugues *et al.*, (1993), la concentration sur laine de verre permettrait d'obtenir de meilleurs rendements que celle utilisant la poudre de verre. En effet, ces auteurs obtiennent en eaux usées traitées respectivement 86% et 46% d'échantillons positifs en entérovirus sur support laine de verre et poudre de verre. Par contre avec le même type d'eau, Senouci (Com. pers.) obtient des pourcentages équivalents de l'ordre de 50% pour les deux supports.

Cette méthodologie n'est pas adaptée à la concentration des coliphages T6 puisqu'elle ne permet d'obtenir que des rendements de l'ordre de 3% en eau d'alimentation artificiellement contaminée (Senouci et Schwartzbrod, 1996). Par contre, des entérovirus, des astrovirus et des « small round virus » ont été mis en évidence par cette technique dans des eaux usées traitées et dans des eaux de surface (Hugues *et al.*, 1993 ; Marx *et al.*, 1995 ; Woolfaardt *et al.*, 1995).

La concentration sur laine de verre est souvent associée aux mêmes étapes de concentration secondaire que la poudre de verre.

La concentration sur laine de verre est en théorie applicable à tous les virus et tous les types d'eaux, mais les expérimentations réalisées avec des bactériophages ont montré que les rendements obtenus étaient très faibles. Par ailleurs, cette méthodologie est utilisable pour des analyses sur le terrain.

- **Supports à charge positive (Filtres électropositifs)**

La concentration des virus au pH naturel de l'eau permet l'adsorption des particules virales de charge globale négative sur des filtres à charge positive par des liaisons de type électrostatique. Cependant les pHi de certains virus se situent à des pH voisins de la neutralité et dans ces conditions, l'adsorption sur les membranes électropositives ne peut s'interpréter que par la mise en jeu d'interactions non seulement électrostatiques mais aussi de type hydrophobe.

Les filtres électropositifs sont composés de cellulose à charge modifiée (type Zeta-plus et Virosorb 1-MDS) et restent chargés positivement pour des pH allant jusqu'à 8. Ils permettent d'adsorber 99% de poliovirus présents dans des eaux d'adduction sans modification de l'eau à analyser (Dizer *et al.*, 1982 ; Sobsey et Glass, 1980).

L'élution des virus est réalisée à pH alcalin en présence d'extrait de boeuf jouant le rôle de compétiteur pour les sites d'adsorption virale.

Ce type de concentration ne semble pas adapté à l'analyse d'eau usée traitée ou non pour des problèmes de colmatage. Mais là encore, l'existence de préfiltre permet d'augmenter le volume d'eau filtrée.

Les rendements de cette méthodologie sont dans l'eau d'alimentation de l'ordre de 76% pour le poliovirus 1, 31% pour les coliphages et 23% pour les rotavirus (Ma *et al.*, 1994a). La simplicité d'utilisation et les rendements satisfaisants obtenus expliquent que la concentration sur filtres électropositifs soit largement utilisée pour la détection des entérovirus dans les eaux de surfaces et d'alimentation (Kopecka *et al.*, 1993 ; Ma *et al.*, 1994a ; Wyn-Jones *et al.*, 1995). Elle est aussi préférentiellement choisie pour la concentration des virus

sensibles aux pH acides tels que les rotavirus (Keswick *et al.*, 1984 ; Rose *et al.*, 1987 ; Dahling *et al.*, 1989) et est souvent associée à une étape de concentration secondaire (PEG, floculation organique).

La concentration sur filtres électropositifs est applicable à tous les virus, à tous les types d'eaux et à l'analyse sur le terrain. Elle présente cependant des problèmes de colmatage avec les eaux fortement chargées en matières en suspension.

II.1.1.2 Ultrafiltration

L'eau à traiter est amenée sur l'ultrafiltre cellulosique ou polysulfonique défini par son seuil de coupure ou poids moléculaire nominal limite (pmnl) qui peut varier de 10^3 à 10^6 daltons. En ce qui concerne les virus, des membranes en polysulfonate avec un seuil de coupure de 100 kD sont préconisées. Les molécules de poids moléculaire inférieur au seuil de coupure (sels, acides aminés, sucres...) sont susceptibles de traverser la membrane et se retrouvent dans l'ultrafiltrat. En revanche, les macromolécules dont les virus, restent dans le rétentat.

L'ultrafiltration a été proposée depuis plusieurs années pour concentrer les entérovirus (Berman *et al.*, 1980 ; Jansons et Bucens, 1986 ; Divizia *et al.*, 1989a ; Garin *et al.*, 1993).

L'ultrafiltration tangentielle présente un risque de colmatage faible et ne nécessite aucun prétraitement de l'eau à analyser. Cependant, certains auteurs recommandent un prétraitement de la membrane d'ultrafiltration notamment de type cellulosique avec une solution protéique pour minimiser l'adsorption des virus sur la membrane (Divizia *et al.*, 1989b).

Ces systèmes restent cependant coûteux et l'étape de concentration est longue pour les eaux fortement chargées en matières en suspension.

Les rendements de récupération sont de l'ordre de 55% à 83% pour les entérovirus (Berman *et al.*, 1980 ; Garin *et al.*, 1993 ; Divizia *et al.*, 1989b) pouvant aller jusqu'à 100% pour le VHA (Divizia *et al.*, 1989b).

Cette méthodologie est aussi utilisée en tant qu'étape de concentration secondaire avec des systèmes à usage unique (Tsai *et al.*, 1993 ; Tsai *et al.*, 1994).

En ce qui concerne les phages de *Bacteroides fragilis*, en eau désionisée, l'ultrafiltration tangentielle permet d'obtenir des rendements de récupération de l'ordre de 87% (Vantefon, 1995). Mais cet auteur observe une altération rapide de la membrane d'ultrafiltration avec un

pourcentage de récupération de 99% sur les 4 premiers échantillons testés et un pourcentage de 14% sur les 6 échantillons suivants.

L'ultrafiltration est adaptée à la concentration de tous les types de virus dans toutes les eaux et les rendements obtenus pour les phages de Bacteroides fragilis sont élevés. Cependant, cette méthodologie reste coûteuse et les rendements semblent diminués rapidement en fonction du nombre d'utilisation de la membrane.

II.1.1.3 Conclusion

Les méthodologies les plus utilisées pour la concentration des virus du milieu hydrique sont fondées sur des principes, soit d'adsorption-élution, soit de séparation en fonction du poids moléculaire. Le choix de la technique de concentration dépend essentiellement du type de virus et du type d'eau à analyser.

Si on considère la détection des entérovirus et des bactériophages dans une eau faiblement chargée en matières en suspension, les rendements obtenus sont résumés dans le tableau 5.

Support de concentration	Rendement	
	Entérovirus	Bactériophages
Filtres négatifs	40 à 60%	4 à 12%
Poudre de verre	98%	6 à 8%
Filtres positifs	76%	31%
Laine de verre	74%	3%
Ultrafiltration	55 à 86%	14 à 100%

Tableau 5 : Rendements de concentration des entérovirus et des bactériophages en eau d'alimentation

Il apparaît que pour les entérovirus, la poudre de verre permet d'obtenir les meilleurs rendements (98%), puis la laine de verre, les filtres électropositifs (74% et 76%), les filtres électronégatifs et l'ultrafiltration (40 à 60% et 55 à 86%) qui semblent avoir des rendements plus variables. En ce qui concerne les bactériophages, seule l'ultrafiltration permet d'obtenir des rendements acceptables mais les membranes semblent s'altérer rapidement. Dans ces conditions pour concentrer les bactériophages, la méthode préconisée par Lucena *et al.* (1995)

qui consiste à filtrer l'eau sur une membrane inorganique et qui permet d'obtenir des rendements de l'ordre de 50%, demeure une des plus compétitives.

Pour des eaux usées traitées, potentiellement chargées en matières en suspension, les concentrations sur poudre de verre, laine de verre semblent les plus adaptées. Dans ce type d'eau, les rendements attendus pour les entérovirus sont de l'ordre de 60% et semblent identiques pour la laine de verre et la poudre de verre (Senouci com. pers.).

L'étape de concentration sur poudre ou laine de verre est souvent associée à une étape de concentration secondaire de type précipitation par le PEG, floculation organique ou ultracentrifugation, afin de réduire le plus possible le volume du concentrat.

II.1.2 Concentrations secondaires

La concentration secondaire est utilisée lorsque le volume obtenu après concentration primaire est important, et elle permet de diminuer le volume de l'échantillon final. Le plus souvent, ces techniques sont basées sur un principe de précipitation, soit par acidification du concentrat primaire (floculation organique) lorsque l'échantillon est de nature protéique (Katzenelson *et al.*, 1976), soit par addition de divers agents chimiques tel que le sulfate d'ammonium (Shields et Farrah, 1986 ; Armon *et al.*, 1988) ou le polyéthylène glycol (PEG) (Biziagos *et al.*, 1987). L'ultracentrifugation est aussi souvent utilisée à ce stade.

II.1.2.1 Floculation organique

La floculation organique consiste à acidifier le concentrat primaire à pH 3,5 pour amener les protéines présentes à un pH inférieur à leur pHi provoquant ainsi leur floculation. Les virus éventuellement présents sont emprisonnés dans le floc. Après centrifugation, le culot contenant les virus est repris dans un faible volume de solution tampon (Katzenelson *et al.*, 1976).

Cette technique largement utilisée (Ma *et al.*, 1994a ; Ma *et al.*, 1995 ; Vilaginès *et al.*, 1993) présente l'avantage d'être simple, économique et très rapide. Elle est d'ailleurs proposée en tant que concentration secondaire pour l'analyse d'eau de distribution dans la norme AFNOR XTP 90-451.

II.1.2.2 Précipitation par le sulfate d'ammonium

Cette précipitation, variante de la floculation organique, a l'avantage de précipiter les protéines à un pH neutre (Shields et Farrah, 1986). Elle est basée sur la propriété de la solution de sulfate d'ammonium de précipiter les protéines en solution. Cette méthodologie s'applique donc aux virus acido-sensibles tels que les bactériophages ou les rotavirus, mais nécessite la présence de 10% d'extrait de boeuf. La présence de grande quantité d'extrait de boeuf est susceptible de provoquer une inhibition des réactions enzymatiques lorsque la détection des virus est réalisée par RT-PCR.

II.1.2.3 Précipitation par le Polyéthylène glycol (PEG)

Le PEG est un polymère synthétique qui piège l'eau autour des particules virales et provoque ainsi leurs précipitations. En général, du PEG 6000 est utilisé pour réaliser cette étape.

La précipitation peut s'effectuer à partir de n'importe quel type de solution protéique ou non. Cette concentration secondaire permet d'obtenir des rendements satisfaisants (Le Guyader *et al.*, 1995) et souvent proches de 100% (Schwartzbrod, 1991). Cependant, l'inconvénient majeur est la durée de la précipitation qui demande 12 heures par rapport à la floculation organique réalisable en 1 heure.

II.1.2.4 L'ultracentrifugation

L'ultracentrifugation est utilisée depuis des années pour la purification et l'analyse des virus et reste une excellente méthode de concentration (Payment et Trudel, 1985a ; Trudel et Payment, 1993).

Après avoir clarifié la suspension virale, une force gravitationnelle d'au moins 100000g pendant 1 heure est appliquée aux virus qui sont récupérés dans le culot.

Cependant, l'infectiosité du virus ainsi concentré peut diminuer en raison de la centrifugation à haute vitesse et ainsi la mise en évidence ne sera pas pleinement efficace. Par contre, la détection d'acides nucléiques peut parfaitement être réalisée à partir du culot.

Dans le cas d'une comparaison présence de génomes et présence de particules infectieuses, cette méthode est à éviter car elle apporte un biais supplémentaire en faveur de la présence de génomes.

L'intérêt d'une étape de concentration secondaire reste très controversé et dépend de la nature de l'eau et de la méthode de détection des virus.

Lorsque les virus sont détectés sur culture cellulaire, de nombreux auteurs montrent qu'à partir des concentrats secondaires (PEG, floculation organique), il est obtenu des rendements inférieurs à ceux observés dans les concentrats primaires (Hugues et al., 1993 ; Senouci et Schwartzbrod, 1996), notamment à partir d'eaux usées traitées.

Lorsque le génome des entérovirus est détecté par RT-PCR, le problème majeur rencontré après concentration secondaire est l'augmentation des inhibiteurs de réactions enzymatiques dans l'échantillon à analyser . Abbaszadegan et al. (1993) observent une forte inhibition après concentration d'eaux de surface sur filtres électropositifs suivie d'une floculation organique et proposent des étapes de purification (Sephadex G-200, Chelex-100 ...). Etant donné la grande sensibilité de la RT-PCR, certains auteurs vont même jusqu'à déconseiller toute étape de concentration quelle qu'elle soit dans les eaux de surface (Kopecka et al., 1993).

En fait, le faible volume analysé par RT-PCR (voisin de 25 µL) semble très peu représentatif de la contamination virale d'un milieu hydrique, une méthode de concentration doit donc être préconisée. Le système idéal serait une méthodologie de concentration virale présentant un rendement de concentration maximum pour les virus et minimum pour les matières organiques.

II.2 Mise en évidence des virus

Dans la majorité des cas, l'analyse virologique s'effectue après concentration de l'échantillon, mais compte tenu de la grande sensibilité de certaines méthodes de détection , et notamment de la Polymerase Chain Reaction, il est possible d'obtenir des résultats positifs directement à partir de certains types d'eaux.

Cinq types de méthode de détection peuvent être envisagés :

- la microscopie électronique
- la culture cellulaire
- l'inoculation à l'animal
- les techniques immunologiques
- les méthodes de biologie moléculaire

II.2.1 Microscopie électronique

Les échantillons sont observés après coloration négative qui consiste à amplifier les contrastes par utilisation de sels de métaux lourds (Alain *et al.*, 1987). Il s'agit d'une des méthodes les plus rapides pour détecter un virus dans un liquide. Cependant, le diagnostic de présence virale n'est effectué qu'à partir de critères de taille et de forme, et il existe des risques de confusion entre certains bactériophages (*Leviviridae*) et virus (*Picornaviridae*).

Elle permet néanmoins de mettre en évidence un adénovirus, un astrovirus, un calicivirus, un entérovirus ou un adénovirus, sans pour autant déterminer le type viral.

La microscopie électronique présente l'inconvénient majeur d'avoir une sensibilité qui est de l'ordre de 10^6 particules virales. Et malgré les techniques d'immunomicroscopie électronique qui ont été mises au point pour abaisser le seuil de détection et ajouter un critère de spécificité immunologique au critère morphologique, sa sensibilité reste insuffisante pour la détection de virus dans le milieu hydrique.

II.2.2 Culture cellulaire

Selon le type de virus recherché, il est possible de considérer trois cas de figure. Il existe en effet :

- les virus qui provoquent un effet cytopathogène (ECP) et qui peuvent donc être directement mis en évidence ;
- les virus qui se multiplient mais ne provoquent pas d'ECP et dont la multiplication doit être révélée de manière secondaire à l'aide d'autres techniques ;
- les virus qui ne se multiplient pas sur culture cellulaire et qui ne peuvent donc pas être isolés.

- Virus provoquant un ECP

L'échantillon à analyser est inoculé sur un tapis cellulaire *in vitro*. Le virus se multiplie alors aux dépens des cellules et au bout d'un temps d'incubation variable (4-8 jours), il apparaît un ECP caractéristique. La majorité des entérovirus, des réovirus et des adénovirus sont mis en évidence par cette méthodologie, mais la sensibilité varie selon la lignée cellulaire et le virus (tableau 6).

Ainsi, les adénovirus 40 et 41 ne se multiplient pas sur les systèmes cellulaires classiques (Hela, KB, BGM...), contrairement aux autres sérotypes (1 à 39), par contre sur des cellules d'hépatocarcinome humain (PLC / PRF / 5), ils provoquent un ECP.

Certaines souches de coxsackievirus A ne se multiplient pas sur culture cellulaire mais il est possible de les mettre en évidence par inoculation à l'animal (souriceau nouveau-né).

Cellules	Virus						
	Poliovirus	Coxsackie A	Coxsackie B	Echovirus	Réovirus	Adénovirus (1 à 39)	Adénovirus (40 et 41)
BGM	+	-*	+	+	+	+/-	-
Véro	+	-*	+	+	+	+/-	-
Hela	+	-*	+/-	+/-	+	+	-
KB	+	-*	+/-	+/-	+	+	-
Hep2	+	-*	+/-	+/-	+	+	-
RD	+	-*	-	+	+/-	+	-
MRC5	+	-*	-	+	+/-	+	-
PLC/PRF/5							+

* à l'exception de certaines souches

Tableau 6 : Sensibilité de différents systèmes cellulaires pour l'isolement des virus entériques provoquant un effet cytopathogène.

En pratique, pour les virus provoquant un ECP, il est d'une part conseillé d'utiliser plusieurs systèmes cellulaires pour augmenter la sensibilité de la technique et élargir le spectre de détection, et d'autre part de réaliser une, voire deux subcultures, ce qui permet d'augmenter le pourcentage de positifs d'au moins 20% (Foliguet *et al.*, 1966).

La quantification virale peut s'effectuer soit en milieu liquide sur des microplaques de 96 cupules par la méthode du NPP (Maul, 1991), soit en milieu solide par numération du nombre de plages de lyse.

La méthode d'isolement des virus sur culture cellulaire présente l'avantage de pouvoir témoigner du caractère infectieux du virus, mais elle est cependant longue (au moins une semaine) et nécessite un personnel qualifié ainsi que des structures adaptées à la culture cellulaire.

- Virus ne provoquant pas d'ECP

Parmi cette catégorie, il est possible de distinguer certaines souches de rotavirus capables de se multiplier rapidement sur culture cellulaire (MA104), sans provoquer d'ECP et le virus de l'hépatite A qui se multiplie très lentement (6 à 10 semaines) (Crance *et al.*, 1983). La mise en évidence d'une multiplication virale peut être réalisée par différentes méthodes :

- L'immunofluorescence in situ qui permet de révéler la présence d'antigènes à l'aide d'anticorps fluorescents. Par exemple, pour le rotavirus, au cours des premières 48

heures d'incubation sur cultures cellulaires, il y a synthèse d'antigène viral. Celui-ci est détecté par immunofluorescence indirecte sur la culture préalablement fixée (Beril *et al.*, 1991). Cette méthodologie peut être appliquée aux calicivirus à partir de cellules de dauphin (Schwartzbrod, 1991) et aux astrovirus avec des cellules de rein humain (Kurtz *et al.*, 1977).

- La radio-immuno focalisation assay (RIFA) permet la visualisation des foyers d'infection sur des cellules cultivées sous une couche d'agarose. Elle a été développée par Lemon *et al.* (1983) pour la quantification du VHA. Cette technique peut aussi être utilisée à partir du liquide surnageant de la culture cellulaire (Crance *et al.*, 1983) sans fixation des cellules (RIA).

- L'hybridation in situ permet la détection non plus de l'antigène, mais du génome viral à l'aide de sonde spécifique. Cette méthodologie a été utilisée par Jiang *et al.* (1989) pour mettre en évidence le VHA.

II.2.3 Inoculation à l'animal

Comme nous l'avons déjà souligné précédemment, certaines souches de coxsackievirus A ne se multiplient pas sur culture cellulaire. Il est possible de mettre en évidence ces virus par inoculation aux souriceaux nouveau-nés chez lesquels, ils provoquent des symptômes et des lésions caractéristiques qui varient selon les souches inoculées.

Cette méthodologie est applicable aux coxsackievirus A et B.

Dans le cas d'un virus coxsackie A, les souriceaux sont souvent apathiques et cyanosés. Ils présentent une paralysie flasque débutant aux extrémités postérieures puis progressant vers le pôle céphalique.

Dans le cas d'un virus coxsackie B, l'animal présente des signes désordonnés, puis des phénomènes paralytiques spastiques, mais l'infection peut aussi être caractérisée uniquement par un état de dénutrition progressif aboutissant à la cachexie.

L'infection par un coxsackievirus peut être confirmée par des coupes histologiques. La caractéristique principale d'une infection par un coxsackie A est une myopathie généralisée où tous les signes de dégénérescence de la fibre musculaire peuvent être observés.

L'infection par un coxsackievirus B se traduit par une nécrose plus ou moins prononcée de l'encéphale.

L'isolement de virus par inoculation sur souriceaux permet de mettre en évidence la présence de virus pathogènes, mais cette méthodologie est longue, extrêmement lourde et coûteuse, du fait des nouvelles législations relatives à l'expérimentation animale.

II.2.4 Techniques immunologiques

Les techniques immunologiques permettent de détecter un antigène viral directement dans l'échantillon sans passage sur culture cellulaire.

Dans ce cas, les structures antigéniques virales sont prises en sandwich entre un anticorps adsorbé sur un support solide et un deuxième anticorps couplé à une enzyme, par exemple pour un test immunoenzymatique de type Elisa.

Cette méthodologie présente une faible sensibilité de l'ordre de 10^5 particules virales.mL⁻¹ pour le HAV, selon Apaire Marchais (1995). De ce fait, elle n'a pas été utilisée à notre connaissance pour la détection de virus non cultivables (virus de Norwalk) dans l'environnement. Par contre, elle est utilisée pour la détection de HAV dans le surnageant de cultures cellulaires ensemencées avec des concentrats d'eau.

II.2.5 Détection des acides nucléiques viraux

Les techniques de biologie moléculaire se sont développées depuis plusieurs années et ont permis de rechercher le génome des virus dans des produits pathologiques et dans des échantillons provenant de l'environnement. Ces techniques ajoutent à leur spécificité, la rapidité de mise en oeuvre par rapport à la culture cellulaire. De plus, elles permettent de détecter les génomes des virus qui sont difficiles ou impossibles à multiplier en culture cellulaire (virus de Norwalk).

Les génomes viraux ont d'abord été mis en évidence par des techniques d'hybridation moléculaire (dot blot) à l'aide de sondes d'ADN (Jiang *et al.*, 1986 ; Ticehurst *et al.*, 1987) ou ARN (ribosondes) (Jiang *et al.*, 1987 ; Kopecka *et al.*, 1988 ; Shieh *et al.*, 1991). Mais cette technique n'est pas applicable directement aux échantillons de l'environnement, du fait de sa limite de détection élevée, de l'ordre de 10^2 à 10^4 UFP (Enriquez *et al.*, 1993 ; Sobsey, 1993 ; Dubrou *et al.*, 1991).

Certains auteurs ont proposé d'effectuer un passage sur culture cellulaire avant l'hybridation. Cela permet non seulement d'amplifier le signal viral (Shieh *et al.*, 1991) et donc d'abaisser la limite de détection, mais surtout de témoigner du caractère infectieux du virus. Cependant cette augmentation de sensibilité s'effectue au détriment de la rapidité d'obtention du résultat, le délai pouvant aller jusqu'à 25 jours pour le HAV. De plus, cette méthode n'est pas applicable aux virus non cultivables.

Le développement de la technique d'amplification génique ou « polymérase chain reaction » (PCR) a permis d'augmenter considérablement la sensibilité de détection des génomes viraux. Ainsi au cours des trois dernières années, le virus de l'hépatite A (HAV), le virus de Norwalk, les entérovirus et les adénovirus ont été recherchés par cette méthode dans l'eau et les coquillages (Atmar *et al.*, 1993 et 1995 ; Deng *et al.*, 1994 ; Divizia *et al.*, 1993 ; Jaykus *et al.*, 1993 ; Kopecka *et al.*, 1993 ; Lees *et al.*, 1994 ; Le Guyader *et al.*, 1995 ; Puig *et al.*, 1994 ; Schwab *et al.*, 1993).

Le principal avantage de cette méthode est sa sensibilité de 1000 à 10000 fois supérieure à celle de l'hybridation moléculaire (Alvarez *et al.*, 1993 ; Kopecka *et al.*, 1993) et de 100 à 1000 fois supérieure à celle de la culture cellulaire (Puig *et al.*, 1994). Il faut cependant noter que pour la PCR, des volumes de l'ordre du microlitre sont testés alors que pour la culture cellulaire, des volumes pouvant aller jusqu'à 10 mL sont tout à fait envisageables.

Elle permet aussi de détecter l'ensemble des virus appartenant à un genre donné. Ainsi en choisissant un couple d'amorces dans la région 5' non codante, partie très conservée du génome des entérovirus, il est possible de mettre en évidence du génome d'entérovirus quel que soit le sérotype en cause.

Les principaux inconvénients de la PCR en virologie environnementale sont d'une part que cette technique ne détecte que du génome et ne permet pas d'affirmer la présence de virus infectieux, d'autre part qu'elle est très sensible aux inhibiteurs de réactions enzymatiques (glycogène, acides humiques...) qui sont présents dans l'environnement et, enfin que classiquement elle est considérée comme essentiellement qualitative.

Cependant Atmar *et al.*, (1995) ont montré que l'emploi d'un contrôle interne d'amplification permet de quantifier les génomes viraux détectés dans des coquillages, en comparant les rendements d'amplification du contrôle interne et de la séquence virale.

En fait et en conclusion, il apparaît que la détection d'un génome viral dans le milieu hydrique pourrait constituer une méthode rapide, spécifique et très sensible de diagnostic virologique. Cependant, il n'est pas possible, dans l'état actuel des connaissances, de déterminer si la présence de génome correspond à la présence de virus réellement infectieux.

III Survie des virus dans l'environnement

Les virus sont des parasites absolus et en tant que tel, ils ne peuvent se multiplier qu'en présence de leur cellule hôte. Dans le milieu hydrique, la concentration virale ne peut

donc que décroître ou dans le meilleur des cas rester constante. Leur persistance dans l'environnement dépend de facteurs physiques (chaleur, adsorption sur des matières en suspension...), biologiques (substances virucides d'origine microbienne...) et chimiques (salinité, chlore, ozone, UV...). Selon les conditions, tous ces facteurs peuvent agir séparément ou conjointement et il est difficile d'isoler chaque facteur dans un milieu complexe, tel que le milieu hydrique.

III.1 Facteurs physiques

III.1.1 Chaleur

En se fondant sur des données obtenues en milieu tamponné stérile, Schwartzbrod *et al.* (1975) démontrent qu'à partir d'un titre initial en poliovirus 1 de 10^5 NPPUC.mL⁻¹, le virus est détectable pendant une période de 296 jours à une température de 18°C à 25°C alors qu'à 4°C, le processus d'inactivation est beaucoup plus lent puisqu'il faudrait 10 à 15 ans pour permettre l'inactivation de la totalité des virus.

Depuis, de nombreuses études menées en eaux naturelles (eau de mer, rivière, lac) et en eaux d'adduction ont confirmé l'importance de la chaleur sur l'inactivation virale.

Ainsi, Enriquez et Gerba (1995) observent des T_{90} de 41 jours, 24 jours et 11 jours à des températures respectivement de 4°C, 15°C et 23°C pour le poliovirus 1 en eau de distribution sans résiduel de chlore.

De même, Hurst *et al.* (1989) démontrent que la chaleur est le principal facteur inactivant pour le poliovirus 1, le coxsackievirus B3 et l'Echovirus 7 dans différents types d'eaux de surface. Les 3 virus ont en effet, un comportement identique et les T_{90} moyens observés sont de l'ordre de 20 jours à 1°C et de 4 jours à 22°C.

Enfin, Yates *et al.* (1990) ayant testé de nombreux paramètres physico-chimiques d'eaux souterraines (température, pH, sulfate, nitrate, Ca²⁺, Mg²⁺ turbidité...), retiennent uniquement la chaleur, comme facteur inactivant pour le poliovirus 1 et le phage MS₂. L'inactivation des virus est en effet expliquée à 77,5% par la chaleur.

D'après Bitton (1980), le mécanisme d'inactivation virale par la chaleur pourrait être dû à la dénaturation de la capsid virale. Cette hypothèse est soutenue par Grimmel *et al.* (1983) qui suggèrent qu'une incubation du poliovirus 1 à 47°C se traduit par des changements de conformation de la capsid virale. A cette température, la totalité des virus est dégradée en 6 minutes et toutes les capsides virales deviennent perméables à des ions tel que le bromure d'éthidium. Cette particularité permet d'observer par mesure de fluorescence les structures secondaires du génome viral qui sont encore présentes après 15 minutes

d'incubation à 47°C. Lorsque l'expérience est renouvelée en présence de RNases, il apparaît que seulement 50% des acides nucléiques sont susceptibles d'être dégradés à 47°C en 15 minutes et que pour dégrader la totalité des génomes, il est nécessaire d'augmenter la température à 52°C. Ces résultats montrent que les virus sont rapidement inactivés à 47°C par des changements de conformation de la capsid virale alors que le génome reste présent dans le milieu pendant des périodes plus longues. A cette température, environ 50% de ces génomes reste encapsidé et inaccessible aux RNases.

De même, Breindl (1971) montre que la libération de la protéine capsidale VP₄ des *Picornaviridae* par traitement à 42°C, précède l'exposition de l'ARN viral à l'action des RNases.

Il semble donc, que pour des températures supérieures à 42°C, la capsid virale est rapidement dégradée contrairement au génome.

D'autres auteurs ont confirmé ce phénomène pour des températures plus faibles. Ainsi, Enriquez *et al.* (1993) observent une dégradation rapide du poliovirus 1 dans le PBS avec une réduction du titre viral de 4 log en 19 jours, alors que pour le génome viral, une réduction de seulement 1,5 log est observée après 75 jours. De même, en eau de mer artificielle à 20°C, le T₉₀ du rotavirus est de 11 jours alors qu'aucune dégradation significative du génome n'est observée sur une période de 100 jours.

Ces résultats confirment tout à fait ceux obtenus précédemment pour les fortes températures, et il semble donc que la chaleur ait essentiellement une action sur la capsid virale.

III.1.2 Adsorption virale

Les adsorbants potentiels dans les eaux naturelles incluent les argiles (montmorillonite, kaolinite...) et d'autres colloïdes en suspension. Quignon (1995) qui étudie les paramètres influençant l'adsorption du poliovirus 1 sur de la montmorillonite, observe que le pourcentage d'adsorption est de l'ordre de 70% en eau désionisée additionnée de 1 g.L⁻¹ de montmorillonite. Cette adsorption est rapide, puisque le pourcentage d'adsorption maximum est atteint dès la première demi-heure de contact et reste ensuite stable dans le temps. Il montre aussi que le pourcentage d'adsorption varie fortement en fonction de la concentration en sels dans le milieu. Ainsi, il passe de 70% en eau désionisée à 99% en présence de 0,29 g.L⁻¹ de CaCl₂ ou de 3,5 g.L⁻¹ de NaCl.

Dans ces conditions, l'eau de mer constitue un milieu idéal pour étudier l'influence de l'adsorption sur la survie des virus, puisqu'elle présente des caractéristiques de salinité telle que l'adsorption virale est à son maximum. Selon certains auteurs (Bitton et Mitchell, 1974 ;

Gerba et Schaiberger, 1975), l'adsorption de coliphages aux argiles en eau de mer augmente leur durée de survie. Gerba et Schaiberger (1975) observent notamment une chute du titre en phages T₂ de 4 log en 6 jours à 24°C en eau de mer naturelle, alors qu'elle n'est que de 2 log en présence de 550mg.L⁻¹ de kaolinite.

En ce qui concerne les virus entériques, Rao *et al.* (1984) ne détectent plus de poliovirus 1, ni de rotavirus au bout de 9 jours en eau de mer naturelle filtrée à 25°C, alors que ces 2 virus sont encore présents au bout de 19 jours en présence de sédiments naturels. De même, Singer et Frankel-Conrat (cités par Quignon, 1995) suggèrent que la montmorillonite a un effet protecteur sur les virus à ARN vis à vis des ribonucléases.

Il semble donc, que la présence de matières en suspension protège les virus, soit en les stabilisant, soit en adsorbant les enzymes ou autres molécules présentes dans le milieu susceptible de les dégrader.

Cependant, Quignon (1995) démontre que l'adsorption du poliovirus 1 à 5, 105 et 205 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite en eau désionisée additionnée de CaCl₂ n'a aucun effet protecteur vis à vis de l'inactivation thermique (19°C, 25°C et 34°C). De même Gantzer *et al.* (1996) n'observent aucune augmentation de survie du poliovirus 1 en eau de mer artificielle en présence de 3 et 15mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite.

Ces observations tendraient à montrer que la présence de matières en suspension protège les virus vis à vis des substances « virucides » en eau naturelle mais pas vis à vis de l'inactivation thermique.

III.2 Facteurs biologiques

Les facteurs biologiques semblent jouer un rôle sur la persistance des virus en eaux naturelles, mais leur nature et leur action sont encore mal définies.

D'une manière globale, il est clairement démontré que les virus présentent une survie supérieure en milieu artificiel par rapport aux eaux naturelles.

En effet, le T₉₀ du poliovirus 1 en eau de mer artificielle à 25°C est de l'ordre de 20 jours (Dincher, 1992 ; Gantzer, 1993), et celui rapporté dans les mêmes conditions en eau de mer naturelle est de 5 à 6 jours (Chung et Sobsey, 1992). De même, Ward *et al.* (1986) observent que 9 eaux superficielles présentent des caractéristiques inactivantes plus importantes pour le poliovirus 1 que l'eau distillée.

Cette différence de survie peut être due notamment à la présence de facteurs biologiques présentant une activité virucide. Ainsi, Girones *et al.* (1989) ont isolé des bactéries marines

du genre *Moraxella* qui possèdent des propriétés antivirales vis à vis du poliovirus 1. De même, Ward *et al.* (1986) ont isolé 27 souches bactériennes à partir d'eaux de surface ayant des propriétés virucides. Sur les 27 souches isolées, 22 sont associées clairement à une activité virucide vis à vis de l'Echovirus 12.

Lorsque la survie des virus en eau superficielle est comparée à celle dans la même eau autoclavée, il apparaît que les données répertoriées dans la littérature sont tout à fait concordantes. En effet, de nombreux auteurs observent une augmentation de la survie après autoclavage.

Ainsi, Enriquez *et al.* (1993) observent, une réduction de 4 log de la concentration en poliovirus 1 en 13 jours à 37°C dans une eau de puits alors que 19 jours sont nécessaires pour obtenir la même inactivation dans l'eau autoclavée. O'Brien et Newman (1977) constatent une différence de plus d'un facteur 2 pour la survie du poliovirus 1 en eau de surface non traitée et autoclavée. Enfin, Fujioka *et al.* (1980) n'observent aucune baisse significative du poliovirus 1 en eau de mer autoclavée après 4 jours, alors qu'une baisse de 4 log est observée durant la même période en eau non traitée.

Contrairement à l'autoclavage, lorsque la survie des virus dans l'eau naturelle est comparée à celle dans l'eau filtrée sur 0,22µm, des divergences très nettes apparaissent selon les études rapportées dans la littérature.

En effet, certains auteurs observent que l'activité virucide est éliminée par filtration et que la survie des virus est alors équivalente à celle observée dans l'eau autoclavée (Cliver et Hermann, 1972 ; Fujioka *et al.*, 1980 ; Ward *et al.*, 1986). Ward *et al.* (1986) ont en outre testé différents filtres saturés en protéines ou non, et montrent que l'activité virucide ne dépend pas du volume filtré. Ces résultats démontrent que la discrimination s'effectue bien en fonction de la taille et non par rapport à des phénomènes d'adsorption sur le filtre. Ces auteurs concluent donc, que l'activité virucide nécessite la présence physique des bactéries en cause.

D'autres auteurs démontrent à l'inverse, que l'activité virucide demeure après filtration (Akin *et al.*, 1976 ; O'Brien et Newman, 1977 ; Toranzo *et al.*, 1983). Ces auteurs concluent à la présence de substances dissoutes produites par la flore bactérienne. De plus, O'Brien et Newman (1977) montrent que l'inactivation virale en eau de rivière filtrée à 23°C est associée à une dégradation rapide du génome viral alors que la capsid ne subit que des changements de conformation mineure.

Enfin, Yates *et al.* (1990) observent une capacité inactivante vis à vis du poliovirus 1, plus grande après filtration d'une eau souterraine que dans l'eau non traitée. Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une adsorption virale sur certaines bactéries qui permettrait une protection de virus vis à vis des facteurs inactivants.

Ces travaux traduisent de manière très nette la complexité de l'étude des facteurs biologiques. Il est cependant possible de dire que la majorité de ces facteurs sont thermosensibles, et qu'ils sont liés à une activité microbienne. Les discordances entre les différentes études traduisent vraisemblablement l'influence de plusieurs types de bactéries et de plusieurs types de facteurs inactivants associés.

Le caractère thermosensible suggère que ces facteurs pourraient être des enzymes, et Ward *et al.* (1986) en apportent la preuve, puisque l'ajout d'un inhibiteur de protéase (fluorure de phényl-méthyl-sulfonyl), permet une réduction importante du pouvoir virucide d'une eau à propriétés inactivantes.

Ces protéases induisent une dégradation rapide de la protéine capsidale VP₄ suivie de celles des protéines VP₁ et VP₂. Une dégradation de l'ARN marquée à l'uridine tritiée est aussi observée, mais dans des proportions moindres. Ces auteurs montrent que cette activité protéasique est liée à la présence de bactéries dans l'échantillon.

O'Brien et Newman (1977), quant à eux, observent une dégradation rapide du génome viral en eau de rivière et suggèrent que des changements de conformation mineure de la capsid virale permettraient la dégradation du génome par des ribonucléases. Compte tenu de l'ensemble des résultats obtenus par ces auteurs, la présence de ces ribonucléases est liée à une activité microbienne, mais ces enzymes sont en solution dans l'eau de rivière et ne nécessitent pas la présence directe de micro-organismes.

Ces résultats sont confirmés par des travaux plus récents réalisés par Enriquez *et al.* (1993) qui observent une bonne corrélation entre la dégradation du génome et l'inactivation du poliovirus 1 infectieux en eau de puits, alors que le génome persiste plus longtemps dans la même eau autoclavée.

Il faut cependant signaler qu'à côté de ces ribonucléases thermosensibles, il en existe d'autres types très répandus (Keller et Manak, 1989) qui sont très résistants à la chaleur et notamment à l'autoclavage (Sambrook *et al.*, 1989).

Dans les eaux naturelles, l'inactivation virale due aux facteurs biologiques, peut donc être attribuée soit à une activité protéasique qui dégrade rapidement la capsid et nécessite la présence de micro-organismes, soit à des ribonucléases susceptibles de dégrader l'ARN virale après des changements de conformation de la capsid.

III.3 Facteurs chimiques

Parmi les facteurs chimiques qui influencent la survie des virus, il est possible de distinguer des facteurs naturels comme le pH et les sels, et des facteurs utilisés lors du traitement de désinfection de l'eau, comme le chlore, l'ozone et les UV.

III.3.1 pH et sels

L'influence du pH sur la survie des virus dépend en grande partie du type de virus étudié, mais il est généralement admis que pour des pH > 11 (traitement par la chaux), la majorité des virus est inactivée (Grabow *et al.*, 1978).

Pour des pH moins extrêmes, Salo et Cliver (1976) rapportent que le poliovirus 1 est inactivé plus rapidement à pH 3 et 9 qu'à pH 5 et 7. Le rotavirus est quant à lui, plus sensible aux variations de pH et Pancorbo *et al.* (1987) observent que l'augmentation du pH de 6 à 7,8 en eaux naturelles, provoque une réduction significative de l'infectivité de ces virus.

Cependant, le pH ne constitue pas une mesure représentative de différents milieux, car il ne tient pas compte de la nature des facteurs présents. Ainsi, l'ammoniaque qui augmente le pH, possède une action toxique directe par fragmentation des acides nucléiques des entérovirus (Ward, 1978). Il apparaît donc, qu'à pH équivalent, l'action inactivante sera supérieure en présence d'ammoniaque. La différence d'inactivation virale observée dans des eaux naturelles de pH différents, ne permet de conclure qu'à la présence de facteurs inactivants influençant la valeur du pH.

En ce qui concerne le rôle de la salinité sur la survie des virus entériques, de nombreuses études ont été réalisées et les résultats obtenus sont souvent discordants. Ainsi, d'après Katzenelson (1978), Babich et Stotzky (1979) ou Dincher (1992), la salinité n'a pas d'influence sur l'inactivation des virus entériques. Au contraire, Salo et Cliver (1976) montrent que l'inactivation virale est toujours plus importante en solution saline que dans l'eau distillée.

En fait, l'influence de la salinité dépend sans doute, d'une part de la quantité et de la nature des sels présents, et d'autre part du type de virus étudié.

Dans des solutions de faible force ionique, Cords *et al.* (1975) constatent une rapide inactivation des différentes souches de coxsackievirus A. L'inactivation de ces virus en solution hypotonique se traduit par la perte de la protéine VP₄ qui est nécessaire à la reconnaissance virus-cellule hôte. Cette inactivation n'est cependant pas observée pour le poliovirus 1 et le coxsackievirus B1. De même, Ward *et al.* (1986) observent que dans une eau distillée à 27°C, le rotavirus simien SA-11 subit une inactivation beaucoup plus rapide

que l'Echovirus 12, le coxsackievirus B5 et le poliovirus 1. Néanmoins, l'addition de 10 mM de CaCl₂ à l'eau distillée permet une stabilisation partielle du rotavirus. Il semble donc, que la force ionique agisse de manière différente en fonction des virus.

Par ailleurs, le séjour du poliovirus 1 pendant 1 heure à 37°C dans un tampon hypotonique, additionné de 2mM de CaCl₂, provoque l'obtention de particules moins denses (135 S au lieu de 156 S) (Wetz et Kucinski, 1991) qui sont capables de libérer l'ARN viral avant de donner des particules vides de 80 S (Gromeier et Wetz, 1990).

Cependant, la température joue un rôle essentiel dans ces mécanismes d'inactivation, et Wetz et Kucinski (1991) font remarquer que le poliovirus est stable après un séjour d'une heure à 20-25°C dans un tampon hypotonique. A 37°C, dans le même tampon, les particules normales de 156 S se transforment en capsides vides de 80 S. Ces auteurs concluent que les faibles concentrations ioniques associées à une température élevée seraient responsables d'altération irréversible de la capsidite provoquant la libération de la protéine VP₄ et de l'ARN. Enfin, Krüse *et al.* (1982) étudiant les mécanismes d'inactivation d'un autre virus icosaédrique, tel que le virus de la mosaïque du haricot du Sud, font état d'un gonflement réversible du virus en une forme moins dense sous l'effet d'ions bivalents. Cette forme est au contraire de la forme compacte, sensible aux RNases.

Il semblerait donc que, la faible concentration saline puisse avoir un effet inactivant sur certains virus. L'inactivation se traduit par le passage de la forme 156 S à la forme 80 S. En fait, trois types de particules ont été mises en évidence :

- les particules de 156 S dans des solutions isotoniques ou à force ionique élevée ;
- les particules de 135 S dans des solutions hypotoniques, mais en présence d'ions bivalents ;
- les particules de 80 S dans des solutions hypotoniques en absence d'ions bivalents.

Les particules de 156 S et 135 S sont toutes les deux infectieuses, mais les moins denses (135 S) sont susceptibles d'être sensibles aux RNases, et le chlorure de calcium semble les stabiliser. Les particules de 80 S au contraire ont perdu leur infectiosité par libération de la protéine VP₄ et de l'ARN.

III.3.2 Chlore

Parmi les différents procédés de désinfection existants, le plus utilisé dans le monde est sans doute le chlore. Il est cependant possible de dissocier trois types de composés chlorés différents : le chlore libre, les chloramines et le dioxyde de chlore.

Le pouvoir désinfectant de ces composés dépend de la nature et de la composition du milieu, mais surtout de la teneur en matières organiques.

Pour des raisons pratiques, la désinfection par le chlore s'effectue principalement avec des solutions d'hypochlorite de sodium ou de calcium (NaOCl ou Ca(OCl)_2) plutôt qu'avec du chlore (Cl_2) gazeux.

Si on se réfère aux résultats obtenus en solution tampon sans demande en chlore, il apparaît clairement que le chlore est un bon agent virucide.

Ainsi, Vaughn *et al.* (1986) obtiennent une réduction de 99,9% de la concentration en rotavirus en 30 secondes avec un résiduel de chlore de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$. De même, Grabow *et al.* (1983) inactivent 99,99% de virus de l'hépatite A en 150 secondes avec un résiduel de chlore compris entre $0,28$ et $0,40 \text{ mg.L}^{-1}$. Enfin, Sobsey *et al.* (1988) obtiennent l'inactivation de 99,99% du virus de l'hépatite A après 6,5 min. et $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel.

Cependant, dans les eaux naturelles, un certain nombre de paramètres permet soit d'augmenter, soit d'abaisser le pouvoir virucide du chlore. Ainsi, il semblerait que certains sels permettent une potentialisation de l'efficacité du chlore libre sur le poliovirus 1 (Berg *et al.*, 1989 et 1990). Selon Berg *et al.* (1989), l'inactivation de ce virus à pH 9 par le chlore libre (1 à 5 mg.L^{-1}) est 10 fois plus rapide dans l'eau potable que dans l'eau milliQ. Ces auteurs suggèrent que les cations présents dans l'eau potable permettraient un abaissement des répulsions électrostatiques et faciliteraient ainsi l'approche des cibles virales par les ions hypochlorites. De même, Berg *et al.* (1990) démontrent que l'ajout de KCl à l'eau milliQ permet d'observer la même potentialisation.

En ce qui concerne l'influence de la matière organique, l'effet inverse est observé. En effet, ces substances réduisent le potentiel germicide du chlore en entrant en compétition avec les virus pour la consommation du chlore, notamment par les groupes thiols ($-\text{SH}$). Dans ces conditions, il n'est pas surprenant que Behac *et al.* (1987) obtiennent seulement une inactivation de 50% du poliovirus 1 dans une eau usée en 15 min. avec $6,6 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel.

Enfin, le pouvoir virucide du chlore varie en fonction du type de virus. Ainsi, Keswick *et al.* (1985) démontrent que le virus de Norwalk est moins sensible au chlore que les autres virus entériques. De plus, Shaffer *et al.* (1980) observent une chute de 3 et 4 log du titre viral en 30 min. respectivement pour le poliovirus 1 souche Lsc et le poliovirus 1 souche Mahoney. Ces auteurs rapportent, en outre, qu'avec 2 souches de poliovirus isolées à partir de réseaux de distribution, cette chute est inférieure à 2 log dans les mêmes conditions. Cette observation suggère que les souches de « laboratoire » sont moins résistantes au chlore libre que les souches ayant circulé dans l'environnement.

L'analyse de ces données fait apparaître que le chlore libre possède un fort pouvoir virucide qui peut être potentialisé par la présence de sels mais que l'inactivation virale dépend de la présence de matières organiques et du type de virus étudié.

D'après Taylor (1982), la présence de chlore dans de l'eau désionisée provoque des changements morphologiques du poliovirus 1 après 1 minute de contact. Avec 45 μM de chlore, l'inactivation virale est de 1 log et des virions complets sont observés en microscopie électronique. Avec 85 μM , l'abattement viral est de 2 log et la préparation renferme un mélange de capsides apparemment intactes et de capsides vides. Avec 150 μM , l'abattement viral est de 3 log et aucun virion intact n'est observé. De plus, Moore et Margolin (1994) n'observent aucune baisse significative de la quantité de génomes du poliovirus 1 en 60 min. dans un milieu tamponné contenant 1mg.L^{-1} de chlore libre, alors que plus aucun virus infectieux n'est détecté après 10 min. Il semble donc qu'en présence de chlore, l'inactivation virale se traduit par des changements de conformation de la capside alors que le génome persiste plus longtemps dans le milieu. Ma *et al.* (1994b) confirment que la persistance du génome du poliovirus 1 est supérieure à celle du virus infectieux en eau désionisée contenant $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de chlore libre, mais ces auteurs observent néanmoins une baisse de 3 log de la quantité de génome en 6 minutes.

Ces résultats suggèrent que sous l'effet du chlore, la capside virale est rapidement dégradée, alors que le génome persiste plus longtemps. Cependant selon certains auteurs, le chlore permettrait aussi une dégradation du génome viral.

D'autres composés chlorés tels que les chloramines et le dioxyde de chlore ont aussi un potentiel virucide.

Les chloramines ont une activité virucide beaucoup plus faible que le chlore libre. Ainsi, Sobsey *et al.* (1988) montrent que pour inactiver 99,99% d'une suspension de virus de l'hépatite A en solution tampon, l'action doit être poursuivie pendant 117 min. en présence de 10 mg.L^{-1} de chloramines.

Par contre, le dioxyde de chlore est un oxydant plus puissant que le chlore, et Fujioka *et al.* (1986) inactivent 99,4% des poliovirus 1 en 10 min. dans des effluents, avec un résiduel de $1,9\text{ mg.L}^{-1}$.

Quel que soit le désinfectant en cause, l'action inactivante est dépendante du pH. En ce qui concerne le chlore libre et les chloramines, l'inactivation est plus importante à pH 6, lorsque la forme HOCl prédomine (Hoff, 1986). Pour ce qui est du dioxyde de chlore, l'inactivation est maximale pour des pH élevés, de l'ordre de 10 (Sobsey, 1988).

III.3.3 Ozone

L'ozone semble constituer un excellent agent virucide. Ainsi, Hall et Sobsey (1993) observent une inactivation du virus de l'hépatite A de plus de 4 log en 5 secondes, dans du tampon PBS à pH 8, en présence de 0,4 mg.L⁻¹ d'ozone. De même, Vaughn *et al.* (1987) rapportent une inactivation de 99,9% des rotavirus en 6 secondes avec 0,25 mg.L⁻¹ d'ozone.

Comme pour le chlore, la présence de matières organiques est responsable de la consommation d'une certaine fraction d'oxydant qui n'est alors plus disponible pour la désinfection. Watt *et al.* (1989) montrent ainsi que le logarithme de la demande en ozone du milieu est proportionnel à la charge organique (COD). Et, en présence d'un résiduel d'ozone constant (0,05 mg.L⁻¹) et à une température de 20°C, Van den Bossche *et al.* (1994) constatent que la constante d'inactivation du poliovirus 1 est fonction sigmoïde de la COD d'effluents secondaires.

En eaux usées, Joret *et al.* (1982) confirment qu'il existe une corrélation négative entre l'inactivation des virus entériques et la concentration en matières organiques. Ces auteurs observent une inactivation virale de 1 log après 19 min. en présence de 3 mg.L⁻¹ d'ozone, alors que pour les bactéries fécales l'inactivation est de 2 log.

De plus, l'action désinfectante de l'ozone est influencée par le pH du milieu. Ainsi Roy *et al.* (1982) montrent que l'inactivation du poliovirus 1 est plus rapide à pH 7,2 qu'à pH 4,3. Par contre, pour des pH plus élevés (pH 8 à 10), il est observé une diminution de l'inactivation du poliovirus 1 (Harakeh et Butler, 1985).

Utilisant du poliovirus 1 marqué au niveau de l'ARN (uridine tritiée) ou au niveau capsidal (amino-acides radiomarqués), Roy *et al.* (1982) montrent que l'application de résiduels d'ozone de 0,3 à 0,8 mg.L⁻¹ n'induit pas de désagrégation de la capsid. Seules les protéines VP₁ et VP₂ seraient affectées alors que VP₄ impliquée dans l'attachement viral aux cellules serait indemne. Les auteurs concluent que l'inactivation du poliovirus par l'ozone serait provoquée par des lésions de l'ARN.

A l'inverse de ces observations, Moore et Margolin (1994) constatent une inactivation totale du poliovirus 1 après 10 min. après traitement à l'ozone, alors qu'aucune baisse significative de génome viral détecté par hybridation moléculaire n'est observée après 60 min. Ces résultats tendraient à montrer que le processus d'inactivation virale en présence d'ozone n'est pas relié à la dégradation de l'ARN.

Ces résultats suggèrent que si l'ozone a une action sur le génome viral, celui-ci est encore détectable par hybridation moléculaire.

III.3.4 Rayonnement ultra-violet

Si la photo-inactivation est un phénomène naturel observé depuis longtemps au niveau de suspensions de bactériophages et d'entérovirus, exposé à la lumière solaire (Cubbage *et al.*, 1979), l'utilisation de radiation UV s'est affinée pour sélectionner la longueur d'onde la plus efficace. Malgré que la plus grande efficacité se situe à 265nm, pour des raisons pratiques de coût et de durée de vie de la lampe UV, la longueur d'onde de 254nm est la plus utilisée (Sobodka, 1993).

En milieu PBS, Battigelli *et al.* (1993) observent qu'une dose de 25 mW.s.cm^{-2} permet de réduire d'au moins 3 log, la concentration de rotavirus SA-11, de coxsackievirus B5, de HAV et de bactériophage ϕ X 174. Il est à noter l'extrême résistance du phage MS2 pour lequel un abattement inférieur à 1 log est observé dans les mêmes conditions. Wiedenmann *et al.* (1993) confirment ce résultat et rapportent que, pour une même dose d'UV, une réduction de 4 log nécessite 3 fois plus de temps pour le coliphage MS2 que pour le HAV dans du sérum physiologique.

Dans les eaux naturelles, l'efficacité du rayonnement UV comme agent désinfectant, varie en fonction de la teneur en matières en suspension (MES). Qualls *et al.* (1983) ont été les premiers à préciser le double effet des MES sur les performances de la désinfection UV : un effet protecteur vis à vis des micro-organismes et un effet barrière aux rayonnements UV. Cependant, Barron *et al.* (1995) n'observent aucune différence d'inactivation du poliovirus 1 pour une gamme de concentrations en MES variant de 3 à 18 mg.L^{-1} dans un réacteur parfaitement agité.

De plus, Havelaar *et al.* (1990a et 1991) ont montré que par ce procédé, il était possible d'inactiver les phages à ARN F-spécifiques et les réovirus dans les effluents.

En ce qui concerne leur mode d'action, les radiations UV bloquent la réplication des acides nucléiques en induisant notamment la formation de dimères de bases pyrimidiques (U, T, C). Ainsi, selon Battigelli *et al.* (1993), le HAV qui contient 33% d'uraciles est particulièrement sensible aux UV. De plus Wetz *et al.* (1983) isolent des particules de poliovirus 1 de densité différente selon l'intensité de l'irradiation UV, mais quelle que soit la densité des particules, la protéine VP₄ et le génome viral restent présents.

L'inactivation du poliovirus n'est donc pas accompagnée de la libération ni de l'ARN, ni de la protéine VP₄.

Si on compare le devenir, après traitement aux UV, du poliovirus infectieux détecté sur culture cellulaire à celui de son génome détecté par RT-PCR, il apparaît une différence de comportement très nette. En effet, pour une dose d'UV de $22 \text{ mW.sec.cm}^{-2}$, une réduction de

5 log et 1 log est observée respectivement pour le virus infectieux et le génome viral (Ma *et al.*, 1994b). De même, Lévêque *et al.* (1995) observent qu'après traitement aux UV, le HAV infectieux est indétectable après 15 min., alors que le génome détecté par RT-PCR est encore présent après 60 min.

Ces résultats suggèrent que si les UV ont une action sur le génome viral, les modifications provoquées permettent encore la détection du génome par RT-PCR. Il est notamment possible de faire l'hypothèse que les dimères de bases pyrimidiques formés sous l'action des UV sont dissociés lors des différents protocoles d'extraction des acides nucléiques qui précèdent la détection par RT-PCR.

IV Indicateurs de contamination virale

Devant la diversité des micro-organismes pathogènes susceptibles d'être rencontrés dans le milieu hydrique et la difficulté de leur mise en évidence, il est fait appel pour déterminer la qualité microbiologique d'une eau, à des indicateurs de contamination fécale. Généralement ces micro-organismes sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme ou d'animaux à sang chaud (Bitton, 1980 ; Gerba, 1987). Leur présence dans l'eau doit traduire une contamination fécale, et corrélativement un risque de présence de germes pathogènes. En d'autres termes, l'absence d'indicateurs devrait être synonyme d'absence de micro-organismes pathogènes.

Selon cette définition, l'indicateur idéal devrait être (Berg et Metcalf, 1978 ; Stetler, 1984 ; Grabow, 1986) :

- présent uniquement en même temps que le pathogène
- d'un ratio constant et plus abondant que le germe pathogène
- décelable dans tous les types d'eaux
- facilement et rapidement dénombrable, cultivable et identifiable
- non pathogène
- analogue aux pathogènes quant à son comportement dans les eaux et sa résistance aux traitements.

Aucun micro-organisme ne répond à tous ces critères et dans l'état actuel des choses, les législations françaises, européennes et mondiales concernant la qualité de l'eau de distribution reposent sur l'utilisation d'indicateurs bactériens. Or, il s'avère que ceux-ci constituent de mauvais indicateurs de contamination virale. C'est pourquoi depuis plusieurs années, des travaux sont poursuivis en vue de découvrir et de proposer des indicateurs spécifiques de la contamination virale.

IV.1 Indicateurs bactériens

Les indicateurs de pollution fécale habituellement utilisés sont des bactéries hôtes normaux et abondants de l'intestin. Il s'agit des coliformes (totaux et thermotolérants), d'*E. coli*, des streptocoques fécaux et des clostridia sulfite réducteurs (*Clostridium perfringens*). Les bifidobactéries et les *Bacteroides fragilis* sont plus abondants dans les excréments humains, mais présentent les inconvénients d'être des bactéries anaérobies et d'avoir une survie très limitée dans l'environnement.

IV.1.1 Coliformes totaux et thermotolérants

Les coliformes totaux sont utilisés comme indicateurs microbiens de la qualité de l'eau de boisson depuis des dizaines d'années, surtout parce qu'ils sont abondants et faciles à détecter et à dénombrer. Le terme coliforme désigne des bactéries Gram négatives aptes à se développer en présence de sels biliaires et à fermenter le lactose à 37°C avec production d'acide, de gaz et d'aldehyde dans les 24-48 heures (OMS, 1986 ; APHA, 1989).

Traditionnellement, les bactéries coliformes étaient considérées comme appartenant aux genres *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*, avec des espèces telles qu'*Escherichia coli* spécifiques des selles humaines et animales mais aussi telles qu'*Enterobacter cloacae* et *Citrobacter freundii* qui se rencontrent à la fois dans les fèces, les sols, les plantes en putréfaction et les eaux riches en nutriments. Les méthodes de taxonomie modernes montrent qu'il s'agit d'un groupe encore plus hétérogène comprenant des espèces qui ne se rencontrent qu'exceptionnellement dans les fèces et qui peuvent se multiplier dans des eaux de boisson de relative bonne qualité, par exemple *Serratia fonticola*, *Rahnella aquatilis* et *Buttiauxella agristis* (OMS 1994).

La multiplication de certaines espèces dans l'environnement et l'hétérogénéité de leur origine font des coliformes totaux de piètres indicateurs de contamination fécale. Leur détection est cependant utile dans le cadre du traitement des eaux pour mettre en évidence un défaut de traitement ou une contamination accidentelle par des fèces, des sols... La détection de coliformes totaux est donc souvent associée à celle des coliformes thermotolérants (ou fécaux) qui sont capables de fermenter le lactose à 37°C et 44°C. Cependant, malgré cette restriction, il semble là encore que le terme « fécaux » soit improprement utilisé dans certains cas. Ainsi, il a été montré en Finlande que la majorité des coliformes thermotolérants détectés dans les échantillons provenaient d'eaux usées d'industries de bois et de papier. Ces eaux riches en matières organiques favorisent la multiplication de certaines espèces (Havelaar, 1993). De manière générale, de nombreux auteurs montrent que la survie des coliformes est très inférieure à celle des virus notamment en eau de mer (Lo *et al.*, 1976 ; Goyal *et al.*, 1978

; Lucena *et al.*, 1982 ; Cornax *et al.*, 1991) et qu'ils sont plus sensibles aux désinfectants (Havelaar *et al.*, 1987 ; Bosch *et al.*, 1989 ; Tyrrell *et al.*, 1995).

Concernant la désinfection par le chlore, Lechevallier and Mc Feters, 1985 et Du Prez *et al.*, 1995 montrent qu'il y a des coliformes « blessés » durant la chloration qui deviennent sensibles à des substances tels que le désoxycholate et les sels biliaires couramment utilisés dans les milieux. Ces bactéries peuvent cependant se multiplier sur des milieux non sélectifs tel que le MT7 agar. La proportion de bactéries « blessées » est de l'ordre de 79% à 100% en eau potable (Lechevallier *et al.*, 1983). Ce phénomène est donc source d'une sous-estimation du nombre de coliformes dans ce type d'eau.

Dutka (1973) rapporte de nombreux cas de détection de *Salmonella typhimurium* ou de virus dans différents types d'eaux alors que les coliformes sont indétectables ou en faible concentration. Cet auteur démontre d'autre part que les ratios Salmonelles/Coliformes totaux et Virus/Coliformes totaux sont très variables et que ces coliformes se multiplient en eau de lac. Cet auteur conclut à une inadaptation des coliformes en tant qu'index de la qualité de l'eau.

IV.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli peut se différencier des autres coliformes thermotolérants par sa capacité à produire de l'indole à partir de tryptophane à 44°C, ou par son activité β glucuronidase (OMS 1994). Son identification complète est trop complexe pour être pratiquée en routine mais des éprouves ont été mises au point pour l'identifier rapidement avec un haut degré de certitude. Récemment l'OMS a recommandé l'utilisation d'*E coli* plutôt que celle des coliformes thermotolérants pour vérifier la qualité du traitement des eaux potables (WHO 1993). En effet *E. coli* ne se multiplierait pas dans l'environnement mais uniquement dans le tractus digestif de l'homme ou d'animaux à sang chaud, ce qui implique une bonne corrélation avec une pollution fécale (Gerba *et al.*, 1979 ; Borrego *et al.*, 1987).

Il faut cependant noter quelques cas de détection d'*E. coli* dans des eaux tropicales sans contamination fécale apparente (Hernandez-Delgado *et al.*, 1993). Dans ce cas les auteurs suggèrent l'utilisation de coliphage comme indicateur de contamination fécale. Toujours sous un climat tropical, d'autres auteurs suggèrent une multiplication d'*E. coli* dans certains types d'eaux (Camillo *et al.*, 1985 ; Wright, 1989), mais cette même observation a été faite par Springthorpe *et al.* (1993) dans des eaux de rivière riches en matières organiques sous un climat tempéré.

Concernant la survie dans les eaux superficielles, Goyal (1983) observe que les entérovirus persistent plus longtemps qu'*E. coli*. Les mêmes conclusions sont obtenues par Nasser *et al.*, (1993) qui comparent la survie du virus de l'hépatite A (HAV) et du poliovirus

1 à celle d'*E. coli* dans des eaux de surface et des eaux usées autoclavées pour des températures de 10 et de 20°C.

En conclusion, il est possible d'estimer que *E. coli* est un meilleur indicateur de contamination fécale que les coliformes thermotolérants de par sa spécificité fécale et ses plus faibles possibilités de multiplication dans la plupart des milieux hydriques. Néanmoins, sa survie dans les eaux apparaît plus faible que celle des virus entériques.

IV.1.3 *Streptocoques fécaux*

Ce sont des micro-organismes aérobies facultatifs, gram positifs, non sporulés qui présentent dans leur paroi l'antigène polysidique spécifique du groupe D de Lancefield. Du point de vue taxonomique, ils appartiennent aux genres *Enterococcus* et *Streptococcus*. La plupart des espèces appartient au genre *Enterococcus* et peut être considérée comme indicateur spécifique d'une contamination fécale, cependant certaines espèces telles qu'*E. malodoratus* et *E. solitarius* se rencontrent essentiellement sur des végétaux.

Le genre *Streptococcus* comprend deux espèces qui sont principalement présentes dans les fèces d'animaux.

Les streptocoques fécaux se multiplient rarement dans l'environnement (Dutka, 1973). Ce groupe semble constituer un bon indicateur de contamination fécale et est d'ailleurs utilisé pour confirmer la nature fécale de la pollution d'une eau présentant une concentration en coliformes anormale. Cet indicateur résiste mieux aux conditions défavorables que les coliformes, notamment en eau de mer (Grabow et Coubrough, 1986 ; Cornax *et al.*, 1991). De plus, d'un point de vue épidémiologique, la présence de streptocoques fécaux semble être corrélée aux maladies associées aux baignades (Cabelli *et al.*, 1982, 1983). Ainsi dans une étude prospective en eau de mer Kay *et al.*, (1994) analysant les effets de la baignade sur la santé de 1306 adultes volontaires, montrent une très nette corrélation ($P < 0,001$) entre le taux de gastro-entérites observées et la concentration en streptocoques fécaux dans des échantillons prélevés sur le lieu de la baignade. Aucune corrélation n'est observée avec les teneurs en coliformes totaux, thermotolérants, *Staphylocoques* et *Pseudomonas aeruginosa*. Il faut cependant noter qu'aucune recherche virologique n'a été effectuée au cours de cette étude, ce qui n'empêche d'ailleurs pas les auteurs de suggérer que si un virus de type Norwalk était incriminé, sa distribution devrait être analogue à celle des streptocoques fécaux.

Dans le cadre d'une désinfection par le chlore, il semble là encore que les streptocoques fécaux soient plus sensibles que les entérovirus (Havelaar *et al.*, 1987). Cependant, l'effet inverse est observé après un traitement par l'ozone (Tyrrel *et al.*, 1995).

En pratique, les streptocoques fécaux constituent des indicateurs spécifiques de contamination fécale même si la présence de faibles concentrations ne permet pas de trancher entre contamination fécale et contamination végétale. Il semble cependant que le comportement de cet indicateur ne reflète en aucun cas celui des virus entériques.

IV.1.4 Clostridium perfringens

Clostridium perfringens est une bactérie anaérobie stricte qui ne se multiplie que dans le tractus intestinal d'animaux à sang chaud. Cette bactérie constitue de ce fait un très bon indicateur de contamination fécale. Les spores de *Clostridium perfringens* résistent très bien aux conditions défavorables, mieux que toutes les bactéries végétatives et virus testés jusqu'alors (Metcalf, 1978 ; Goyal, 1983). Ceci implique que l'absence de spores de *Clostridium perfringens* devrait suggérer l'absence de virus pathogènes (Grabow, 1986). Mais du fait de cette très forte résistance, cet organisme est très faiblement corrélé avec la survie d'autres organismes entériques pathogènes, et de ce fait constitue un indicateur trop « stringent » (Grabow, 1986) en ce qui concerne la qualité des eaux.

Tous ces indicateurs ne permettent pas d'évaluer la qualité microbiologique d'une eau au sens large du terme mais simplement sa qualité bactériologique. Et avec le temps, se sont accumulés des travaux montrant l'inadaptation de ces indicateurs bactériens comme témoin d'une contamination microbiologique et en particulier virale .

De façon exemplaire, des travaux font état d'épidémies locales dues à l'eau distribuée (après traitement en filière classique) alors même que les normes bactériologiques et chimiques sont respectées (Rose et al., 1986 ; Stetler et al., 1992). De même, la présence de virus entériques a été décelée dans des eaux d'adduction non traitées alors que celles-ci ne renfermaient pas de bactéries indicatrices de contamination fécale (Schwartzbrod et al., 1985).

L'analyse des travaux rapportés dans la littérature montre qu'aucun indicateur bactérien ne peut être considéré comme absolument représentatif de la contamination virale des eaux.

IV.2 Indicateurs viraux

Actuellement le contrôle virologique du milieu hydrique est extrêmement restreint, et lorsqu'il existe, il est fondé sur la détection de virus pathogènes pour l'homme.

Les facteurs qui constituent une entrave au suivi virologique des eaux sont :

- la faible densité ou l'absence de virus entériques pathogènes dans les eaux (à l'exception des eaux usées) en particulier dans l'eau potabilisée ;
- le coût élevé des techniques de détection et de quantification virale actuellement utilisées ;
- le long délai nécessaire à l'obtention d'une réponse virologique sur systèmes cellulaires ;
- le faible rendement des techniques de concentration et de mise en évidence;
- l'absence d'obligation réglementaire d'un suivi virologique de l'eau.

Ce dernier facteur est corrélé aux précédents. Il est en effet délicat de déterminer les meilleurs protocoles expérimentaux en matière de coût, rendement et sensibilité, mais surtout de justifier un suivi virologique régulier qui amènerait la plupart du temps avec les méthodes classiques trop peu sensibles, à un résultat négatif.

Les recherches actuelles s'orientent vers la mise au point d'un ou de plusieurs véritables indicateurs spécifiques de la contamination virale.

Certains bactériophages constituent des candidats très sérieux à ce titre d'indicateur. De nombreuses études ont été et sont réalisées pour déterminer s'ils répondent aux critères classiquement admis.

Les coliphages somatiques, les bactériophages ARN F-spécifiques et les bactériophages de *Bacteroides fragilis* sont les 3 indicateurs actuellement étudiés.

IV.2.1. Coliphages somatiques

Les coliphages somatiques constituent un ensemble très hétérogène, ils infectent certaines souches d'*E. coli* par adsorption sur des récepteurs présents au niveau des parois cellulaires. Depuis les travaux de Kott (1966) qui démontrent que les coliphages sont plus résistants que les coliformes dans l'environnement, ce groupe de phages est étudié en vue de leur utilisation en tant qu'indicateur de contamination virale.

Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 7.

Phages somatiques			
Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations	Références
Fèces humaines	20 - 90 %	$10^4 - 10^6$ UFP.g ⁻¹	Dhillon <i>et al.</i> , 1976 Osawa <i>et al.</i> , 1981 Havelaar <i>et al.</i> , 1986
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	75 - 100 %	10^4 UFP.g ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	30 - 100 %	$10^1 - 10^7$ UFP.g ⁻¹ .	Osawa <i>et al.</i> , 1981 Havelaar <i>et al.</i> , 1986
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	60 - 90 %	10^6 UFP.g ⁻¹	Osawa <i>et al.</i> , 1981 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Fèces d'animaux sauvages (Lièvres, oiseaux)	0 - 40 %	-	Havelaar <i>et al.</i> , 1993 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Eaux usées brutes domestiques	-	$10^2 - 10^5$ UFP.mL ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Cornax <i>et al.</i> , 1991
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	$10^2 - 10^5$ UFP.mL ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Tartera <i>et al.</i> , 1989

Tableau 7 : Fréquence de détection et moyenne des concentrations des phages somatiques dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes (d'après Havelaar 1993).

Ils ont l'avantage d'être abondants dans les selles humaines, (en moyenne 10^4 UFP.g⁻¹ à 10^6 UFP.g⁻¹ d'après Dhillon *et al.*, 1976 ; Osawa *et al.*, 1981 ; Havelaar *et al.*, 1986) et donc dans les eaux usées, (en moyenne de 10^3 à 10^4 UFP mL⁻¹ d'après Funderburg and Sorba, 1985 ; Tartera *et al.*, 1989). La fréquence de leur présence dans les selles est variable selon les pays, ceci pouvant être dû à une bactérie hôte moins sensible.

Cependant, les coliphages ne sont pas spécifiques des selles humaines, ils ont pu être détectés dans les selles d'animaux de ferme à des fréquences variant de 40 à 100 % selon l'espèce (Havelaar *et al.*, 1990b ; Grabow *et al.*, 1993), les selles d'animaux de zoo à des fréquences variant de 60 à 90 % (Grabow *et al.*, 1993 ; Osawa *et al.*, 1981) et les selles d'animaux sauvages tel que le lièvre à des fréquences de 40 % (Grabow *et al.*, 1993).

Seeley et Primrose (1980) détectent des coliphages dans des eaux peu polluées en matière fécale et suggèrent l'existence de 3 types de phages selon leur température optimale de multiplication. Le groupe se multipliant à des températures de 15 à 30°C, semble peu spécifique des matières fécales alors que les deux autres groupes se multipliant à des températures de 15 à 41°C et de 25 à 45°C sont prédominants dans les selles et les eaux polluées.

D'autres auteurs démontrent la multiplication des coliphages en présence de leur bactérie hôte dans des eaux de mer (Vaughn and Metcalf, 1975 ; Borrego *et al.*, 1990) ou des eaux de rivière (Parry *et al.*, 1981). Cependant, les concentrations bactériennes et l'état physiologique des bactéries décrits dans ces études ne sont pas du tout représentatifs de l'environnement. Il semble plus probable que certains coliphages peuvent se multiplier dans l'environnement aux dépens de bactéries autochtones.

Par ailleurs, les coliphages sont moins résistants que les virus vis à vis du chlore (Havelaar *et al.*, 1987) et des UV (Niewstad *et al.*, 1991).

La faible spécificité humaine, leur possible multiplication dans l'environnement et leur plus faible résistance vis à vis de certains traitements par rapport aux virus, constituent des inconvénients majeurs pour l'utilisation de ce type de phages comme indicateur de contamination virale.

IV.2.2 Bactériophages à ARN F-spécifiques

Les bactériophages à ARN F-spécifiques qui appartiennent aux familles des *Leviviridae* et *Inoviridae*, infectent certaines souches de bactéries au niveau des pilis sexuels (Van Drin, 1988). Havelaar *et al.* (1990b) ont proposé une souche de *Salmonella typhimurium* en tant que bactérie hôte pour la détection de ces phages. Les pilis sexuels ne se forment pas à des températures inférieures à 30°C, ces phages ont de faibles chances de se multiplier dans l'environnement (Havelaar and Hogeboom, 1984 ; IAWPRC, 1991).

Ce groupe de phages ne se multiplierait donc que dans le tractus intestinal de l'homme et d'animaux à sang chaud. Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 8.

Ils sont détectés dans les selles humaines en relativement faible concentration de 10 à 10³ UFP g⁻¹ (Havelaar, 1993) et à des fréquences très variables (de 0 à 57%). Dans les eaux usées, ils sont retrouvés à des concentrations variant de 10² à 10⁴ UFP ml⁻¹ (Havelaar *et al.*, 1986 ; Kfir *et al.*, 1991 ; Grabow *et al.*, 1993).

Ces bactériophages offrent une résistance variée vis à vis des désinfectants. Le phage f2 est plus sensible vis à vis du chlore libre que certains virus tels que le poliovirus 1 et le rotavirus (Bosch *et al.*, 1989), par contre sa sensibilité semble identique vis à vis des chloramines (Havelaar *et al.*, 1987). Ces phages sont par contre très résistants au traitement par les UV (Wiedenmann *et al.*, 1993 ; Battigelli *et al.*, 1993).

Phages ARN F spécifiques			
Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations	Références
Fèces humaines	0 - 57 %	10 - 10 ³ UFP.g ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	11 - 75 %	30 UFP.g ⁻¹ .	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	0 - 100 %	10 - 10 ⁶ UFP.g ⁻¹	Calci <i>et al.</i> , 1993 Grabow <i>et al.</i> , 1993 Havelaar <i>et al.</i> , 1986
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	0 - 65 %	-	Osawa <i>et al.</i> , 1981 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Fèces d'animaux sauvages (Lièvres, oiseaux)	0 - 73 %	0 - 10 ³ UFP.g ⁻¹	Calci <i>et al.</i> , 1993 Grabow <i>et al.</i> , 1993
Eaux usées brutes domestiques	-	10 ² - 10 ⁴ UFP.mL ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Debartolomeis, 1991
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	10 ² - 10 ⁴ UFP.mL ⁻¹	Havelaar <i>et al.</i> , 1986 Tartera <i>et al.</i> , 1989

Tableau 8 : Fréquence de détection et moyenne des concentrations de phages à ARN-F spécifiques dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes (d'après Havelaar 1993).

Les bactériophages à ARN F-spécifiques semblent donc constituer de bons indicateurs de contamination fécale animale et humaine. Cependant par rapport aux virus entériques, pathogènes pour l'homme, présents uniquement dans les selles humaines, cet indicateur surestimerait le risque de contamination notamment en présence d'eaux usées provenant d'abattoir.

IV.2.3 Phages de *Bacteroides fragilis*

L'utilisation des phages de *Bacteroides fragilis* en tant qu'indicateur de contamination virale a été initialement proposée par Jofre *et al.*, (1986) et Tartera et Jofre (1987). Les bactéries Gram négatives anaérobies, du groupe *Bacteroides* sont présentes en concentration 100 fois supérieure à celle d'*E. coli* dans les selles (Finegold and Sutter, 1983 ; Allsop and Stikler, 1984). *Bacteroides fragilis* est un hôte normal du tractus intestinal de l'homme et des animaux à sang chaud.

Les phages de la souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 apparaissent comme étant très spécifiques de l'homme (Jofre *et al.*, 1986 ; Tartera *et al.*, 1988, 1989), mais en concentration très faible. Les fréquences de détection et les moyennes des concentrations de

ces phages dans différents types de fèces et d'eaux usées sont données dans le tableau 9. Ces phages sont présents dans les selles humaines à des concentrations très variables de 10^2 à 10^8 UFP g^{-1} et à des fréquences variant de 0 à 15%. Dans les eaux usées, leur concentration est de l'ordre de 10 à 10^3 UFP mL^{-1} (Grabow *et al.*, 1993 ; Tartera et Jofre, 1987 ; Tartera *et al.*, 1989 ; Cornax *et al.*, 1991).

Phages <i>Bacteroides fragilis</i>			
Type d'échantillon	Fréquence de détection	Moyenne des concentrations	Références
Fèces humaines	0 - 15 %	$10^2 - 10^8$ UFP.g ⁻¹	Kai <i>et al.</i> , 1985 Grabow <i>et al.</i> , 1993 Tartera et Jofre, 1987
Fèces d'animaux domestiques (chiens, chats)	0 %	-	Grabow <i>et al.</i> , 1993 Kator et Rhodes, 1993
Fèces d'animaux de ferme (cochons,...)	0 - 5 %	-	Grabow <i>et al.</i> , 1993 Tartera et Jofre, 1987
Fèces d'animaux de zoo (Singes, oiseaux)	0 - 7 %	-	Grabow <i>et al.</i> , 1993 Tartera et Jofre, 1987
Eaux usées brutes domestiques	-	$10 - 10^4$ UFP.mL ⁻¹	Kator et Rhode, 1993 Tartera <i>et al.</i> , 1989
Eaux usées brutes (abattoirs)	-	non détecté	Grabow <i>et al.</i> , 1993 Tartera <i>et al.</i> , 1989 Havelaar <i>et al.</i> , 1986

Tableau 9 : Fréquence de détection et moyenne des concentrations des phages de *Bacteroides fragilis* dans différents types de fèces et d'eaux usées brutes (d'après Havelaar 1993).

Ce phage présente l'avantage d'être spécifique de l'homme. La présence de phages dans les selles d'animaux n'a été qu'exceptionnellement rapportée (Tartera et Jofre, 1987). De nombreuses études ont montré que ce phage n'était pas retrouvé dans les selles d'animaux (Grabow *et al.*, 1993 ; Tartera et Jofre, 1987 ; Kator et Rhodes, 1993). Enfin, ces phages n'ont pas été isolés dans les eaux usées d'abattoir (Tartera *et al.*, 1989 ; Grabow *et al.*, 1993).

De par la faible résistance de *Bacteroides fragilis* dans l'environnement, ce type de phage ne peut pas se multiplier dans l'environnement (Jofre *et al.*, 1986). En fait, les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 n'ont pu être détectés que dans des eaux polluées par des selles humaines.

Vis à vis des traitements de désinfection, ces phages ont une résistance au chlore supérieure aux virus (Bosch *et al.*, 1989), par contre ils semblent plus sensibles au traitement par les UV (Bosch *et al.*, 1989).

De par leur spécificité humaine et leur écologie, ces phages semblent être très intéressants en tant qu'indicateur de contamination virale. Le problème majeur reste la faible concentration de ces micro-organismes dans l'environnement, ce qui au minimum nécessitera la mise au point de techniques de concentration performantes.

Objectifs

Au début des années 1990, quelques voix se sont élevées dans la communauté scientifique, en particulier parmi les spécialistes de biologie moléculaire préconisant l'utilisation de la PCR pour le diagnostic virologique du milieu hydrique. Certains postulaient que la détection du génome viral dans une eau, une boue ou un coquillage pouvait apporter la preuve que ce milieu était contaminé par le virus infectieux correspondant. D'autres affirmaient au contraire qu'une « PCR positive » ne pouvait en aucun cas indiquer la présence de virus infectieux, tout au plus pouvait-elle servir de témoin de contamination virale.

La présence de génome viral est-elle le témoin d'une présence de virus infectieux ou simplement un témoin d'une contamination virale plus ou moins ancienne ?

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments de réponses à cette interrogation et dans ce cadre, nous avons considéré qu'il était fondamental de comparer le comportement du génome et du virus infectieux dans le milieu hydrique. En effet, pour que la présence de génome puisse témoigner de celle de virus infectieux, il semble nécessaire que la capacité de survie de ces 2 entités soit identique.

Dans un premier temps, le coxsackievirus B3 est choisi comme modèle de virus entérique, car il présente l'avantage de pouvoir être détecté par inoculation aux souriceaux nouveau-nés témoignant du pouvoir pathogène, et par isolement sur culture cellulaire témoignant du pouvoir infectieux. De plus, la séquence de son génome étant parfaitement connue, la détection de l'ARN est tout à fait réalisable par RT-PCR.

Après avoir étudié l'influence de la chaleur sur le virus infectieux et le génome viral, nous avons fixé la température à 25°C et étudié le devenir de ces 2 paramètres en fonction du temps dans différents milieux.

Trois types de milieux naturels sont testés, une solution tamponnée stérile (PBS) de composition parfaitement connue de façon à s'affranchir des paramètres environnementaux mal maîtrisés, une eau d'adduction et une eau de forage.

Dans un deuxième temps et en tenant compte des résultats obtenus, nous avons élargi cette étude à un indicateur potentiel de contamination virale constitué par le phage de *Bacteroides fragilis*, en travaillant avec les mêmes milieux.

Enfin, une dernière partie est consacrée à l'évaluation d'indicateurs de contamination virale en milieux strictement naturels constitués par des eaux usées épurées de différentes qualités. Les indicateurs testés sont le génome d'entérovirus, les coliphages somatiques et les phages de *Bacteroides fragilis*, qui ont été recherchés en même temps que les entérovirus infectieux.

Matériels et méthodes

I Virus

Deux types de virus sont utilisés lors des études menées en contamination artificielle : le coxsackievirus B3 et le phage B40-8 de *Bacteroides fragilis* HSP40.

I.1 Coxsackievirus B3 (Cox B3)

La souche de coxsackievirus B3 (réf. : 37.3.166) nous a été aimablement fournie par le laboratoire de virologie de la Faculté de Médecine de Lyon (Pr Aymard). Un stock de virus est réalisé par inoculation sur cellules BGM. Après obtention d'un effet cytopathogène caractéristique (ECP), le mélange milieu-cellule est soumis à trois congélations-décongelations successives puis clarifié par centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes. Le surnageant constitue la suspension virale qui est répartie en tubes de 1,5 mL puis conservée à -80°C. Le même stock viral est utilisé au cours de toute l'étude.

I.2 Phage B40-8

La souche de phage B40-8 de *Bacteroides fragilis* HSP40 nous a été aimablement fournie par le département de microbiologie de l'université de Barcelone (Pr Jofre). La préparation d'un stock de bactériophages est réalisée par inoculation d'une suspension phagique à une culture de *Bacteroides fragilis* HSP40 en phase exponentielle de croissance.

Un flacon de 140 mL, contenant 125 mL de milieu BPRM liquide (composition en annexe 1b), estensemencé avec 2 mL d'une suspension mère de bactériophage titrant 10^9 UFP.mL⁻¹, puis rempli complètement avec la culture bactérienne en phase exponentielle. Le flacon est fermé hermétiquement et après homogénéisation, il est placé à 37°C pendant une nuit. Pendant cette incubation, les bactériophages se développent au détriment des cellules de *Bacteroides fragilis* HSP40. La solution phagique obtenue est alors centrifugée à 2 500 g, 15 min., 4°C, puis filtrée sur filtre Millex GV stérile (Millipore réf : SLGV 025 BS) de porosité 0,22 µm afin d'éliminer toutes les bactéries encore présentes.

II Argile

L'argile utilisée comme modèle de matières en suspension (MES) est la Namontmorillonite Swy-1 (Crook County, Wyoming, University of Missouri, USA). Cette montmorillonite sodique est rendue complètement homoïnique au sodium par purification à l'aide de dispersions successives de l'argile dans des solutions de NaCl. Il s'agit en fait de

saturer les espaces inter-couches avec les cations compensateurs Na^+ . Le protocole de purification a été aimablement fourni par l'équipe de F. Thomas, du Laboratoire Environnement Minéralurgie (UA CNRS) de Vandoeuvre et comporte plusieurs étapes :

- Dispersion dans NaCl 0,01 M
 - Suspender 30 g d'argile dans 1,5 L de NaCl 0,01 M
 - Homogénéiser par agitation magnétique
 - Centrifuger par fractions de 250 mL à 30 000 g, 1 h. , 20°C
 - Eliminer le surnageant et prélever la couche supérieure gélatineuse (verdâtre) et la couche intermédiaire plus dure (verdâtre) du culot
 - Eliminer le reste du culot (anthracite)
- Dispersion dans NaCl 1 M

Les couches de Na-montmorillonite prélevées au cours de la phase précédente sont resuspendues dans 1,5 L de NaCl 1 M et traitées selon le protocole décrit ci-dessus.
- Lavages dans l'eau désionisée

Les lavages de la Na-montmorillonite s'effectuent selon le protocole décrit précédemment mais la solution de NaCl 1 M est remplacée par de l'eau désionisée. Ces lavages (au moins 5) sont réalisés jusqu'à l'obtention d'un surnageant ne réagissant plus avec AgNO_3 0,05 M (formation de chlorure d'argent).

 - Etalement de l'argile sur plaque de verre et sécher à l'étuve à 37°C
 - Stockage de l'argile séchée dans des flacons clos.

Avant utilisation, l'argile est resuspendue dans de l'eau désionisée et autoclavée à 121°C pendant 20 minutes.

III Filtrat bactérien

Un filtrat bactérien est obtenu à partir d'une culture de *Pseudomonas fluorescens*. Cette bactérie a été isolée à partir d'un réseau de distribution d'eau potable de Hollande, et fournie par Van Der Kooij (KIWA/NL).

La culture est effectuée dans un milieu contenant pour 1 litre : 12 g d'extrait de boeuf ; 3 g d'extrait de levure ; 10 g de peptone ; 3 g NaCl ; 0,7 g de Na_2CO_3 ; 0,12 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le milieu de pH 7,2 est stérilisé à 121 °C pendant 20 minutes.

La culture de *Pseudomonas fluorescens* est réalisée pendant 5 jours dans 500 ml de milieu de culture à 30°C. A l'issue de cette incubation, la culture est centrifugée à 1500 g pendant 20

minutes puis stérilisée sur filtre Millex GV stérile (Milipore réf : SLGV 025 BS) de porosité 0,22 μm . Le liquide recueilli constitue le filtrat bactérien.

IV Milieux hydriques

Les différents milieux hydriques utilisés dans cette étude sont des milieux tamponnés stériles, des eaux de forage, des eaux de distribution et des eaux usées traitées.

IV.1 Milieux tamponnés stériles

Les milieux tamponnés stériles sont réalisés à partir de Phosphate Buffer Saline (PBS) pH 7,2 (réf : 75511 Biomérieux ; NaCl 7,65 g.L^{-1} ; Na_2HPO_4 0,724 g.L^{-1} ; KH_2PO_4 0,210 g.L^{-1}). Le PBS est stérilisé par filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 μm .

Les différents milieux sont constitués soit de PBS, soit de PBS + 10% de filtrat bactérien, soit de PBS + 200 mg.L^{-1} d'argile.

IV.2 Eaux de forage

Les eaux de forage sont prélevées à Ansereuilles dans la commune d'Annoeullin (Nord). Ces eaux n'ayant subi aucun traitement de potabilisation sont caractérisées par un pH voisin de la neutralité (7,1), une teneur en COT de 1,25 mg.L^{-1} et une forte conductivité à 20°C de 1030 $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

IV.3 Eaux de distribution

Les eaux de distribution de Nancy sont prélevées au laboratoire 2 heures après l'ouverture du robinet. Ces eaux, originaires de la Moselle ont subi un traitement de potabilisation (décantation, filtration sur sable, ozonation, filtration sur charbon, postchloration). Elles sont caractérisées par un pH voisin de la neutralité (6,8), une teneur en COT < 0,5 mg.L^{-1} et une faible conductivité à 20°C de 40 $\mu\text{S.cm}^{-1}$.

IV.4 Eaux usées traitées

Les eaux usées traitées sont prélevées au niveau des stations d'épuration de Nancy et d'Epinal.

IV.4.1 Station de Nancy

La station d'épuration de Nancy comprend deux filières distinctes, une filière industrielle traitant les effluents de la brasserie de Champigneulle et une filière urbaine de capacité 300000 équivalent-habitants. Les prélèvements sont effectués uniquement sur la filière urbaine. Cette filière comporte un prétraitement (dégrillage, désablage et déshuilage), une décantation primaire, un traitement par boues activées et une décantation secondaire. Le temps de séjour pendant la période de prélèvement peut être évalué entre 8 et 12 heures. Durant la campagne de prélèvement, les eaux usées brutes sont caractérisées par des concentrations moyennes en MES de 171 mg.L^{-1} , en DBO_5 de 177 mg.L^{-1} et en DCO de 382 mg.L^{-1} et les eaux usées traitées par des concentrations moyennes en MES de 15 mg.L^{-1} , en DBO_5 de 22 mg.L^{-1} et en DCO de 70 mg.L^{-1} . Le traitement d'épuration permet donc d'obtenir un abattement d'un facteur 11 pour les MES, d'un facteur 8 pour la DBO_5 et d'un facteur 5 pour la DCO.

Cette station d'épuration permet de satisfaire les normes de rejets de la directive européenne en matière de MES, DBO_5 et de DCO mais pas en matière d'azote total et de phosphore total. Le point de prélèvement d'eaux usées traitées se situe à la sortie de la station avant le rejet dans la rivière Meurthe.

IV.4.2 Station d'Epinal

La station d'épuration d'Epinal a une capacité de 80000 équivalent-habitants. La filière de traitement comporte un prétraitement (dégrillage, désablage et déshuilage), une décantation primaire, un traitement biologique fonctionnant en alternance de phases d'aération et de phases d'anoxie permettant d'éliminer l'azote par nitrification-dénitrification, une décantation secondaire et un traitement tertiaire de déphosphatation (coagulation avec un sel de fer, floculation avec un polymère et décantation lamellaire). Le temps de séjour pendant la période de prélèvement est supérieur à 30 heures, le temps de séjour dans le bassin d'aération du traitement biologique étant de 24 heures. Durant la campagne de prélèvement, les eaux usées brutes sont caractérisées par des concentrations moyennes en MES de 151 mg.L^{-1} , en DBO_5 de 229 mg.L^{-1} et en DCO de 456 mg.L^{-1} et les eaux usées traitées par des concentrations moyennes en MES de $6,5 \text{ mg.L}^{-1}$, en DBO_5 de 8 mg.L^{-1} et en DCO de 27 mg.L^{-1} . Le traitement d'épuration permet donc d'obtenir un abattement d'un facteur 23 pour les MES, d'un facteur 29 pour la DBO_5 et d'un facteur 17 pour la DCO.

Cette station d'épuration permet de satisfaire les normes de rejets de la directive européenne pour tous les paramètres.

Les points de prélèvement se situent d'une part à la sortie du décanteur secondaire et d'autre part à la sortie de la station avant le rejet dans la rivière Moselle.

V Détection des virus

V.1 Entérovirus

Les entérovirus, dont le coxsackievirus B3, sont mis en évidence par culture cellulaire et par RT semi-nested PCR. L'inoculation aux souriceaux nouveau-nés est utilisée uniquement pour détecter le coxsackievirus B3.

V.1.1 Inoculation sur culture cellulaire

Les virus sont mis en évidence par inoculation sur des cultures in vitro de cellules BGM. Ces cellules de rein de singe en lignée établie dont la subculture est possible pendant un temps a priori infini, sont en effet sensibles à l'infection de la plupart des entérovirus.

- Milieux de culture

Les milieux de culture sont constitués par du "Minimal Essential Medium" (MEM) de EAGLE (Eurobio réf : 010009) additionnés de 2,2 g.L⁻¹ de NaHCO₃ et de rouge de phénol à titre d'indicateur de pH.

Le milieu est additionné de sérum de veau nouveau-né (SVnn) (Gibco réf : 16010-084) décomplémenté 30 min. à 56°C à raison de :

5 % pour un milieu de croissance (MEM 5 %)

2 % pour un milieu de survie (MEM 2 %)

Les milieux sont stérilisés par filtration sur filtre Millipore de porosité 0,22 µm selon le protocole décrit en IX puis répartis en flacons et stockés à 4°C.

Avant usage, les milieux sont complétés avec 1 % d'une solution d'antibiotiques réalisée en dissolvant 10⁴ µg de streptomycine (Diamant) et 10⁴ millions d'unités de Spécilline (Spécia) dans 100 mL d'eau Milli Q stérile.

- Culture de cellules BGM

Les cellules BGM sont conservées à -70°C dans des cryotubes, en suspension dans du MEM à 20 % de SVnn additionné de 10 % de cryoprotecteur (DMSO).

En cas de besoin, la suspension cellulaire est décongelée,ensemencée dans une boîte en plastique de surface utile 75 cm² en présence de 20 mL de milieu de croissance et incubée à 37°C.

Les cellules sédimentent, se fixent sur le support et se multiplient. Avec l'épuisement du milieu, il est observé un virage au jaune du rouge de phénol présent dans le MEM, traduisant une acidification du milieu due au rejet de substances acides par le métabolisme cellulaire.

Il convient alors :

- si le tapis n'est pas continu, de remplacer le milieu par du milieu de croissance neuf ;
- si le tapis est continu, soit de remplacer le milieu par un milieu de survie, soit de réaliser une subculture, soit de récupérer les cellules pour les conserver.

- Subculture par trypsination

La subculture a pour but de dissocier le tapis cellulaire pour obtenir des cellules individualisées qui, mises en présence d'un milieu de croissance, reformeront un tapis. Pour ce faire, une solution stérile de trypsine-versène est utilisée.

La solution de trypsine-versène utilisée est réalisée en dissolvant dans une solution de P.B.S. (Phosphate Buffer Saline sans Ca²⁺ et Mg²⁺) contenant 10 % d'une solution de bicarbonate à 14 g.L⁻¹, de la trypsine à raison de 3 g.L⁻¹ et du complexant Titriplex III (versène) à raison de 0,8 g.L⁻¹. Cette solution de trypsine-versène est stérilisée par filtration sur filtre Millipore de 0,22 µm.

La trypsination est réalisée selon le protocole décrit dans la figure 2. Les cellules individualisées obtenues sont ensemencées :

- dans des flacons à fond plat (boîte de Roux) de surface utile de 175 cm², à raison de 1,2 à 1,5.10⁷ cellules/boîte dans 50 mL de MEM 5% SVnn, pour une subculture ;
- dans des plaques comprenant 96 cupules à fond plat (microplaques), à raison de 1,5 10⁴ cellules/cupule dans 200µL de MEM 2% SVnn, pour une quantification.

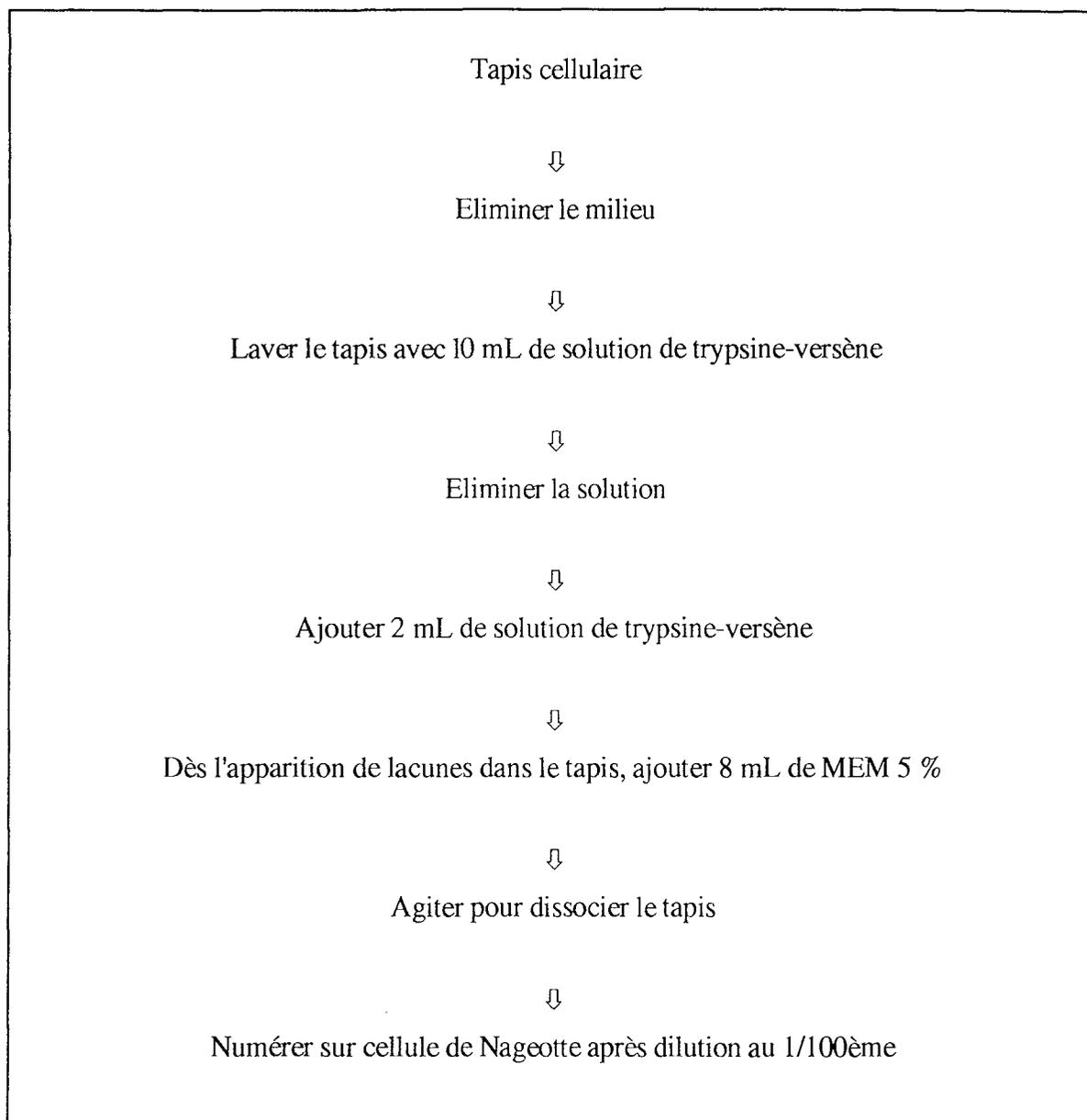


Figure 2 : Protocole de trypsination des cellules BGM

- Quantification des virus

Les virus sont quantifiés par la méthode du Nombre le Plus Probable (NPP). On utilise des microplaques de 96 cupulesensemencées successivement par :

- 100 μ L de milieu MEM 2 %
- 100 μ L d'une suspension cellulaire à $1,5 \cdot 10^5$ cellules.mL⁻¹
- 50 μ L de dilution virale (ou de MEM 2% SVnn pour les témoins).

La quantification est effectuée sur 3 dilutions successives de chaque échantillon. Chaque dilution est inoculée dans 40 puits. Une plaque regroupe donc 2 dilutions (80 puits) et 16 témoins cellulaires.

Les plaques sont placées à l'étuve à 37°C sous atmosphère enrichie à 5 % de CO₂. Après 6 jours, on note pour chaque dilution le nombre de cupules présentant un effet cytopathogène (ECP). Un triplet d'ECP pour chaque échantillon est ainsi obtenu.

Le calcul du Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathogènes (NPPUC) de virus contenus dans un inoculum est réalisé en mettant en oeuvre le programme informatique de Maul (1991). Les résultats sont exprimés en NPPUC.mL⁻¹.

Dans le cas de la recherche des entérovirus dans les échantillons de l'environnement, ce protocole est modifié. En effet, du fait de la faible concentration virale aucune dilution n'est réalisée mais un volume supérieur d'échantillon est inoculé.

La détection des entérovirus est effectuée en milieu liquide dans des microplaques de 96 cupules mais dix millilitres d'échantillon sont distribués dans leur totalité, à raison de 25 µL par cupule, dans 400 cupules et donc 5 plaques. Chaque cupule étant préalablement inoculée avec 175 µL d'une suspension de cellules BGM (8,5 10⁴ cellules.mL⁻¹) dans du MEM 2% de SVnn, le volume total par cupule est de 200 µL.

Les microplaques sont incubées à 37°C sous atmosphère enrichie à 5% de CO₂. Les plaques sont soumises quotidiennement à l'observation microscopique et les ECP sont dénombrés au fur et à mesure de leur apparition.

Après 5 jours d'incubation, les microplaques sont soumises à trois congélations - décongélations successives et 25 µL de chaque cupule sont transférés dans de nouvelles cupules contenant comme précédemment 175 µL de suspension cellulaire. Les plaques sont incubées et les ECP relevés recherchés quotidiennement.

Après 5 jours d'incubation, un troisième passage est réalisé dans les mêmes conditions expérimentales.

Ces trois passages permettent :

- de diluer les éventuelles substances toxiques pour les cultures cellulaires au cours de chaque passage ;
- de permettre la mise en évidence des virus à multiplication lente sur culture cellulaire ;
- de confirmer les ECP du passage précédent.

La concentration en entérovirus est déterminée par la méthode du NPP, les résultats sont donc comme précédemment exprimés en NPPUC.mL⁻¹.

V. 1.2 Inoculation aux souriceaux nouveau-nés

Cette méthode de détection ne peut s'appliquer qu'aux coxsackievirus de type A et B qui provoquent chez le souriceau l'apparition d'une maladie dont les symptômes et les lésions varient selon le type inoculé. Dans nos conditions expérimentales, cette méthode est appliquée à la détection du coxsackievirus B3 selon le protocole suivant :

Chaque échantillon est inoculé à une portée de souriceaux, obligatoirement agés de moins de 48 heures, par voie intra-cérébrale. Les portées sont choisies de telle sorte que l'on puisse inoculer au minimum 5 souriceaux qui sont ensuite laissés avec la mère dans des cages grillagées.

L'inoculation par voie intra-cérébrale s'effectue par injection sous-cutanée dans la région cervicale de 0,1 mL d'échantillon de façon à obtenir une papule d'environ 1mm de diamètre. Dans un second temps, l'aiguille est enfoncée dans le cerveau sans appuyer sur le piston de la seringue afin de ne pas provoquer de lésions par pression. Cette technique permet de limiter le taux de mortalité dû au seul traumatisme de l'inoculation.

Aussitôt inoculés, les souriceaux sont remis dans le nid maternel et observés régulièrement chaque jour pendant une période de 15 jours. Les animaux morts au cours des deux premiers jours sont éliminés et la cause de la mort est imputée au traumatisme de l'injection.

Dès l'apparition de phénomènes paralytiques ou de mouvements spastiques chez un ou plusieurs animaux, la portée est surveillée 2 à 3 fois par jour, les mères ayant l'habitude de manger leurs petits dès que ceux-ci sont malades. Lorsque les symptômes paralytiques ou spastiques atteignent une intensité maximum, les souriceaux sont retirés du nid et sacrifiés. La confirmation de la présence de coxsackievirus B3 s'effectue par titrage sur culture cellulaire du surnageant d'un broyat de souriceau mort.

V.1.3 Détection d'ARN d'entérovirus par RT semi-nested PCR

La détection d'ARN d'entérovirus comprend 5 étapes : l'extraction de l'ARN entéroviral, la rétro-transcription (RT), la Polymerase Chain Reaction (PCR), la semi-nested PCR et la détection du fragment de génome amplifié.

- Extraction du génome entéroviral

Cette étape a pour but de libérer l'ARN de la capsid virale, d'éliminer une partie des inhibiteurs et d'inhiber les RNases. Deux méthodes sont utilisées dans ce travail, l'une utilisant le thiocyanate de guanidium décrite par Chomczynski et Sacchi (1987), l'autre utilisant la protéinase K (Sambrook *et al.*, 1989).

La première est appliquée dans toute l'étude et utilise du thiocyanate de guanidium associé à une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et une double précipitation à l'isopropanol. Le protocole est le suivant :

* Dans un Eppendorf de 1,5 mL introduire :

- 100 μ L de suspension virale ou d'échantillon à analyser
- 500 μ L de solution d'extraction (thiocyanate de guanidium 4 M, citrate de

Na 25 mM pH7, N lauroylsarcosine 0,5 %, β mercaptoéthanol 0,10 M)

* Ajouter 50 μ L d'acétate de Na 2 M pH4

* Ajouter 600 μ L de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1)

* Incubation 15 min., 4 $^{\circ}$ C

* Centrifuger à 10 000 g, 20 min., 4 $^{\circ}$ C

* Récupérer 500 μ L de la phase aqueuse

* Ajouter 500 μ L d'isopropanol + 1 μ L de glycogène (20 mg.mL⁻¹)

* Incubation au moins 1 heure - 20 $^{\circ}$ C

* Centrifuger à 10 000 g, 10 min., 4 $^{\circ}$ C

* Eliminer le surnageant

* Ajouter 300 μ L de solution d'extraction + 300 μ L d'isopropanol

* Incubation au moins 1 heure - 20 $^{\circ}$ C

* Centrifuger 10 min 12 000 g 4 $^{\circ}$ C

* Eliminer le surnageant

* Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70 %

* Incubation 10 min à température ambiante

* Centrifuger à 10 000 g, 5 min., 4 $^{\circ}$ C

* Eliminer le surnageant

* Sécher

* Récupérer le culot dans 30 μ L d'eau désionisée traitée au DEPC

L'ARN ainsi extrait peut être conservé à -80°C ou être immédiatement transcrit en ADNc par rétro transcription (RT).

La deuxième est utilisée uniquement dans le chapitre Etude méthodologique (Résultats I). Cette méthode est fondée sur une digestion enzymatique par la protéinase K des protéines virales à 56°C , suivie par une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1) et enfin par une précipitation à l'isopropanol. Le protocole est le suivant :

- * Dans un Eppendorf de 1,5 mL introduire :
 - 100 μL de suspension virale
 - 494 μL de réactif d'extraction (Tris HCl 0,2 M pH 7,5 , EDTA 25 mM, NaCl 0,3 M, SDS 2 %)
 - 6 μL de protéinase K (10 mg.mL^{-1})
- * Incuber 1 heure 56°C
- * Ajouter 50 μL d'acétate de Na 2 M pH4
- * Ajouter 600 μL de phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25:24:1)
- * Incuber 15 min., 4°C
- * Centrifuger à 10 000 g, 20 min., 4°C
- * Récupérer 500 μL de la phase aqueuse
- * Ajouter 500 μL d'isopropanol + 1 μL de glycogène ($20 \mu\text{g}.\mu\text{L}^{-1}$)
- * Incuber 1 heure - 20°C
- * Centrifuger à 10 000 g, 10 min., 4°C
- * Eliminer le surnageant
- * Laver le culot avec 1 mL d'éthanol 70 %
- * Incuber 10 min à température ambiante
- * Centrifuger à 10 000 g, 5 min., 4°C
- * Eliminer le surnageant
- * Sécher
- * Reprendre le culot dans 30 μL d' H_2O traité au DEPC

L'ARN ainsi extrait peut être conservé à -80°C ou être immédiatement transcrit en ADNc par rétro transcription (RT).

- Amorces

Quatre séries d'amorces sont testées dans le chapitre Etude méthodologique (Résultats I), seule la série sélectionnée est décrite ici. L'amorce utilisée pour la RT est un oligo (dT)₁₅ complémentaire de la queue de poly A située dans la région 3' non codante (NC) du génome des entérovirus.

Pour la PCR et la semi-nested PCR une série d'amorces (complémentaire de la région 5'NC) déjà décrite par Leparc *et al.* (1993) est utilisée. Il s'agit des :

Primer 2 : CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG (position 164-184)

Primer 3 : ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA (position 584-603)

Primer F₂ : CTT GCG CGT TAC GAC (position 516-530)

Toutes ces amorces s'hybrident dans la région 5' NC du génome des entérovirus. Cette région est très conservée chez ces virus. Une sonde permet la mise en évidence des fragments amplifiés par hybridation moléculaire (Southern blot).

La séquence de la sonde est la suivante :

TAT TGA GCT AGT TGG TAG TCC TCC GG (position 428-453)

- Rétro-transcription (RT)

Cette étape a pour but de transcrire l'ARN viral en ADN. L'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN extrait à l'aide d'un oligo (dT)₁₅ (Promega). Le volume réactionnel de 20 µL contient : 4 µL de tampon 5x de rétro-transcription (250 mM Tris HCl [pH 8,4], 50 mM MgCl₂, 350 mM KCl, 15 mM dithiothreitol, 2,5 mM spermidine) ; 40 U de RNases inhibiteurs (Promega) ; 0,25 mM de chaque déoxynucléoside triphosphate (Perkin Elmer) ; 1 µM d'oligo (dT)₁₅ (Promega) ; 10 U d'AMV reverse transcriptase (Promega) ; 6 µL d'H₂O traitée au DEPC et 5 µL d'ARN extrait dénaturé 3 min. à 70°C. La rétro-transcription s'effectue à 42°C pendant 30 min., les hybrides ARN-ADN sont ensuite dénaturés, et la reverse transcriptase inactivée, 5 min. à 95°C. L'ADNc peut alors être amplifié par PCR.

- Amplification par PCR

Pour réaliser une PCR, 5 µL de cDNA sont ajoutés à 95 µL de "Mix PCR" contenant : 10 µL de tampon PCR 10 x (500 mM KCl ; 100 mM Tris-HCl pH8,3 ; 15 mM MgCl₂ ; 0,01% pds/vol gélatine) ; 0,25 mM de chaque déoxynucléoside triphosphate ; 1 µM de chaque amorce (Primer 2 + Primer 3) ; 2,5 U de Taq polymérase (Perkin Elmer Cetus). L'amplification est effectuée durant 30 cycles : dans un thermocycleur 9600 (Perkin Elmer) 30 secondes à 96°C pour la dénaturation, 45 secondes à 50°C pour l'hybridation et 60 secondes à 72°C pour l'élongation. Avec les amorces utilisées, le fragment amplifié obtenu est de 439 pb.

- Amplification par semi-nested PCR

La réaction s'effectue à partir d'un microlitre de produit d'amplification (PCR) auquel sont ajoutés 99 μL de "Mix PCR" décrit précédemment avec un couple d'amorces différent de celui utilisé pour la PCR (Primer 2 et Primer F2). Le cycle de température est le même que pour la PCR. Avec les amorces utilisées, le fragment amplifié est de 366 pb.

- Révélation des produits d'amplification

Les produits d'amplification sont révélés après électrophorèse soit sous UV soit par Southern blot + hybridation.

L'électrophorèse est réalisée avec un gel constitué de 2 % d'agarose dans un tampon Tris-Borate-EDTA (TBE) et de 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de bromure d'éthidium (BET). Dans chaque puits, un mélange de 25 μL du produit de semi-nested PCR et 5 μL de tampon de charge (0,5 % bleu de bromophénol et 0,5 % xylène-cyanole [SIGMA]) est déposé. Pour permettre d'estimer la taille du fragment amplifié, un marqueur de poids moléculaires est déposé de la même manière que précédemment.

La migration électrophorétique s'effectue dans du TBE pendant 1 heure à 180 V. Après migration, les différents fragments amplifiés peuvent être visualisés soit sur une table U.V. ($\lambda = 312 \text{ nm}$) où les fragments marqués par le BET apparaissent fluorescents, soit par Southern blot + hybridation.

Le Southern blot a pour but de transférer les fragments amplifiés sur une membrane de nylon pour ensuite les révéler par hybridation moléculaire.

Après migration électrophorétique des produits d'amplification sur gel d'agarose, les différents fragments sont dénaturés par immersion du gel 2 fois 15 min. dans une solution de NaOH 0,5 M et NaCl 1,5 M. Le gel est ensuite neutralisé 2 fois 15 min. dans une solution de Tris HCl 0,5 M pH 7,5; NaCl 3 M. Les fragments sont transférés pendant une nuit par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Boehringer Mannheim) dans du SSC 20x (NaCl 3 M ; citrate de sodium 300 mM pH 7,0).

L'ADN est alors fixé par chauffage de la membrane à 120°C pendant 30 min. puis la membrane est mise en contact avec une solution de préhybridation (SSC 5x ; 1 % "Blocking reagent" [Boehringer] ; 0,1 % N lauroylsarcosine ; 0,02 % SDS) pendant 1 heure à 55°C.

L'hybridation s'effectue par immersion de la membrane dans une solution de préhybridation additionnée de 5 pmoles. mL^{-1} de sonde marquée à la digoxigénine. A l'issue de

l'hybridation, pendant 4 heures à 55°C, l'excès de sonde (sonde non spécifiquement fixée) est éliminé par 2 lavages, l'un dans du SSC 2x ; 0,1 % SDS à température ambiante, l'autre dans du SSC 0,1x ; 0,1 % SDS à 55°C. La révélation est effectuée par immuno-enzymologie à l'aide du kit de détection Boehringer Mannheim (Réf. 11 75 041).

Cette méthodologie n'est cependant utilisée que dans le chapitre Etudes méthodologiques (Résultats I) et lorsque le fragment amplifié est de taille différente de celle attendue.

V.1.4 Détection d'ARN d'entérovirus par le kit « amplicor enterovirus test »

Le protocole complet de détection du génome d'entérovirus (de l'extraction à la détection) nécessite l'utilisation de 3 kits Roche vendus séparément l'« Enterovirus Specimen Preparation Kit » (ART 0755370), l'« Enterovirus Amplification Kit » (ART 0755354) et l'« Enterovirus Detection Kit » (ART 0755362). La détection de génome d'entérovirus par utilisation de l'ensemble de ces kits est basée sur 4 étapes principales : l'extraction, la RT-PCR, l'hybridation des produits amplifiés et la détection par une réaction colorimétrique.

- Extraction du génome entéroviral

Cette étape a pour but de libérer l'ARN de la capside virale et d'inhiber les RNases. Cette méthode utilise du thiocyanate de guanidium associé à une précipitation à l'isopropanol. Le protocole est le suivant :

* Dans un eppendorf de 1,5 mL introduire :

- 100 µL de suspension virale ou d'échantillon à analyser
- 400 µL de tampon de lyse (Thiocyanate de guanidium, DTT et glycérol)

dans un tampon tris)

- * Incuber 10 min. à température ambiante
- * Ajouter 500 µL d'isopropanol
- * Centrifuger à 16 000 g, 10 min., 20°C
- * Eliminer le surnageant
- * Ajouter 750 µL d'éthanol 70%
- * Vortex 5 sec.
- * Centrifuger à 16 000 g, 10 min., 20°C
- * Eliminer le surnageant

* Resuspendre le culot dans 200 μ L de tampon diluant (Tampon contenant de l'acétate de manganèse, de l'acétate de potassium et 0,05% d'azide de sodium).

L'ARN ainsi extrait peut être conservé à -80°C ou être immédiatement amplifié par RT-PCR.

- RT-PCR

Les étapes de RT et de PCR sont réalisées avec la même enzyme : la rTth Polymerase. Les amorces utilisées pour la RT et la PCR permettent l'amplification d'un fragment de 150 nucléotides situé dans la région 5'NC du génome des entérovirus.

50 μ L d'ARN extraits sont ajoutés à 50 μ L de Mix RT-PCR (Tampon contenant 30% de glycérol ; <0,001% de dATP, dCTP, dGTP et dUTP ; des primers biotinylés ; <0,01% de rTth Polymerase ; 0,01% d'uracile N-glycosilase ; 0,05% d'azide de sodium).

Le mélange est placé dans le thermocycleur 9600 et est soumis au programme de température suivant :

- 2 min. à 50°C ,
- 30 min. à 60°C ,
- 1 cycle : 70 sec. à 94°C , 10 sec. à 58°C et 10 sec. à 72°C ,
- 34 cycles : 10 sec. à 94°C , 10 sec. à 58°C et 10 sec. à 72°C ,
- 60 min. à 72°C .

Dès la fin du programme, 100 μ L de solution de dénaturation (solution contenant de l'EDTA, 1,6% NaOH et du bleu de Thymol) sont ajoutés à chaque échantillon pour obtenir des fragments d'ADN simple brin.

Après incubation 10 min. à température ambiante, les produits amplifiés peuvent être directement soumis à l'étape d'hybridation ou être conservés 1 semaine à 4°C .

- Hybridation des produits amplifiés

Cette étape a pour but d'hybrider les fragments amplifiés simple brin dans des puits dans lesquels une sonde complémentaire d'une région de ces fragments a été fixée. Le protocole est le suivant :

- Ajouter dans chaque puits, 100 μ L de solution d'hybridation (solution de phosphate de sodium contenant <0,2% de surfactant et <25% d'agents chaotropes) et 25 μ L de produit amplifié simple brin

- Incuber 1 heure à 37°C

- Laver les puits 5 fois avec 400 μ L d'une solution de lavage (solution de phosphate de sodium contenant de l'EDTA et <2% de détergent) pour éliminer les fragments non hybridés.

- Détection des produits hybridés

Cette étape a pour but de révéler les fragments amplifiés par une réaction colorimétrique. L'étape de RT-PCR ayant été réalisée avec des amorces couplées à la biotine, les fragments amplifiés contiennent ce marqueur à leurs extrémités. De l'avidine couplé avec une peroxydase reconnaît la biotine en formant un complexe stable et il suffit alors de rajouter un substrat pour la peroxydase pour obtenir une coloration du milieu. Le protocole est le suivant :

- Ajouter 100 μ L d'avidine couplé à une peroxydase
- Incuber 15min. à 37°C
- Laver les puits 5 fois avec 400 μ L de solution de lavage pour éliminer l'avidine non fixée.

- Ajouter 100 μ L d'un mélange (vol/vol : 4/1) de substrat A (solution de citrate contenant 0,01% de H₂O₂) et B (0,1% de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine dans 40% de diméthylformamide).

- Incuber 10 min. à 37°C à l'obscurité
- Ajouter 100 μ L de solution Stop (Acide sulfurique 4,9%)
- Lire la DO à 450nm dans un lecteur automatique de plaques

Si les témoins négatifs ont une DO inférieure à 0,25 et les témoins positifs une DO supérieure à 2 le test est considéré comme valide. Dans ces conditions, l'échantillon analysé est considéré comme positif pour une DO supérieure à 0,35.

V.2 *Bactériophage B40-8 de Bacteroides fragilis HSP40*

Le phage B40-8 est quantifié sur une souche de *Bacteroides fragilis* HSP40.

V.2.1 Culture de *Bacteroides fragilis* HSP40

- Souche bactérienne

La souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 a été sélectionnée comme étant la plus sensible aux phages après une étude de détermination de la sensibilité respective de 25 souches du genre *Bacteroides* à 29 souches de phages (Jofre com. pers.).

Sa culture s'effectue en anaérobiose, elle est réalisée soit dans des tubes intégralement remplis de milieu, soit dans une jarre à anaérobiose (Gaspak BBL) utilisée avec un générateur d'hydrogène et de CO₂ (Anaérobic système BBL).

- Milieux de culture

Les trois milieux utilisés sont ceux préconisés par les chercheurs du Département de Microbiologie de l'Université de Barcelone. Leur composition est donnée en annexes 1a, 1b et 1c.

Le milieu gélosé MBB agar est coulé en boîte de pétri à raison de 15 mL par boîte et permet l'ensemencement en stries de la bactérie.

Le milieu BPRM est utilisé comme milieu liquide pour la croissance de *Bacteroides fragilis* HSP40.

Le milieu BPRM soft agar gélosé est utilisé pour la quantification des phages B40-8 par la méthode de la double couche.

- Conservation de la souche de *Bacteroides fragilis* HSP40

La souche de *Bacteroides fragilis* HSP40 peut-être conservée de 3 manières :

- En milieu liquide

Les cultures bactériennes en milieu liquide BPRM obtenues après croissance de 24 heures à 37°C se conservent à 4°C pendant une semaine.

- En milieu solide

Les colonies bactériennes obtenues après croissance de 48 heures à 37°C se conservent 1 mois à 4°C dans des jarres anaérobies.

- Sous forme congelée

Une culture bactérienne de 24 heures en milieu liquide peut se conserver à -70°C pendant une très longue période dans des tubes contenant 2/3 de culture bactérienne et 1/3 de glycérol en tant que cryoprotecteur.

- Culture de *Bacteroides fragilis* HSP40 pour la détection des bactériophages

Une culture de *Bacteroides fragilis* HSP40 en milieu BPRM liquide obtenue après incubation en anaérobiose 24 heures à 37°C est utilisée pour ensemercer en strie un milieu MBB agar en boîte de pétri de 90 mm de diamètre. L'ensemble des colonies développées après une incubation de 48 heures à 37°C en anaérobiose est recueilli et sert à inoculer 20 mL de BPRM liquide dans un tube de 20 mL.

Après 6 heures d'incubation en anaérobiose à 37°C, il est obtenu une culture de *Bacteroides fragilis* en phase exponentielle de croissance (DO : 0,3 à 620 nm) nécessaire pour la multiplication phagique.

V.2.2 Détection des phages B40-8

- Principe

La mise en évidence des bactériophages B40-8 est réalisée selon la technique de la double couche gélosée. Une couche basale coulée préalablement constitue la source nutritive pour le développement du tapis bactérien. Une autre couche de gélose molle contenant la culture bactérienne en phase exponentielle de croissance et la solution phagique à titrer est coulée sur la couche basale.

Après incubation dans les conditions optimales de culture, la présence de phages est révélée par l'apparition de plages de lyse dues à la multiplication phagique. Théoriquement, une plage de lyse est la conséquence de la multiplication d'une particule phagique. En effet, après la lyse cellulaire provoquée par cette multiplication, les bactériophages néoformés infectent à leur tour les cellules bactériennes environnantes, ce qui provoque après plusieurs cycles lytiques l'apparition d'une plage de lyse.

- Méthodologie

La méthode en double couche gélosée est utilisée et consiste à mélanger :

- 0,5 mL d'une culture de *Bacteroides fragilis* en phase exponentielle de croissance
- 1 mL de la solution phagique ou de l'échantillon à analyser
- 2,5 mL de BPRM soft agar maintenus en surfusion à 45°C.

Après homogénéisation, le mélange est coulé sur une couche basale de MBB agar préalablement coulée en boîte de pétri de 90 mm de diamètre. Après 16 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, la présence de phages est révélée par l'apparition de plages de lyse qui sont numérotées.

- Quantification

La quantification est réalisée par une méthode de type énumérative. Le traitement statistique des résultats obtenus consiste à procéder à l'estimation du paramètre d'une loi de Poisson (Maul 1991).

La quantification phagique est réalisée sur au moins trois dilutions successives, chaque dilution étant inoculée en triplicat. Un exemple de résultats obtenus est rapporté dans le tableau 10.

Dilution	Nombre de boîtes inoculées	Nombre de plages par boîte	Total
1/10	3	140 150 120	410
1/50	3	30 33 28	91
1/100	3	10 13 11	34

Tableau 10 : Résultats d'un titrage effectué par la méthode des plages (inoculum de 1 mL par boîte de pétri).

Si toute l'information contenue dans le tableau 10 est prise en compte, le nombre total de plages observées est $410 + 91 + 34 = 535$. Cette estimation de la concentration en phages

correspond à un volume de $3 \times \frac{1}{10} + 3 \times \frac{1}{50} + 3 \times \frac{1}{100} = 0,39$ mL de l'échantillon non dilué.

Lorsque le nombre de plages total est supérieur à 50, un intervalle de confiance au seuil de probabilité 95 % s'écrit :

$$Li = 535 - z_{0,975} \sqrt{535} \Leftrightarrow Li = 490$$

$$Ls = 535 + z_{0,975} \sqrt{535} \Leftrightarrow Ls = 580$$

ou $z_{1-\alpha/2}$ désigne la valeur de la variable normale centrée réduite au niveau de probabilité $1-\alpha/2$, au seuil de probabilité 95 % $z_{0,975} = 1,96$.

La densité phagique moyenne de l'échantillon non dilué est estimée à :

$$\frac{535}{0,39} = 1372 \text{ UFP mL}^{-1}$$

et les limites d'un intervalle de confiance au seuil de probabilité 95 % sont :

$$Li = \frac{490}{0,39} = 1256 \text{ UFP mL}^{-1}$$

$$Ls = \frac{580}{0,39} = 1487 \text{ UFP mL}^{-1}$$

Lorsque le nombre total de plages est inférieur à 50, un intervalle de confiance est calculé selon les formules 3 et 4.

$$Li = \frac{1}{2} \chi^2_{(\alpha/2, v_1)} \quad (3)$$

$$Ls = \frac{1}{2} \chi^2_{(1-\alpha/2, v_2)} \quad (4)$$

ou $\chi^2_{(\alpha, v)}$ représente la variable du Khi-deux au seuil de probabilité α avec v degré de liberté :

$$v_1 = 2 \times \text{nombre de plages}$$

$$v_2 = 2 \times (\text{nombre de plages} + 1)$$

Tous les résultats de titrage phagique sont traités de cette manière.

V.3 Coliphages somatiques

Les coliphages somatiques sont mis en évidence et quantifiés sur une souche d'*Escherichia coli* C, ATCC 13706 selon la norme ISO/CD 10705-2 (1996).

V.3.1 *Escherichia coli*

- Milieux de culture

Trois milieux sont utilisés pour la culture et la conservation d'*E. coli* et pour la mise en évidence des coliphages. La composition des milieux MSB, MSA et ssMSA est donnée en annexes (2a , 2b et 2c).

Le milieu MSB est utilisé comme milieu liquide pour la croissance d'*E. coli*, le milieu MSA est utilisé pour la croissance bactérienne en milieu solide et le milieu ssMSA est utilisé pour la quantification des coliphages somatiques par la méthode de la simple couche.

- Conservation de la souche d'*Escherichia coli*

La souche d'*E. coli* peut-être conservée de 2 manières :

- En milieu solide

Les colonies bactériennes obtenues après croissance de 18 heures à 37°C sur un milieu gélosé MSA se conservent 1 mois à 4°C.

- Sous forme congelée

Une culture bactérienne de 18 heures à 37°C en milieu MSB liquide peut se conserver à -70°C pendant une très longue période à condition d'être additionnée de 20% (v/v) de glycérol en tant que cryoprotecteur.

- Culture d'*E.coli*

La souche d'*E. coli* est décongelée etensemencée sur un milieu MSA. Après une incubation de 18 heures à 37°C, quelques colonies sontensemencées dans 50 mL de milieu liquide MSB. Après une nouvelle incubation à 37°C de 5 à 6 heures, une culture d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance (DO : 0,3 à 620nm) est obtenue.

V.3.2 *Détection des coliphages somatiques*

- Principe

La mise en évidence des coliphages somatiques est réalisée selon la technique de la simple couche gélosée. L'échantillon à analyser et la culture d'*E. coli* en phase exponentielle de croissance sont additionnés au milieu gélosé maintenu en surfusion à 45°C. Le mélange est ensuite coulé dans une boîte de Pétri.

Selon le même principe que pour les phages de *Bacteroides fragilis*, après incubation dans les conditions optimales de culture, la présence de phages est révélée par l'apparition de plages de lyse dues à la multiplication phagique.

- Méthodologie

La méthode en simple couche gélosée consiste à mélanger :

- 10 mL de ssMSA maintenus en surfusion à 45°C.
- 1 mL d'une culture d'*E.coli* en phase exponentielle de croissance
- 1 mL d'échantillon à analyser
- 50 µL de CaCl₂ 1M (stérilisés par filtration)

Après homogénéisation, le mélange est coulé dans une boîte de pétri de 90 mm de diamètre. Après 18 heures d'incubation à 37°C, la présence de coliphages est révélée par l'apparition de plages de lyse qui sont numérotées.

- Quantification

La quantification est réalisée par une méthode de type énumérative de la même manière que pour les phages de *Bacteroides fragilis*.

VI Echantillonnage

Deux types d'échantillonnage sont effectués selon qu'il s'agit d'eaux contaminées artificiellement ou d'eaux usées traitées.

VI.1 Eaux artificiellement contaminées

Le même mode d'échantillonnage est utilisé pour toutes les études de survie du coxsackievirus B3 infectieux, de son génome ainsi que des phages.

Les prélèvements d'eau de forage et de distribution sont réalisés dans des récipients stériles. En ce qui concerne l'eau de distribution, il est procédé au prélèvement après avoir laissé couler l'eau pendant 2 heures. La concentration en chlore libre est immédiatement mesurée par la méthode au DPD.

Pour chaque milieu étudié, deux litres sont contaminés par addition de 20 mL de suspension virale (coxsackievirus B3 ou phage de *Bacteroides fragilis*).

Après agitation magnétique d'une heure à température ambiante, les eaux sont réparties par fraction de 30 mL dans des piluliers stériles à usage unique qui sont placés à 25°C et à l'obscurité.

Pour chaque type de milieu, deux piluliers sont prélevés au hasard deux fois par semaine, l'un contenant du cox B3 et l'autre du phage de *Bacteroides fragilis*. Le cox B3 infectieux est quantifié par la méthode du NPP sur culture cellulaire, son génome est détecté par RT semi-nested PCR et le phage de *Bacteroides fragilis* est quantifié par la méthode des plages selon la technique de la double couche.

VI.2 Eaux usées traitées

Quel que soit le lieu de prélèvement, un récipient stérile de 25 litres est rempli de 20 litres d'eaux usées traitées à l'aide d'un seau. Après chaque prélèvement, le seau est traité à l'hypochlorite de soude puis avec une solution de thiosulfate de sodium. Les échantillons sont acheminés au laboratoire et les prélèvements ou les concentrations sont effectués au maximum 2 heures après le prélèvement.

VII Concentration des eaux usées traitées

Pour la détection des entérovirus et de leurs génomes, les échantillons d'eaux usées traitées sont soumis à une concentration soit sur poudre de verre soit sur laine de verre. De plus dans certains cas, une étape de concentration secondaire est réalisée par floculation organique.

La détection des phages de *Bacteroides fragilis* est effectuée après concentration des eaux usées traitées par filtration sur membrane inorganique.

VII.1 Concentrations primaires

Les concentrations primaires sont fondées sur un principe d'adsorption-élution des virus sur un support soit de poudre de verre soit de laine de verre. La concentration sur poudre de verre initialement proposée par Sarrette *et al.* (1977) nécessite l'acidification de l'eau à pH 3,5 et l'addition d' AlCl_3 , tandis que la concentration sur laine de verre proposée par Vilaginès *et al.* (1989) ne nécessite aucun traitement préalable de l'eau.

VII.1.1 Concentration sur poudre de verre

L'appareillage utilisé est réalisé en polycarbonate et comporte une colonne prolongée par une chambre d'expansion, la colonne est fermée à sa base par une fermeture amovible. L'appareillage et le protocole utilisés sont ceux proposés par Senouci et Schwartzbrod (1996).

Vingt litres d'eau usée traitée sont additionnés d' AlCl_3 , de façon à obtenir une concentration finale de $5 \cdot 10^{-4}$ M, puis acidifiés à pH 3,5 avec HCl 1N. Après homogénéisation, l'échantillon est soumis à une filtration ascensionnelle, par aspiration sous vide à un débit de 60 litres par heure, au travers de 170 g de poudre de verre borosilicatée chargée négativement (Sovirel 4585.10).

Après passage de la totalité de l'échantillon à travers le filtre dynamique de poudre de verre, celle-ci sédimente et l'eau surnageante est éliminée. La fermeture amovible est alors enlevée et 150 mL d'une solution éluante stérile pH 9,5 (glycine 0,05 M, 3 % d'extrait de boeuf, rouge de phénol à 0,0005 %) sont ajoutés à la partie supérieure de l'appareillage ce qui provoque la chute de la poudre de verre et du liquide d'éluion dans un bécher préalablement placé sous l'appareillage. Le mélange obtenu est alors agité pendant 10 minutes de façon à éluer les virus.

Après une décantation de 2 min., le liquide surnageant est recueilli et neutralisé. Il constitue le concentrat primaire.

VII.1.2 Concentration sur laine de verre

La concentration s'effectue par filtration à un débit de 10 litres par heure, de 20 litres d'eau usée traitée au travers de 50 grammes de laine de verre sodocalcique prétraitée (réf. : Rantigny 725 Saint Gobain), compactée dans une cartouche en acier inoxydable (Sartorius SM 16249).

50 g de laine de verre sont introduits dans la cartouche, en trois fractions égales tassées l'une après l'autre, à une densité de $0,4 \text{ g.cm}^{-2}$ donnant une hauteur de 7,2 cm de laine de verre dans le carter.

Le prétraitement de la laine de verre consiste à la rincer séquentiellement par 200 mL d'HCl 1N, 500 mL d'eau déminéralisée, 200 mL de NaOH 1N et 1000 mL d'eau déminéralisée. Ce traitement a pour effet d'éliminer la silice colloïdale susceptible d'être toxique pour les cultures cellulaires et de stériliser la laine de verre.

La cartouche étant reliée à la pompe à vide, l'eau à analyser est aspirée et filtrée à travers la laine de verre.

Après filtration de la totalité de l'échantillon, une élution fractionnée est pratiquée à l'aide de 300 mL d'une solution éluante stérile de pH 9,5 (glycine 0,05 M, 3 % d'extrait de boeuf, rouge de phénol 0,0005 %). L'élution fractionnée consiste à stopper la filtration pendant une minute après chaque passage d'une fraction de 100mL de solution éluante.

Les 300 mL d'éluat recueillis dans un flacon stérile sont immédiatement neutralisés à pH 7,2 et constituent le concentrat primaire.

VII.2 Concentration secondaire

Afin de disposer d'un concentrat de faible volume, inoculable dans sa totalité à des cellules sensibles, il est possible de soumettre les concentrats primaires à une concentration secondaire. Cette opération est réalisée par floculation organique selon Katzenelson *et al.* (1976).

Le principe de la floculation organique est d'acidifier le concentrat primaire afin d'obtenir un floc organique dans lequel les virus sont adsorbés ou emprisonnés. Après centrifugation, le culot contenant les virus est dissous dans un volume aussi faible que possible de solution tampon.

En pratique, les concentrats sont acidifiés à pH 3,5 avec HCl 2N. Après agitation magnétique lente de 45 min. à température ambiante, la suspension est centrifugée à 3000 g durant 45 min. à 4°C. Après avoir éliminé le surnageant, le culot obtenu est dissous dans un volume de solution de phosphate disodique 0,15 M pH 9,0 stérile correspondant à 1/10 du liquide de départ.

Après dissolution complète du culot par agitation, le concentrat obtenu est neutralisé à pH 7,2 \pm 0,2 et constitue le concentrat secondaire.

VII.3 Concentration sur membrane inorganique

Cette technique est utilisée pour la concentration des phages de *Bacteroides fragilis* à partir des eaux usées traitées. Elle a été proposée par Lucena *et al.* (1995) pour la concentration de ces bactériophages dans les eaux potables. Elle consiste à filtrer les échantillons d'eaux sur une membrane inorganique Anodisc (Whatman réf : 6809-5022) de porosité 0,22 μ m se qui permet de piéger les phages sur la membrane. L'étape de filtration s'effectue sous vide selon le protocole suivant :

- Filtration de 3 mL d'une solution d'extrait de boeuf à 3% à travers la membrane
- Filtration de 100 mL d'eau usée traitée

- Broyage de la membrane dans 5 mL de tampon glycine 0,25 M pH 9,5
- Vortex 1,5 min.
- Récupération du liquide surnageant qui constitue le concentrat

La totalité du concentrat est utilisée pour la quantification des phages. Le nombre total de phages dénombrés correspond donc à 100mL d'eau usée traitée.

VIII Décontamination des échantillons

Les échantillons provenant de l'environnement, concentrés ou non, contiennent non seulement les particules virales mais également des bactéries et des fungi susceptibles de se multiplier très rapidement soit sur les cultures cellulaires en provoquant leur destruction, soit sur les milieux gélosés provoquant des lectures difficiles.

En ce qui concerne la mise en évidence des entérovirus, de façon à éliminer ces micro-organismes, une filtration stérilisante est appliquée à chaque concentrat. Les filtres Millex GV stériles utilisés (Millipore réf : SLGV 025 BS) sont au préalable saturés en protéines par filtration de 2mL de sérum de veau nouveau-né pour limiter l'adsorption des virus sur la membrane. Du milieu MEM 10 fois concentré est également ajouté à raison de 0,1 mL par mL d'échantillon de façon à obtenir l'isotonie.

En ce qui concerne la mise en évidence des phages de *Bacteroides fragilis*, la même filtration est appliquée à l'échantillon d'eau ou au concentrat mais sans saturation du filtre. Cette étape s'étant révélée inutile lors d'essais menés au laboratoire (Vantelon 1995).

IX Filtration stérilisante des eaux

La filtration stérilisante est appliquée aux différentes eaux étudiées (PBS, eaux d'adduction et eaux de forage) et permet d'éliminer les micro-organismes et les matières en suspension. Les différentes eaux sont filtrées sur un filtre trépied (Millipore) équipé d'un préfiltre en fibre de verre (réf. AP25 Ø 124 mm) et de trois séries de filtres en esters de cellulose de porosités successives 1,2 µm (réf. RAWP Ø 142 mm) 0,45 µm (réf. HAWP Ø 142 mm) et 0,22 µm (réf. GSWP Ø 142 mm). La filtration s'effectue sous pression positive d'azote (0,2 - 0,3 bar).

Des contrôles de stérilité sont effectués lors de chaque filtration. En début et en fin de filtration, deux tubes de bouillon au thioglycolate-résazurine, pour la mise en évidence de micro-organismes anaérobies et aérobies, et deux tubes de milieu trypticase-soja, pour la détection de bactéries aérobies et de levures, sont chacun inoculés avec 1mL d'eau prélevé en

sortie de filtre. Les tubes sont ensuite incubés respectivement à 37°C et 22°C pendant 5 jours. Si aucun développement de micro-organismes n'est observé, les eaux sont considérées comme stériles.

X Dosage du chlore libre

Le dosage du chlore libre est réalisé par la méthode colorimétrique au N,N-diéthyle-p-phénylènediamine (DPD). L'oxydation du DPD menant à des intermédiaires de réaction colorés, la concentration en chlore libre est déterminée à l'aide d'un comparateur colorimétrique 2000 MKII (CIFEC 31102001) qui est équipé d'un disque 3/40E chlore 0,02 à 0,3.

Vingt millilitres d'eau à analyser sont placés dans le premier compartiment du comparateur sans addition de réactif et 20mL sont placés dans le deuxième compartiment contenant 2 pilules de DPD préalablement broyées. Après homogénéisation, la mesure est effectuée en tournant le disque jusqu'à concordance entre les couleurs.

XI Analyse statistique

XI.1 Comparaison des pentes d'inactivation

La comparaison des pentes d'inactivation de deux droites de régression (1 et 2) en fonction du temps (t) par un test de Student n'est possible que sous l'hypothèse que les variances liées ($\sigma_{z_1/t}^2$ et $\sigma_{z_2/t}^2$) associées à chacun des modèles de régression considérés sont égales.

La comparaison de deux variances liées est réalisée par un test de Fisher-Snedecor.

XI.1.1 Test de Fisher-Snedecor

Le test consiste à comparer les variances liées des deux séries étudiées. La fonction discriminante du test s'écrit :

$$F = \frac{s_{z_1/t}^2}{s_{z_2/t}^2}$$

Elle est comparée à l'intervalle : $1/F_{1-\alpha/2}(v_1; v_2)$ et $F_{1-\alpha/2}(v_1; v_2)$, valeurs tabulées d'une loi de Fisher-Snedecor pour $v_1 = N_1 - 2$ et $v_2 = N_2 - 2$ degré de liberté. N_1 et N_2 correspondent au nombre de points considérés pour le calcul des régressions 1 et 2.

Lorsque F se situe entre les deux bornes de l'intervalle, les variances liées $\sigma_{z1/t}^2$ et $\sigma_{z2/t}^2$ sont considérées comme égales au risque α .

XI.1.2 Test de Student

Si d'après le test précédent, les variances liées sont égales, alors la comparaison de deux pentes peut être effectuée par le test de Student. La fonction discriminante s'écrit alors :

$$t = \frac{b_1 - b_2}{\sqrt{s_{b_1}^2 + s_{b_2}^2}}$$

avec b_1 et b_2 = pentes des régressions 1 et 2, $s_{b_i}^2 = \frac{s^2}{\sum_{j=1}^{N_i} (t_j - \bar{t}_i)^2}$

$$\text{et } s^2 = \frac{(N_1 - 2)s_1^2 + (N_2 - 2)s_2^2}{N_1 + N_2 - 4}$$

L'hypothèse d'égalité des pentes est acceptée pour : $|t| < t_{N_1+N_2-4}(1-\alpha/2)$ valeur tabulée d'une loi de Student au seuil α avec $N_1 + N_2 - 4$ degrés de liberté.

XI.2 Test du χ^2

D'une manière générale, ce test consiste à déterminer si la répartition dans les différentes catégories est compatible avec la répartition théorique imposée par une hypothèse nulle H_0 . Dans notre domaine d'application, le test est adapté à des mesures appariées et l'hypothèse H_0 consiste à dire qu'un échantillon analysé par deux techniques a la même probabilité d'être positif.

Lorsque le χ^2 calculé à partir de l'effectif théorique avec H_0 est supérieur au $\chi_{(1-\alpha)}^2$, le test est significatif au seuil α .

XI.3 Test de Mann-Whitney

Ce test non paramétrique est utilisé dans cette étude pour comparer la concentration en micro-organismes dans les eaux usées traitées. Soit :

X la variable aléatoire associée à la mesure effectuée dans le premier milieu

Y la variable aléatoire associée à la mesure effectuée dans le deuxième milieu

x_1, x_2, \dots, x_{n_1} les valeurs de X associées aux n_1 observations du premier milieu

y_1, y_2, \dots, y_{n_2} les valeurs de Y associées aux n_2 observations du deuxième milieu

L'hypothèse H_0 consiste à dire que les x_i et les y_i proviennent d'une même population et en particulier que leur moyenne est identique. La fonction discriminante s'écrit :

$$W = \frac{2U - n_1 n_2}{\sqrt{n_1 n_2 (n_1 + n_2 + 1)}}$$

où U est le nombre de dépassement des x_i par les y_i .

La valeur W est situé par rapport à l'intervalle : $-z_{(1-\alpha/2)}$ et $z_{(1-\alpha/2)}$, valeurs tabulées d'une loi Normale centrée réduite. L'hypothèse H_0 est rejetée au seuil α lorsque W est situé à l'extérieur de l'intervalle $(-z_{(1-\alpha/2)} ; z_{(1-\alpha/2)})$.

Résultats

I

Etude méthodologique

Pour réaliser notre étude dans des conditions techniques satisfaisantes, nous avons dans un premier temps effectué un travail méthodologique qui nous a permis :

- de déterminer les conditions optimales de la « Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction » (RT-PCR) pour la détection du génome d'entérovirus dans les eaux;
- de comparer l'efficacité de deux protocoles de détection du génome des entérovirus (Technique PCR-laboratoire et technique PCR-Amplicor Roche);
- d'évaluer deux méthodes d'adsorption-élution pour la concentration des génomes d'entérovirus à partir d'eaux usées traitées.

1.1 Conditions optimales de détection du génome d'entérovirus

L'étude des conditions optimales de détection du génome entéroviral par RT-PCR est menée à 3 niveaux : l'extraction, le choix des amorces d'une part pour la PCR et d'autre part pour la RT et la sensibilité des protocoles d'amplification.

Toutes les expériences sont réalisées sur des dilutions en eau désionisée d'une même suspension de coxsackievirus B3 (cox B3).

1.1.1 Extraction

L'objectif est de déterminer si une extraction des acides nucléiques est nécessaire et, si oui, de déterminer parmi les techniques les plus utilisées laquelle est la plus adaptée à nos conditions expérimentales.

1.1.1.1 Intérêt de l'extraction

L'intérêt d'une étape d'extraction des acides nucléiques avant leurs détections par RT-PCR est évalué sur le critère de la sensibilité. Ainsi, à partir d'une suspension de cox B3 de titre 10^7 NPPUC.mL⁻¹, cinq séries de dilutions logarithmiques sont réalisées et le génome est détecté par RT-PCR dans chacune des dilutions, d'une part sans extraction et d'autre part avec extraction.

L'extraction est réalisée selon la méthode utilisant le thiocyanate de guanidium et les amorces utilisées sont l'oligo (dT)₁₅ pour la RT, et EP1 et EP4 pour la PCR.

A partir de la suspension virale, le fragment d'ADN amplifié de 412pb attendu est observé aussi bien avant qu'après extraction. Cependant dans ce dernier cas, l'intensité de la bande est nettement plus importante.

En ce qui concerne les dilutions, virales le fragment amplifié est observé jusqu'à la dilution 10^{-3} sans extraction et jusqu'à la dilution 10^{-4} après extraction.

Cette différence de sensibilité peut être due soit à la présence d'inhibiteurs dans la suspension brute qui seraient éliminés au cours de l'extraction, soit simplement à la méthode d'extraction qui théoriquement concentre les acides nucléiques d'un facteur 3,3.

Quoi qu'il en soit, la mise en oeuvre d'une extraction permettant d'augmenter la sensibilité de détection du génome viral, cette étape sera utilisée dans la suite du travail.

Cependant compte tenu de l'existence de plusieurs méthodes d'extraction, il nous a paru intéressant de comparer les 2 méthodes les plus classiques.

1.1.1.2 Comparaison de deux méthodes d'extraction

Deux méthodes d'extraction d'acides nucléiques sont classiquement décrites dans la littérature, l'une utilisant la protéinase K, l'autre le thiocyanate de guanidium. Le principe et le protocole des deux techniques sont décrits dans le chapitre matériels et méthodes (V.1.3).

La différence majeure entre les deux extractions, outre la nature de l'agent de dénaturation des protéines, est la double précipitation des acides nucléiques dans le protocole utilisant le thiocyanate de guanidium alors qu'une précipitation unique est réalisée dans le protocole utilisant la protéinase K.

Cent microlitres de dilutions logarithmiques d'une suspension de cox B3 titrant 10^7 NPPUC.mL⁻¹ sont extraits d'une part avec la protéinase K, d'autre part avec le thiocyanate de guanidium. Tous les paramètres étant liés, nous avons fait varier les amorces utilisées pour l'amplification et la méthode de mise en évidence (RT-PCR ou RT semi-nested PCR avec ou sans étape de Southern blot). Le tableau 11 décrit la nature des amorces utilisées et le tableau 12 décrit les conditions expérimentales et les sensibilités obtenues par chacune des techniques d'extraction.

Parmi les 8 conditions expérimentales testées, 1 seule différence de sensibilité a pu être observée (Série 1 et RT-PCR + Southern blot), cette différence disparaît après RT semi-nested PCR. Les résultats ne montrent donc aucune différence entre les deux protocoles d'extraction. Cependant, compte tenu du fait que des variations d'activité selon les lots de protéinase K ont pu être observées (Leparc com.pers.), l'extraction par le thiocyanate de guanidium a été choisie et est utilisée pour la suite du travail.

	Amorce	Séquence	Localisation
Série 1	EP1	CGG TAC CTT TGT GCG CCT GT	63-82 (5'NC)
	EP4	TTA GGA TTA GCC GCA TTC AG	475-456 (5'NC)
	EP3	GAT CAA CAG TCA GCG TGG CA	127-146 (5'NC)
	EP2 (Sonde)	TAT TGA GCT AGT TGG TAG TCC TCC GG	428-453 (5'NC)
Série 2	Primer 2	CAA GCA CTT CTG TTT CCC CGG	164-184 (5'NC)
	Primer 3	ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA	584-603 (5'NC)
	Primer F2	CTT GCG CGT TAC GAC	516-530 (5'NC)
	EP2 (Sonde)	TAT TGA GCT AGT TGG TAG TCC TCC GG	427-452 (5'NC)
Série 3	Primer A	CAG GGC CCA GTG GAA GA	2448-2464 (VP1)
	Primer B	GGC GTT TCC CTC GGT CCA AA	2972-2953 (VP1)
	Primer C	GAC CTT GAA TGG TAG TTC TT	2629-2610 (VP1)
	Primer D (Sonde)	CAG CCG CTA TAG GGA GAG TT	2472-2492 (VP1)
Série 4	VPA	CAA CTT AGG AGA AAG CTA GA	2746-2765 (VP1)
	VPB	CAC CTG GTG GTA CAT ACA TA	2893-2872 (VP1)
	VPC	CGG TTC GAC CTG GAG CTG AC	2782-2801 (VP1)
	VPD (Sonde)	CAG CCC TCA ACC ACA CAG AA	2824-2843 (VP1)

Tableau 11 : Liste des amorces et sondes utilisées

Conditions expérimentales		Dernière dilution positive	
Amorces	Détection	Extraction protéinase K	Extraction thiocyanate de guanidium
Série 1	RT-PCR	-3	-3
	RT-PCR + Southern blot	-5	-6
	RT semi-nested PCR	-6	-6
	RT semi-nested PCR + Southern blot	-6	-6
Série 2	RT semi-nested PCR	-7	-7
Série 3	RT semi-nested PCR	-7	-7
	RT semi-nested PCR + Southern blot	-7	-7
Série 4	RT-PCR + Southern blot	-6	-6

Tableau 12 : Comparaison des protocoles d'extraction utilisant la protéinase K et le thiocyanate de guanidium en fonction des amorces utilisées pour l'amplification et la détection du fragment amplifié.

1.1.2 Choix des amorces pour la PCR

Les amorces classiquement utilisées pour détecter le génome des entérovirus sont complémentaires d'une séquence soit de la région VP1, soit de la région 5'NC. Les amorces complémentaires d'une séquence située dans la région VP1, région hypervariable des entérovirus, sont utilisées pour détecter spécifiquement le génome d'un entérovirus. Les amorces complémentaires d'une séquence située dans la région 5'NC, région très conservée des entérovirus, sont utilisées pour détecter le génome de tous les entérovirus (à l'exception du virus Echo 22).

Quatre séries d'amorces décrites dans le tableau 11 sont testées, deux complémentaires de la région 5'NC (séries 1 et 2) et deux complémentaires de la région VP1 (séries 3 et 4). La comparaison porte sur la sensibilité et la spécificité. Elle est réalisée à partir de dilutions logarithmiques d'un cDNA obtenu par rétro-transcription d'une suspension de cox B3 titrant 10^7 NPPUC.mL⁻¹, l'ARN viral étant extrait par le thiocyanate de guanidium.

a) Région 5'NC du génome viral

-Série 1

Une PCR effectuée avec les amorces EP1 et EP4 permet d'obtenir un fragment amplifié de 412 pb. Les conditions optimales de PCR avec ces amorces sont déterminées en ce qui concerne la concentration en $MgCl_2$ et la température d'hybridation. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 13.

Température d'hybridation	Concentration en $MgCl_2$ (mM)			
	1	1,5	3	5
45°C	+	++	+	+/-
50°C	++	++	+	+
55°C	+++	+++	++	+

Tableau 13 : Détermination des conditions optimales de la PCR avec les amorces EP1 et EP4 (Nombre de + = intensité de la bande sur gel d'agarose en lumière UV).

Il apparaît que la réaction est optimale lorsque la température d'hybridation est de 55°C et la concentration en $MgCl_2$ de 1 ou 1,5 mM. Les solutions tampon commercialisées contenant 1,5mM de $MgCl_2$, c'est à cette concentration et à une température d'hybridation de 55°C que la PCR sera réalisée.

Dans ces conditions, en partant de dilutions logarithmiques d'un cDNA, il est possible de détecter le fragment amplifié de 412pb après RT-PCR jusqu'à la dilution 10^{-3} sur le gel d'agarose et 10^{-6} après Southern blot. Cependant après Southern blot, au moins 2 bandes sont visibles jusqu'à la dilution 10^{-6} alors que seulement une bande est visible sur le gel. Pour les dilutions suivantes ainsi que pour le témoin négatif (échantillon d'eau extrait au thiocyanate de guanidium) aucune bande n'apparaît. La présence de plusieurs bandes peut être due soit à une mauvaise spécificité des amorces qui reconnaissent plusieurs régions du génome viral, soit à une concentration trop importante en $MgCl_2$ ou à une concentration trop élevée en amorces.

Après RT semi-nested PCR, une seule bande est visible sur le gel jusqu'à la dilution 10^{-6} et le Southern blot fait apparaître plusieurs bandes jusqu'à la même dilution.

En conclusion, ces amorces permettent la détection du génome du cox B3 jusqu'à la dilution 10^{-3} ou 10^{-6} selon les conditions expérimentales mais n'apparaissent pas d'une spécificité satisfaisante. L'utilisation de cette série d'amorces nécessiterait donc des mises au point supplémentaires.

-Série 2

Une PCR effectuée avec les amorces "Primer 2" et "Primer 3" permet d'obtenir un fragment amplifié de 439 pb. Avec ces amorces Zoil *et al.* (1992) ont montré que les conditions optimales étaient une température d'hybridation de 50°C et une concentration de 1,5 mM en $MgCl_2$. Nos expériences sont donc réalisées dans ces conditions.

Les résultats montrent qu'après RT-PCR, aussi bien sur gel qu'après Southern blot, une seule bande de 439 pb est présente respectivement jusqu'à la dilution 10^{-3} et 10^{-5} . Les amorces de la série 2 paraissent donc parfaitement spécifiques avec cependant une sensibilité plus faible après Southern blot que les amorces de la série 1.

Cependant, après RT semi-nested PCR, les résultats montrent que les fragments amplifiés attendus de 366pb sont observés jusqu'à la dilution 10^{-7} aussi bien sur gel qu'après Southern blot. Dans ces conditions, ces amorces apparaissent parfaitement spécifiques avec une sensibilité supérieure à celle obtenue avec la série 1.

En conclusion et compte tenu de ces résultats, en ce qui concerne la région 5'NC, nous avons considéré que la série 2 était la plus adaptée à nos conditions expérimentales.

b) Région VP₁ du génome

-Série 3

Une PCR effectuée avec les amorces "Primer A" et "Primer B" doit aboutir à l'obtention d'un fragment amplifié de 524 pb. En travaillant dans les conditions optimales décrites par Leparc *et al.* (1993) (concentration de $MgCl_2$ de 1,5mM et température d'hybridation de 50°C), aucune bande aspécifique n'apparaît sur le gel ou sur la membrane de transfert (Southern blot).

Après RT-PCR, la bande de 524 pb attendue est visible jusqu'à la dilution 10^{-3} sur le gel et 10^{-5} après Southern blot.

Après RT semi-nested PCR, la sensibilité est la même sur le gel et après Southern blot puisque le fragment de 343pb est observé dans les deux cas jusqu'à la dilution 10^{-7} .

En conclusion, cette série d'amorces apparaît parfaitement spécifique dans nos conditions expérimentales et présente une sensibilité équivalente à celle de la série 2 quelles que soient les conditions expérimentales.

-Série 4

Une PCR effectuée avec les amorces VPA et VPB doit permettre d'obtenir un fragment amplifié de 147 pb. Nos expérimentations montrent qu'après RT-PCR réalisée avec une température d'hybridation de 55°C et quelle que soit la concentration en MgCl₂, des bandes aspécifiques sont visibles sur le gel. Ces bandes ne sont plus mises en évidence après transfert sur membrane. Il s'agit donc de l'amplification de fragment d'ADN ne contenant pas la séquence reconnue par la sonde. La bande de 147 pb est détectée jusqu'à la dilution 10⁻³ sur le gel et 10⁻⁵ après Southern blot.

Les bandes aspécifiques apparaissent encore plus nettement lorsqu'une semi-nested PCR est réalisée sur la dilution 10⁻⁶ déjà traitée par RT-PCR, quelle que soit la concentration en MgCl₂.

En conclusion, ces amorces sont moins spécifiques dans nos conditions expérimentales que celles de la série 3. La série d'amorces 3 apparaît donc comme étant la plus adaptée à nos conditions expérimentales.

Les résultats de cette évaluation montrent qu'après RT semi-nested, la spécificité et la sensibilité des amorces sélectionnées pour la région 5'NC (série 2) et pour la région VP1 (série 3) sont identiques.

Dans ces conditions, nous avons considéré qu'il était plus intéressant de travailler avec les amorces situées dans la région 5'NC car elles présentent l'avantage de permettre la mise en évidence du génome de tous les entérovirus (à l'exception d'Echo 22 qui possède une séquence 5'NC totalement différente de celle des autres entérovirus) contrairement aux amorces situées dans la région VP1 qui sont spécifiques du cox B3. En effet, au cours des dernières étapes de ce travail, il est prévu de rechercher dans le milieu hydrique l'ensemble des entérovirus et non le seul cox B3. L'utilisation des amorces situées en 5'NC permet d'utiliser le même protocole tout au long de ce travail.

I.1.3 Choix des amorces pour la rétro-transcription

Pour la synthèse de l'ADNc il est possible d'utiliser soit l'une des amorces utilisées pour l'amplification par PCR (primer 3) soit un oligo dT₁₅ situé dans la région 3'NC du

génomique virale. Le primer 3 permet la synthèse d'un ADNc de l'ordre de 600 bases alors que l'oligo (dT)₁₅ permet la transcription de tout le génome viral (7500 bases). Compte tenu de la différence de taille importante entre ces 2 ADNc, il est possible que le rendement de rétro-transcription soit modifié. L'activité de ces 2 amorces pour la synthèse de l'ADNc est donc comparée.

Pour ce faire, l'ARN d'une dilution de cox B3 titrant environ 10³ NPPUC.mL⁻¹ est extrait au thiocyanate de guanidium. Le cDNA est synthétisé par rétro-transcription, soit avec l'oligo (dT)₁₅, soit avec le primer 3. Des dilutions logarithmiques du cDNA sont amplifiées par semi-nested PCR (amorces série 2). Dans les deux cas, le fragment de 366 pb attendu est observé jusqu'à la dilution 10⁻³ (figure 3), ce qui témoigne d'une sensibilité identique. Cependant l'intensité de la bande recherchée apparaît plus importante lorsque le primer 3 est utilisé, ce qui suggère qu'un meilleur rendement de réaction est obtenu avec cette amorce mais la différence est faible et inférieure à un facteur 10.

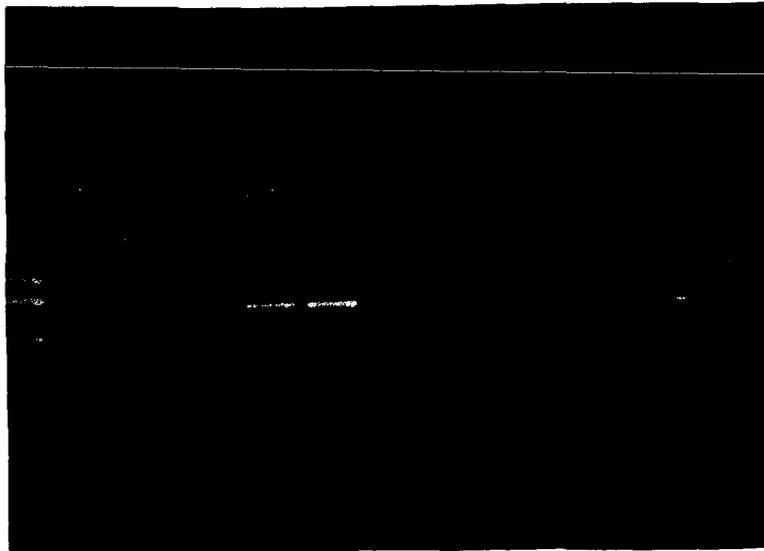


Figure 3 : Détection du génome du coxsackievirus B3 après RT semi-nested PCR (amorces série 2) sur des dilutions logarithmiques d'un stock viral de titre 10³ NPPUC.mL⁻¹. La RT étant réalisée soit avec un oligo (dT)₁₅ (région 3'NC du génome viral) soit avec le primer 3 (région 5'NC du génome viral). De gauche à droite : Marqueur de poids moléculaires ; dilution -5; -4; -3; -2; -1 avec le primer 3 ; témoin négatif ; dilution -5; -4; -3; -2; -1 avec l'oligo (dT)₁₅.

Lorsque la semi-nested PCR est réalisée avec des amorces situées dans la région 5'NC et que la RT est réalisée avec un oligo (dT)₁₅, la présence du fragment de 366 pb traduit la présence d'un génome viral complet alors qu'avec le primer 3, la présence du fragment de

366 pb peut aussi témoigner de l'existence de fragments du génome viral. Dans ces conditions et malgré la légère différence de sensibilité, nous utiliserons comme amorce pour toutes les rétro-transcriptions, l'oligo (dT)₁₅.

1.1.4 Sensibilité du protocole d'amplification préconisé

Les études précédentes permettent de proposer un protocole adapté à nos conditions expérimentales et qui sera utilisé tout au long du travail. Ce protocole est le suivant :

- Extraction : thiocyanate de guanidium
- Rétro-transcription : oligo (dT)₁₅ en amorce
- Amplification :
 - Amorces en 5'NC (série 2)
 - Concentration en MgCl₂ 1,5 mM
 - Température d'hybridation 50°C

Cependant avant d'appliquer ces conditions opératoires, il est nécessaire de déterminer la sensibilité des divers protocoles d'amplification (RT-PCR ou RT semi-nested PCR avec ou sans Southern blot).

Des dilutions logarithmiques d'un stock de cox B3 (10⁷ NPPUC.mL⁻¹) sont traitées au thiocyanate de guanidium pour en extraire l'ARN. Le cDNA de chaque échantillon est synthétisé par rétro-transcription avec un oligo (dT)₁₅.

Sur chaque échantillon, il est alors réalisé en parallèle une PCR et une semi-nested PCR, la lecture étant effectuée d'une part par lecture directe sur gel, d'autre part après Southern blot. Les expérimentations sont réalisées en triplicat, les résultats sont représentés dans le tableau 14.

Un signe + représente la détection de génome dans les trois expérimentations et inversement un signe - représente l'absence de génome. Un signe +/- traduit un échantillon positif et deux négatifs sur les 3 expérimentations.

L'analyse des résultats montre, en faisant l'hypothèse d'un rendement de 100 % pour l'extraction et la RT, qu'avec le protocole préconisé, la PCR est positive en présence de 100 NPPUC dans le tube réactionnel, alors que la semi-nested PCR donne une réponse positive en présence de 0,01 NPPUC. Le couplage d'un Southern blot avec la PCR améliore la sensibilité de cette technique de 2 à 3 unités logarithmiques. Par contre, appliqué à la semi-nested PCR, le Southern blot n'augmente pas la sensibilité de la méthode.

Dans ces conditions, il est clair que l'amplification par RT semi-nested PCR est, à sensibilité égale, la technique la plus simple.

	Quantité virale dans le volume réactionnel (NPPUC)					
	100	10	1	0,1	0,01	0,001
RT-PCR	+	-	-	-	-	-
RT PCR + Southern blot	+	+	+	+/-	-	-
RT Semi-Nested PCR	+	+	+	+	+/-	-
RT Semi-Nested PCR + Southern blot	+	+	+	+	+/-	-

Tableau 14 : Sensibilité des protocoles d'amplification

En conclusion, le système préconisé permet la détection du génome du coxsackievirus B3 avec une sensibilité à volume égal 100 fois supérieure à la culture cellulaire et peut s'appliquer à la détection de tous les entérovirus sauf Echovirus 22.

1.2 Détection des génomes d'entérovirus dans les eaux : étude comparative de deux méthodes de concentration.

La RT-PCR, méthode rapide, sensible et adaptée à la détection de tous les sérotypes viraux, est de plus en plus préconisée pour mettre en évidence les génomes de virus entériques dans l'environnement (Puig *et al.*, 1994 ; Atmar *et al.*, 1993 et 1995). Cette technique est, selon la littérature, de 10 à 1000 fois plus sensible que la culture cellulaire (Kopecka *et al.*, 1993). Les résultats que nous avons décrits précédemment (I.1) confirment ces données et permettent d'estimer que la sensibilité de la RT semi-nested PCR est de 10 à 100 fois supérieure à celle de la culture cellulaire à volume égal. La question est de savoir si cette méthodologie doit être réalisée directement à partir de l'échantillon ou à partir d'un concentrat viral obtenu à partir d'un grand volume d'eau. Dans ce cas, la concentration idéale doit non seulement concentrer les virus mais aussi éliminer les éventuels inhibiteurs des réactions enzymatiques de RT-PCR (Abbazadegan *et al.*, 1993).

De nombreuses techniques de concentration des virus entériques à partir du milieu hydrique sont proposées dans la littérature. Les plus utilisées sont celles faisant appel à l'adsorption-élution des virus sur des supports tels que la poudre de verre ou la laine de verre, des filtres électropositifs ou négatifs, des membranes filtrantes

Ce type de méthodologie demande l'utilisation de solutions éluantes contenant de l'extrait de boeuf qui est susceptible d'interférer avec les réactions enzymatiques de RT-PCR (Schwab *et al.*, 1993).

Le but de cette étude est de déterminer si les techniques de concentration primaire par adsorption-élution sur poudre de verre ou laine de verre et de concentration secondaire par floculation organique peuvent être appliquées à la détection de génomes d'entérovirus par RT semi-nested PCR dans les eaux usées traitées. Pour ce faire, il est déterminé dans un premier temps si les solutions utilisées soit pour la désorption virale soit pour la concentration secondaire apportent des inhibiteurs qui pourraient interférer avec la RT semi-nested PCR.

Dans un deuxième temps, 25 échantillons d'eaux usées traitées de la station d'épuration de Nancy sont analysés par RT semi-nested PCR soit directement, soit après concentration primaire sur poudre de verre et sur laine de verre, soit après concentration secondaire (floculation organique).

Vingt cinq échantillons de 40 litres d'eaux usées traitées sont prélevés à la sortie de la station d'épuration de Nancy et sont concentrés sur laine de verre et poudre de verre à raison de 20 litres pour chaque support. Les concentrats primaires obtenus sont reconcentrés par floculation organique. Les entérovirus sont recherchés directement dans l'eau, dans les concentrats primaires et dans les concentrats secondaires par RT semi-nested PCR. La détection du génome s'effectue sur un volume équivalent à 25µL des concentrats primaires et des concentrats secondaires.

1.2.1 Interférences des solutions utilisées lors des concentrations avec la détection des génomes

Afin de déterminer si la nature des solutions éluantes peut interférer avec les réactions enzymatiques de la RT semi-nested PCR, le génome du coxsackievirus B3 est recherché d'une part dans la solution d'élution (glycine 0,05 M, extrait de boeuf 3 %, rouge de phénol 0,0005 %), d'autre part dans le concentrat secondaire (solution d'élution traitée par floculation organique) et enfin dans du PBS et de l'eau MilliQ stérile pris comme témoin.

Ceci a été réalisé à partir de dilutions logarithmiques dans ces différents milieux d'une suspension de coxsackievirus B3 de titre initial $3 \cdot 10^7$ NPPUC.mL⁻¹.

L'ARN viral est recherché par RT semi-nested PCR dans les échantillons contenant de 0,03 à 30 NPPUC mL⁻¹ de coxsackievirus B3.

Les résultats de l'expérimentation réalisée en duplicat sont regroupés dans le tableau 15.

Milieu de dilution	Titre viral en NPPUC mL ⁻¹			
	30	3	0,3	0,03
PBS	++	++	--	--
H ₂ O	++	++	--	--
Solution d'élution	++	++	--	--
Solution d'élution reconcentrée par floculation organique	++	+-	--	--

Tableau 15 : Sensibilité de la RT semi-nested PCR dans différentes solutions : PBS, eau MilliQ, solution d'élution (0,05 M, 3 % extrait de boeuf, rouge de phénol 0,0005 %, pH 7,2) et solution d'élution reconcentrée par floculation organique. L'expérimentation est réalisée en duplicat, les deux signes + ou - (présence ou absence de génome) représentent le résultat de chacune des expériences.

Il apparaît que la sensibilité de la méthode de détection se situe entre 3 et 0,3 NPPUC mL⁻¹, ce qui correspond, compte tenu du volume testé, à une limite de détection située entre 0,1 et 0,01 NPPUC.

Ces résultats varient très peu en fonction des milieux testés, en particulier la détection du génome viral dans la solution d'élution et dans le concentrat secondaire s'effectue avec une sensibilité équivalente à celle obtenue dans du PBS ou de l'eau MilliQ.

En conclusion, il apparaît qu'en fait les différentes solutions utilisées lors des étapes de concentrations n'interfèrent pas avec les réactions enzymatiques de RT semi-nested PCR.

1.2.2 Détection du génome directement dans les eaux usées traitées

Le génome d'entérovirus a été recherché directement dans les 25 échantillons d'eaux usées traitées. Aucun génome n'a pu être détecté dans nos conditions expérimentales ce qui traduit, soit un manque de sensibilité de la méthode de détection dû au faible volume testé (25 µL), soit à la présence d'inhibiteurs, soit à une faible présence de génome viral.

I.2.3 Détection du génome après concentration primaire et secondaire

Les génomes d'entérovirus sont détectés d'une part après concentration primaire sur laine de verre (LDV) et poudre de verre (PDV) et d'autre part après concentration secondaire par floculation organique. Les résultats sont présentés dans le tableau 16.

		Concentration primaire sur LDV			Concentration secondaire des éluats PDV		
		+	-	Total	+	-	Total
Concentration primaire sur PDV	+	10	4	14	11	3	14
	-	2	9	11	7	4	11
	Total	12	13	25	18	7	25
Concentration secondaire des éluats LDV	+	2	3	5	4	1	5
	-	10	10	20	14	6	20
	Total	12	13	25	18	7	25

+ / - Présence ou absence de génome viral

Tableau 16 : Comparaison des techniques de concentration sur laine de verre (LDV) et poudre de verre (PDV) pour la recherche du génome d'entérovirus par RT semi-nested PCR dans les eaux usées traitées. La comparaison est effectuée après concentration primaire et après reconcentration des concentrats primaires par floculation organique.

Il apparaît que 14 concentrats primaires sont positifs en PDV et 12 en LDV, 10 concentrats primaires sont positifs dans les deux cas. L'analyse statistique des résultats (test du χ^2) ne montre aucune différence significative au seuil 5 % ($\chi^2 = 0,67$) entre les deux techniques de concentration primaire.

Après concentration secondaire par floculation organique, 18 échantillons sont positifs à partir des concentrats PDV et seulement 5 le sont à partir des concentrats LDV. La différence est significative au seuil 5% ($\chi^2 = 11,3$) et il est à noter que seulement 2 concentrats primaires et secondaires LDV sont simultanément positifs alors que 11 concentrats primaires et secondaires PDV le sont.

Lorsque la concentration est réalisée sur PDV, 14 concentrats primaires et 18 concentrats secondaires sont positifs. La légère augmentation du nombre d'échantillons positifs après concentration secondaire n'est pas significative au seuil 5 % ($\chi^2 = 1$). Il faut

cependant noter que 7 échantillons négatifs à partir des concentrats primaires se sont révélés positifs à partir des concentrats secondaires. Ainsi en cumulant les résultats obtenus en PDV à partir des concentrats primaires et des concentrats secondaires, il est constaté que sur 25 échantillons d'eaux usées traitées, 21 se révèlent positifs.

Après concentration sur LDV, 12 concentrats primaires et seulement 5 concentrats secondaires sont positifs. La diminution du nombre d'échantillons positifs est significative au seuil 10% ($\chi^2 = 3,80$). Dans ce cas, seulement 3 échantillons négatifs à partir des concentrats primaires se sont révélés positifs à partir des concentrats secondaires. Ainsi en cumulant les résultats obtenus en LDV à partir des concentrats primaires et des concentrats secondaires, il est constaté que sur 25 échantillons d'eaux usées traitées, 15 se révèlent positifs.

1.2.4 Discussion

L'étude de la sensibilité de la détection du génome viral par RT semi-nested PCR effectuée dans l'éluant et le concentrat secondaire obtenu par floculation organique, ne met en évidence aucune interférence avec des réactions enzymatiques mises en jeu. Pourtant l'éluant contient de l'extrait de boeuf et Schwab *et al.* (1993) rapportent une inhibition de la PCR dans ces conditions. L'absence d'inhibition dans nos conditions expérimentales est peut-être due à la nature de la technique d'extraction de Chomczynski et Sacchi (1987) qui n'a pas été testée par ces auteurs et qui permet notamment l'élimination d'une partie des protéines.

La concentration des virus à partir des eaux usées épurées semble tout à fait indispensable dans nos conditions expérimentales puisque sur les 25 échantillons, aucun génome d'entérovirus n'a pu être détecté directement à partir de l'eau. Ceci peut s'expliquer soit par le faible volume testé (25 μ L) qui n'est pas représentatif de la contamination du milieu, soit par la faible contamination virale de ces eaux traitées, soit par la présence d'inhibiteurs.

La comparaison entre les deux techniques de concentration primaire ne montre aucune différence significative en matière de détection de génome viral, le nombre de positifs étant respectivement de 56 % et 48 % après concentration sur PDV et LDV. Par contre, après concentration secondaire par floculation organique une différence significative est mise en évidence avec respectivement 72 % et 20 % de concentrats secondaire positifs en PDV et LDV. La concentration secondaire augmente légèrement le nombre d'échantillons positifs lorsqu'elle est effectuée à partir des concentrats PDV alors qu'une inhibition est observée

dans au moins 30 % des échantillons lorsque la concentration est réalisée à partir des concentrats LDV.

Sur 25 échantillons testés, la prise en compte simultanée des résultats obtenus à partir des concentrats primaires et secondaires permet d'obtenir 84 % d'échantillons positifs en PDV et seulement 60 % en LDV.

La discordance des résultats obtenus après concentration secondaire pourrait être expliquée par la présence de matières organiques et en particulier d'acides humiques en plus ou moins grande proportion dans les concentrats selon les techniques utilisées.

En effet, de nombreuses études montrent d'une part que les matières organiques, notamment les acides humiques, présentes dans les eaux interfèrent avec la concentration des entérovirus sur des filtres microporeux (Guttman-Bass and Catalano-Sherman, 1985, 1986 ; Sobsey *et al.*, 1985), d'autre part que les acides humiques sont susceptibles d'inhiber les réactions enzymatiques de RT-PCR (Tsai et Olson 1992 a et b). Dans ces conditions, il est possible de supposer que le support PDV concentre moins de matières organiques responsables d'inhibition que le support LDV. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'acidification de l'eau avant concentration sur PDV provoque une précipitation des acides humiques, cette précipitation a d'ailleurs pour conséquence le colmatage des filtres électro négatifs (Ma *et al.*, 1994a). Dans ces conditions, avec la technique PDV, une partie des acides humiques ne se retrouve pas dans le concentrat et donc n'est pas reconcentrée lors de la floculation organique alors que dans la technique LDV, où il n'y a pas d'acidification préalable de l'échantillon, une plus grande concentration d'acides humiques est présente dans le concentrat secondaire.

Par ailleurs, la LDV est un support à charge mixte et contient des charges positives contrairement à la PDV, cette différence de charges peut favoriser la fixation de matières organiques susceptibles d'être éluées et reconcentrées par floculation organique et ainsi de jouer le rôle d'inhibiteurs de la RT semi-nested PCR.

Cette hypothèse permettrait d'expliquer les résultats obtenus par Kopecka *et al.* (1993) qui observent une forte inhibition de la RT-PCR après concentration sur filtre 1-MDS (filtres électro positifs) dans de l'eau du robinet ainsi que ceux d'Abbaszadegan *et al.* (1993) qui observent une inhibition, supposée être due aux acides humiques, après concentration d'eaux de surface sur filtre MK cartridge filter (filtres électro positifs) suivie d'une reconcentration par floculation organique.

En conclusion, il apparaît que dans nos conditions expérimentales, la détection du génome d'entérovirus par RT semi-nested PCR directement dans les eaux usées épurées s'est

révélée négative. Par contre, l'application des techniques de concentration par adsorption-élution sur laine de verre et poudre de verre s'est révélée satisfaisante et comparable pour les 2 supports utilisés. Enfin, la mise en oeuvre d'une concentration secondaire par floculation organique s'est révélée très défavorable à la détection du génome après concentration sur LDV.

La détection du génome entéroviral dans les eaux usées traitées peut dans ces conditions être préconisée après concentration sur LDV ou PDV. Une concentration secondaire par floculation organique est non seulement inutile mais préjudiciable après concentration sur laine de verre, par contre elle permet d'augmenter légèrement la sensibilité de détection du génome après concentration sur poudre de verre.

La comparaison de la présence d'entérovirus infectieux et de génomes viraux dans les eaux usées traitées sera réalisée dans la suite du travail par analyse des concentrats primaires LDV.

Ces résultats suggèrent que le génome viral peut être recherché avec une sensibilité équivalente dans les eaux usées traitées soit après concentration sur PDV, soit après concentration sur LDV, soit après concentration secondaire des concentrats PDV. La recherche des génomes après concentration secondaire des concentrats LDV s'effectue avec une sensibilité inférieure aux trois autres protocoles.

En ce qui concerne la détection des entérovirus infectieux, Senouci (com. pers.) travaillant sur les mêmes échantillons d'eaux usées traitées concentrées (concentration primaire PDV et LDV et concentration secondaire) a montré d'une part que ces eaux contenaient en moyenne de 0,7 à 8,2 NPPUC.L⁻¹ d'entérovirus et d'autre part que l'inoculation des concentrats secondaires sur culture cellulaire provoquait une toxicité vis à vis des cellules. Ces phénomènes de toxicité peuvent être la source d'une sous-estimation de la concentration des entérovirus dans l'eau analysée.

Le but de notre étude étant de comparer la présence des génomes à celle des virus infectieux, nous avons considéré que la concentration primaire était plus adaptée. Dans ces conditions et pour la suite de ce travail, la recherche simultanée d'entérovirus infectieux et de génome viral sera réalisée à partir de concentrat primaire LDV compte tenu du fait que la concentration sur LDV est préconisée dans la Norme AFNOR XTP 90-451 et que les résultats obtenus sont identiques à ceux obtenus avec la PDV.

1.3 Comparaison RT semi-nested PCR « labo » et « enterovirus detection kit »

Les laboratoires recherchant le génome d'entérovirus dans l'environnement, utilisent chacun leur propre méthode de mise en évidence toutes basées sur la RT-PCR. Les

protocoles diffèrent par la nature du traitement d'extraction qui peuvent notamment s'effectuer par un traitement à forte température (Abbaszagedan *et al.* 1993), par le protocole décrit par Chomczynski et Sacchi (1987) utilisant le thiocyanate de guanidium, par le protocole utilisant la protéinase K (Maniatis *et al.* 1989) et par adsorption sur particule de silice (Boom *et al.* 1990). De plus, chaque laboratoire utilise ces propres amorces pour la RT et la PCR et sa propre méthode de détection (gel, hybridation sur membrane, test Elisa...). Ces variations d'un laboratoire à l'autre rendent la comparaison des résultats délicate.

Il est donc hautement souhaitable de réaliser une standardisation des méthodes. Dans ce cadre, la société Roche a mis au point un test standardisé pour la recherche du génome des entérovirus par RT-PCR. Ce kit dénommé « Enterovirus detection kit » (« Kit-entérovirus ») est actuellement utilisé en biologie clinique notamment pour le diagnostic des entéroviroses à partir des liquides céphalo-rachidiens.

Une étude multicentrique a été mise sur pied pour déterminer si ce test était utilisable pour détecter les génomes entéroviraux dans les eaux usées traitées.

En prenant comme point de départ cette étude réalisée sur 21 échantillons, nous l'avons poursuivie en analysant 27 autres échantillons. Au total nous avons recherché le génome d'entérovirus, en mettant en oeuvre simultanément le « kit entérovirus » et la technique de RT semi-nested PCR « labo » (matériels et méthodes V.1.3 et V.1.4), dans 48 échantillons d'eaux usées traitées.

Le tableau 17 résume les principales différences entre RT semi-nested PCR « labo » et le « kit- entérovirus ».

	RT semi-nested PCR « labo »	« Kit-entérovirus »
Méthode d'extraction	Thiocyanate de guanidium Phénol-Chloroforme Double précipitation (isopropanol)	Thiocyanate de guanidium - Simple précipitation (isopropanol)
Enzyme de rétro-transcription	AMV rétro-transcriptase	rTh polymerase
Enzyme de PCR	Taq polymerase	rTh polymerase
Amplification	Semi-nested PCR	PCR
Détection	Gel d'agarose	Test Elisa

Tableau 17 : Principales différences entre les protocoles de mise en évidence des génomes entéroviraux par RT semi-nested PCR utilisée au laboratoire (« labo ») et par le « kit-entérovirus ».

Trois séries de 16 échantillons d'eaux usées sont prélevées à la sortie de la station d'épuration de Nancy (Nancy secondaire), à la sortie du décanteur secondaire de la station d'Epinal (Epinal secondaire) et enfin après le traitement tertiaire de déphosphatation de la station d'Epinal (Epinal tertiaire). Cet échantillonnage permet de disposer de trois séries d'échantillons d'eaux usées traitées de qualité différente.

De plus, les analyses ont été effectuées simultanément, directement à partir des eaux et à partir des concentrats obtenus après concentration sur laine de verre de 20 litres d'eaux, soit donc un total de 96 échantillons.

1.3.1. Analyse directe des eaux usées traitées

Chaque échantillon d'eau ayant été testé simultanément par RT semi-nested PCR « labo » et par le « kit-entérovirus », la comparaison entre ces deux techniques de détection s'effectue sur un nombre total de 48 échantillons. Le volume d'eau analysé est de 25 μ L pour la RT semi-nested PCR « labo » et de 100 μ L pour le « kit-entérovirus ».

Dans le tableau 18 est réalisé le bilan des concordances et discordances des résultats obtenus par les 2 techniques.

		« kit-entérovirus »		
		+	-	Total
RT semi-nested PCR « labo »	+	4	5	9
	-	7	32	39
	Total	11	37	48

Tableau 18 : Concordances et discordances entre RT semi-nested PCR « labo » et « kit-entérovirus » obtenues après analyse directe de 48 échantillons d'eaux usées traitées.

Il est à noter, d'une manière globale, que le pourcentage d'échantillons positifs par RT semi-nested PCR « labo » (19%) est peu différent à celui obtenu par le « kit-entérovirus » (23%).

Le détail des résultats montre que 4 échantillons sont positifs et 32 négatifs avec les deux techniques, ce qui correspond à 75% de concordance. Sur les 25% de discordance, 5 échantillons sont positifs par RT semi-nested PCR « labo » et négatifs par le « kit-entérovirus » et inversement, 7 échantillons sont négatifs par RT semi-nested PCR « labo »

et positifs par le « kit-entérovirus ». Le test du χ^2 ne fait apparaître aucune différence significative au seuil 5% ($\chi^2 = 0,33$) entre les 2 techniques de détection.

En conclusion, la détection de génome d'entérovirus directement dans les eaux usées traitées semble s'effectuer avec une sensibilité équivalente par RT semi-nested PCR « labo » et par le « kit entérovirus ». Cependant le grand nombre d'échantillons négatifs nécessite de confirmer cette observation sur des échantillons d'eaux concentrées.

1.3.2 Analyse des eaux usées traitées après concentration

La recherche du génome d'entérovirus est dans ce cas réalisée simultanément par RT semi-nested PCR « labo » et par le « kit-entérovirus » non plus directement sur l'échantillon d'eau, mais à partir des concentrats obtenus après adsorption-élution sur laine de verre de 20 litres d'eaux. Le travail est réalisé sur les mêmes échantillons que précédemment. Chaque échantillon d'eau ayant été testé simultanément par les deux techniques de détection, la comparaison s'effectue sur un nombre total de 48 échantillons. Le volume d'eau analysé est de 25 μL pour la RT semi-nested PCR « labo » et de 100 μL pour le « kit-entérovirus ».

Le tableau 19 rapporte le bilan des concordances et discordances entre les résultats obtenus par les 2 techniques.

		« kit-entérovirus »		
		+	-	Total
RT semi-nested PCR « labo »	+	21	7	28
	-	6	14	20
	Total	27	21	48

Tableau 19 : Concordances et discordances entre RT semi-nested PCR « labo » et « kit-entérovirus » obtenues après analyse de 48 concentrats de 20 litres d'eaux usées traitées.

D'une manière globale, le pourcentage d'échantillons positifs par RT semi-nested PCR « labo » (58%) est équivalent à celui obtenu par le « kit-entérovirus » (56%).

L'analyse détaillée des résultats montre que 21 échantillons sont positifs et 14 négatifs dans les deux cas, ce qui correspond à 73% de concordance. Sur les 27% de discordance, 7 échantillons sont positifs par RT semi-nested PCR « labo » et négatifs par le « kit-entérovirus » et inversement, 6 échantillons sont négatifs par RT semi-nested PCR « labo » et positifs par le « kit-entérovirus ». Le test du χ^2 ne fait apparaître aucune différence significative au seuil 5% ($\chi^2 = 0,08$) entre les 2 techniques de détection.

Cependant, les 48 analyses sont réalisées sur 3 types d'eaux différentes, le tableau 20 représente les pourcentages d'échantillons positifs sur les 16 prélèvements d'eaux de Nancy secondaire, d'Epinal secondaire et d'Epinal tertiaire.

Concentrats	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	
	« kit-entérovirus »	RT semi-nested PCR « labo »
Nancy secondaire	75	100
Epinal secondaire	50	56
Epinal tertiaire	50	19

Tableau 20 : Pourcentage de concentrats positifs par RT semi-nested PCR « labo » et par « kit-entérovirus ». Les concentrats sont obtenus après concentration de 20 litres d'eaux usées traitées de la station d'épuration de Nancy, Epinal secondaire et Epinal tertiaire.

Cette analyse plus détaillée fait apparaître que dans les eaux usées traitées de Nancy, 100% des échantillons sont positifs par RT semi-nested PCR « labo » et 75% par le « kit-entérovirus ». Dans les eaux d'Epinal secondaire, ces pourcentages sont respectivement de 56% et 50% par RT semi-nested PCR « labo » et par le « kit-entérovirus », enfin, dans les eaux d'Epinal tertiaire, les pourcentages sont respectivement de 19% et de 50%. Le test du χ^2 ne fait apparaître aucune différence significative au seuil 5% entre les 2 techniques de détection dans les eaux d'Epinal secondaire ($\chi^2 = 1$) mais la différence est significative à ce même seuil en faveur de la RT semi-nested PCR « labo » dans les eaux de Nancy ($\chi^2 = 4$) alors que la différence est significative en faveur du « kit-entérovirus » dans les eaux d'Epinal tertiaire ($\chi^2 = 5$).

En fait, il semble qu'il y ait une interaction entre la sensibilité des 2 techniques de détection et la nature des eaux usées analysées.

1.3.3 Discussion - conclusion

L'analyse globale de 48 échantillons d'eaux usées traitées ne montre aucune différence de sensibilité entre RT semi-nested PCR « labo » et « kit-entérovirus ». Cette observation est confirmée après concentration de 20 litres de ces eaux sur laine de verre lorsque les résultats sont analysés de manière globale.

Cependant, les expérimentations réalisées après concentration des eaux usées traitées de Nancy montrent une différence significative dans les pourcentages d'échantillons positifs en faveur de la RT semi-nested PCR « labo ». Cette différence peut s'expliquer par la nature des méthodes d'extraction utilisées. L'extraction selon Chomczynski et Sacchi (1987), faisant partie du protocole de RT semi-nested PCR « labo », prévoit d'une part une étape de séparation des acides nucléiques et des protéines par le phénol/chloroforme et d'autre part, une double précipitation des acides nucléiques. L'extraction du « kit-entérovirus » n'utilise pas le phénol/chloroforme et ne prévoit qu'une seule précipitation des acides nucléiques.

Ainsi la méthodologie d'extraction utilisée est différente, celle utilisée au laboratoire permet théoriquement une meilleure purification des acides nucléiques. Il est alors possible d'émettre l'hypothèse que, dans une eau fortement chargée en inhibiteurs (Nancy secondaire), cette technique d'extraction permet d'obtenir un meilleur rendement des réactions enzymatiques d'amplification que celle utilisée dans le « kit-entérovirus ».

Inversement, dans une eau de meilleure qualité potentiellement moins chargée en inhibiteurs comme les eaux d'Epinal tertiaire qui ont subi un traitement d'épuration plus performant que celles de Nancy secondaire, la méthode d'extraction utilisée dans le « kit-entérovirus » permet d'obtenir des conditions d'amplification satisfaisantes. Dans ces conditions, le « kit-entérovirus » permet d'obtenir une meilleure sensibilité de détection de génome d'entérovirus que la RT semi-nested PCR « labo » avec respectivement 50% et 19% d'échantillons positifs. Cette différence de sensibilité peut être due soit au volume testé qui est 4 fois plus important pour le « kit-entérovirus » que pour la méthode de RT semi-nested PCR « labo », soit au rendement de la technique d'extraction. En effet la technique d'extraction selon Chomczynski et Sacchi (1987) comporte un nombre d'étapes supérieur à celle utilisée dans le « kit-entérovirus » et chaque étape supplémentaire peut être associée à une perte d'acides nucléiques.

En conclusion, l'analyse des résultats met en évidence que si les techniques de PCR sont parfaitement utilisables pour détecter le génome entéroviral dans les eaux usées traitées, il n'en demeure pas moins que des progrès doivent être réalisés pour adapter la technologie d'analyse à la qualité de l'eau à analyser. En effet, la sensibilité du « kit-entérovirus » augmente lorsque la qualité du traitement des eaux usées augmente et pour des eaux usées traitées satisfaisant les normes européennes, sa sensibilité est supérieure à celle de la RT

semi-nested PCR « labo ». Dans des eaux de moindre qualité, la technique d'extraction utilisée dans le « kit-entérovirus » est insuffisante pour éliminer les inhibiteurs et dans ces conditions, il serait intéressant d'associer la technique d'extraction selon Chomczynski et Sacchi (1987) au « kit-entérovirus ».

II

*Influence de la chaleur sur le devenir du
virus infectieux et du génome viral*

Avant de procéder à l'étape d'amplification du génome d'entérovirus par RT semi-nested PCR, il est nécessaire de libérer l'ARN de la capsid virale. Il existe de nombreux protocoles pour réaliser cette étape, certains auteurs suggèrent une incubation à forte température pour favoriser l'extraction : 56°C pendant 1 heure en présence de protéinase K (Sambrook *et al.*, 1989), 65°C, 30 minutes (Richardson *et al.*, 1988), 95°C, 5 minutes (Jansen *et al.*, 1990) ou 99°C, 5 minutes (Abbaszadegan *et al.*, 1993).

La chaleur étant un paramètre majeur de l'inactivation des virus, il nous est apparu intéressant d'étudier l'influence de la chaleur sur le devenir respectif du virus infectieux et du génome viral.

Le but de cette étude est, d'une part d'évaluer la résistance vis à vis de la chaleur du génome viral par rapport au virus infectieux, d'autre part de déterminer si la capsid virale a un effet protecteur sur le génome, enfin d'estimer l'impact d'un autoclavage à 110°C et 120°C sur le génome viral.

II.1 Influence de la chaleur sur le génome encapsidé et sur le virus infectieux

II.1.1 Protocole expérimental

A partir du stock viral, des dilutions logarithmiques sont effectuées dans de l'eau traitée au DEPC de façon à obtenir une préparation finale titrant $3 \cdot 10^2$ NPPUC.mL⁻¹.

Quatre millilitres de cette préparation sont prélevés pour effectuer un titrage sur culture cellulaire et déterminer le titre infectieux exact. Le reste de la préparation est réparti par fraction de 100 µL dans des tubes de 0,2 mL qui sont incubés à différentes températures dans un thermocycleur 9600 (Perkin Elmer). Les températures et les temps d'incubation testés sont 25°C, 55°C, 75°C, 95°C pendant 15 minutes et 95°C pendant 30, 60 et 120 minutes.

Après incubation de la préparation à la température choisie, le virus infectieux et le génome viral sont recherchés.

En ce qui concerne le virus infectieux, 500 µL (5 tubes de 100 µL) sont inoculés sur culture de cellules BGM dans des microplaques à raison de 50 µL par puits.

En ce qui concerne le génome viral, l'ARN est extrait par la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), des dilutions logarithmiques sont effectuées (10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}) dans de l'eau traitée au DEPC et le génome est détecté par RT semi-nested PCR dans un volume équivalent à 25µL.

II.1.2 Résultats

Le titre initial en virus infectieux est de $3 \cdot 10^2$ NPPUC.mL⁻¹. Les résultats de l'expérimentation réalisée en triplicat sont illustrés par la figure 4 et rapportés dans leur intégralité dans le tableau 21.

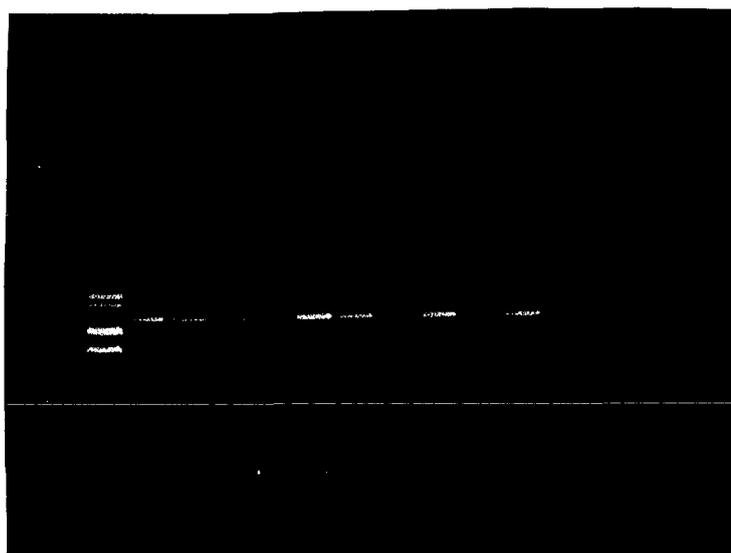


Figure 4 : Détection du génome du cox B3 par RT semi-nested PCR dans de l'eau désionisée après incubation à une température donnée. De gauche à droite : marqueur de poids moléculaires, incubation à 25°C 15 min. (dilution 1 ; 10^{-1} ; 10^{-2} ; 10^{-3}), incubation à 55°C 15 min. (dilution 1 ; 10^{-1} ; 10^{-2}), incubation 75°C 15 min. (dilution 1 ; 10^{-1}), incubation à 95°C 15 min. (dilution 1 ; 10^{-1}), incubation à 95°C 30 min. (dilution 1), incubation à 95°C 60 min. (dilution 1), incubation à 95°C 120 min. (dilution 1), témoin négatif.

Il apparaît qu'après traitement à 55°C pendant 15 minutes, plus aucun virus infectieux n'est détecté sur culture cellulaire alors que pour cette même durée de chauffage le génome viral est détecté jusqu'à 95°C. Cependant, la quantité de génome détectée décroît en fonction de la température, en effet il est détecté jusqu'à la dilution 10^{-2} après chauffage à 25°C, à 10^{-1} après traitement à 55°C et uniquement dans l'échantillon pur lorsque la température est de 75°C ou 95°C pendant 15 min.. De plus, lorsque la durée du chauffage à 95°C augmente jusqu'à 30 min., le génome devient indétectable.

Temps d'incubation (minutes)	Température (°C)	Virus infectieux (NPPUC.mL ⁻¹)	Dilution de l'échantillon avant détection du génome (RT semi-nested PCR)			
			1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
15	25	3 10 ²	+++	+++	+-	-
15	55	nd	+++	+-	-	-
15	75	nd	+-	-	-	-
15	95	nd	+-	-	-	-
30	95	nd	-	-	-	-
60	95	nd	-	-	-	-
120	95	nd	-	-	-	-

nd : non détecté dans 500µL

Tableau 21 : Persistance du coxsackievirus B3 infectieux détecté par culture cellulaire et de son génome détecté par RT semi-nested PCR en fonction de la température. Un signe + représente la présence de génome viral et un signe - l'absence de génome. L'expérimentation ayant été réalisée en triplicat, les trois signes + ou - représentent les résultats de chacune d'entre elles.

Le virus infectieux est donc très sensible à la chaleur puisqu'une inactivation d'environ 3 log est observée dès chauffage à 55°C pendant 15 min. Pour obtenir le même résultat avec le génome viral, il est nécessaire de chauffer à 95°C pendant 30 min. Il existe donc une différence de comportement très nette vis à vis de la chaleur entre le génome viral et le virus infectieux.

II.2 Influence de la chaleur sur le génome "nu"

En ce qui concerne la dégradation du génome et compte tenu du fait que les suspensions virales proviennent d'un surnageant de cultures cellulaires susceptible de renfermer des nucléases très résistantes à la chaleur (Sambrook 1989), il est possible de s'interroger sur le rôle respectif de la chaleur et des nucléases sur la destruction du génome. C'est pourquoi nous avons voulu tester l'influence de la chaleur sur le génome extrait par la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987). En effet, cette extraction permet non seulement de libérer l'acide nucléique de la capsid virale mais aussi d'inhiber les nucléases. L'éventuelle dégradation du génome sera donc dans ce cas uniquement due à l'action de la chaleur.

II.2.1 Protocole expérimental

Dans cette étude la même suspension virale (3×10^2 NPPUC.mL⁻¹) que dans le paragraphe II.1 est utilisée. L'ARN viral de cette suspension est extrait selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987), puis des dilutions logarithmiques sont effectuées (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) dans de l'eau traitée au DEPC. L'échantillon d'ARN viral dilué est réparti par fraction de 100 μ L dans des tubes de 0,2 mL. Les tubes sont ensuite incubés à 25°C, 55°C, 75°C, 95°C pendant 15 min. et 95°C pendant 30, 60 et 120 min. Dans chaque échantillon l'ARN viral est détecté par RT semi-nested PCR.

II.2.2 Résultats

Les résultats de l'expérimentation réalisée en duplicat sont rassemblés dans le tableau 22. Il apparaît que le génome viral est détectable jusqu'à la dilution 10^{-2} après chauffage de 15 min. à 25°C, jusqu'à 10^{-1} après incubation 15 min. à 55°C, uniquement dans l'échantillon pur après incubation 15 min. à 75°C et 95°C et qu'il devient indétectable pour des incubations supérieures à 30 min. à 95°C.

Temps d'incubation (minutes)	Température (°C)	Dilution de l'échantillon avant détection du génome (RT semi-nested PCR)			
		1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
15	25	++	++	+-	--
15	55	++	++	--	
15	75	++	--		
15	95	++	--		
30	95	--			
60	95	--			
120	95	--			

Tableau 22 : Persistance du génome viral nu (après extraction) en fonction de la température. Un signe + représente la présence de génome viral et un signe - l'absence de génome. L'expérimentation ayant été réalisée en duplicat, les deux signes + ou - représentent les résultats de chacune d'entre elles.

Ces résultats comparés à ceux obtenus avec le génome encapsidé (tableau 21) suggèrent que la sensibilité du génome viral vis à vis de la chaleur est la même que celui-ci soit encapsidé ou non.

II.3 Influence d'un autoclavage à 110°C et 120°C sur le génome viral

Certains auteurs se sont interrogés, à propos de la fiabilité des résultats de RT-PCR réalisés dans du matériel à usage multiple en s'interrogeant sur l'éventuelle persistance de génome sur les parois des récipients même après lavage et autoclavage.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant de déterminer l'influence de l'autoclavage à 110°C et 120°C sur le génome entéroviral.

II.3.1 Protocole expérimental

Un millilitre d'une suspension virale titrant environ 10^7 NPPUC mL⁻¹ est autoclavé à 110°C et 120°C pendant 15 min. Après ce traitement, le génome viral est extrait selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (1987) et l'ARN est détecté par RT semi-nested PCR dans des dilutions logarithmiques allant jusqu'à 10^{-3} .

II.3.2 Résultats

Les résultats de l'expérimentation réalisée en duplicat sont reportés dans le tableau 23. Il apparaît que l'ARN viral est indétectable même dans l'échantillon pur après autoclavage alors que dans le témoin non autoclavé, le génome est encore détectable à la dilution 10^{-3} . Ceci démontre qu'un autoclavage à 110°C permet de dégrader l'ARN viral de façon efficace malgré la forte concentration initiale en virus.

Traitement	Détection par RT semi-nested PCR du génome de coxsackievirus B3 à partir de dilutions logarithmiques			
	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
Aucun (témoin)	++	++	++	++
Autoclavage 110°C 15 min.	--	--		
Autoclavage 120°C 15 min.	--	--		

Tableau 23 : Influence d'un autoclavage à 110°C et 120°C pendant 15 min. sur la persistance du génome du coxsackievirus B3. La suspension virale pure titre 10^7 NPPUC mL⁻¹.

Ce résultat est intéressant, car il permet de montrer qu'il n'y a pas de risque d'obtention de faux positifs à la suite de l'utilisation de matériel ayant déjà contenu du virus mais ayant subi une stérilisation par autoclavage à une température supérieure ou égale à 110°C.

II.4 Discussion - Conclusion

Le coxsackievirus B3 infectieux apparaît très sensible à l'action de la chaleur puisqu'une inactivation supérieure à 2 log est observée dès l'incubation 15 minutes à 55°C. Ce résultat est en parfait accord avec les nombreuses études démontrant le rôle prédominant de la chaleur sur l'inactivation virale (Bitton, 1980), que se soit dans de l'eau désionisée (Quignon et Schwartzbrod, 1995), des eaux de surfaces (Sattar, 1981 ; Hurst, 1989), des eaux souterraines (Yates *et al.*, 1985 et 1990) ou au niveau des sols (Hurst *et al.*, 1980 ; Lefler et Kott, 1984). Ainsi, Enriquez *et al.* (1993) observent dans une eau de surface stérile incubée 2 minutes à 56°C, une réduction du titre en poliovirus 1 de plus de 5 log.

Le génome viral, dans les mêmes conditions expérimentales que le virus infectieux, est beaucoup plus résistant à la chaleur puisqu'il est encore détectable après incubation de 15 min. à 95°C et totalement détruit seulement après 30 min. d'incubation à 95°C. Cependant, une baisse de la quantité de génome viral est observée au fur et à mesure que la température d'incubation augmente. Cette dégradation ne peut être imputée aux nucléases car la même décroissance est observée pour l'ARN nu, les nucléases ayant été dans ce cas inhibées par l'action du thiocyanate de guanidium.

Les résultats montrent une légère baisse de la quantité de génome détectée après incubation 15 min. à 55°C par rapport à celle obtenue après incubation à 25°C, mais le protocole expérimental ne permet pas de conclure à une baisse significative. Cependant, nos résultats montrent clairement qu'il y a une différence d'au moins 1 log entre la quantité de génome présente après incubation de 15 min. à 25°C et celle persistante après 15 min. à 75°C.

Ces conclusions semblent en opposition avec les résultats obtenus par Richardson *et al.* (1988) qui préconisent un chauffage de 30 min. à 65°C, en présence d'inhibiteurs de RNases, pour libérer l'ARN viral de la capsid avant sa détection par hybridation moléculaire. Ces auteurs ne mettent en évidence aucune baisse de sensibilité due au chauffage.

Cependant dans nos conditions expérimentales, une PCR positive traduit la présence de la quasi totalité du génome viral. Or, il est tout à fait envisageable que les modifications conformationnelles ou les clivages du génome sous l'effet de la chaleur permettent encore sa détection par hybridation moléculaire mais plus par voie enzymatique (RT semi-nested PCR).

Nos résultats suggèrent que la perte rapide du pouvoir infectieux du virus observée à 55°C est due en grande partie au clivage ou au changement de conformation de la capsid virale qui aurait pour effet d'empêcher la reconnaissance virus-récepteur cellulaire et donc l'infection de la cellule.

Ces résultats sont à comparer avec ceux obtenus par Breindl (1971) qui estime que la libération de la protéine capsidale VP₄ des Picornavirus par traitement à la chaleur expose l'ARN viral encore encapsidé à l'action des RNases. Dans nos conditions expérimentales, les RNases ne semblent pas avoir d'action visible sur la dégradation soit parce que leur concentration est trop faible, soit parce que l'ARN viral est inaccessible à l'intérieur de la capsid. Grimmel *et al.* (1983) suggèrent que l'inactivation thermique après quelques minutes à 47°C est due à un changement de conformation de la capsid virale qui devient perméable aux ions. Malgré cette perméabilité, seulement 50 % de l'ARN viral est accessible aux RNases.

De même, Enriquez *et al.* (1993) dans une étude de survie du poliovirus 1 et de son génome dans des eaux de surface, suggèrent qu'à 56°C le virus est inactivé par clivage partiel de la capsid ne rendant pas pour autant l'ARN accessible aux RNases.

En conclusion, cette étude montre d'une part que les génomes viraux sont plus résistants à la chaleur que le virus infectieux, d'autre part que le chauffage à haute température préconisé dans certains protocoles d'extraction d'ARN peut provoquer une dégradation partielle de l'ARN et enfin qu'un autoclavage à des températures supérieures à 110°C ne permet plus la détection de génome viral par RT semi-nested PCR dans nos conditions expérimentales.

III

*Devenir du coxsackievirus B3 en milieux
tamponnés*

La méthode de référence pour la détection des entérovirus est, depuis de nombreuses années, l'isolement sur culture cellulaire et éventuellement pour certains virus l'inoculation à l'animal, par exemple aux souriceaux nouveau-nés pour les coxsackievirus. Depuis les années 90, les techniques de biologie moléculaire ont été proposées pour la détection des génomes viraux, d'abord dans les produits pathologiques puis dans les échantillons de l'environnement. A l'heure actuelle, certains auteurs s'interrogent sur la possibilité d'utiliser le génome viral comme indicateur de contamination virale du milieu hydrique.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'étudier comparativement la durée de persistance dans le milieu hydrique du virus infectieux, du virus pathogène et du génome viral. Ceci est réalisé avec du coxsackievirus B3 dont le caractère infectieux est déterminé sur culture cellulaire, le caractère pathogène par inoculation aux souriceaux nouveau-nés et le génome viral par RT semi-nested PCR.

Nous avons cherché à déterminer l'influence de certains paramètres sur la persistance du matériel viral dans le milieu hydrique. Pour ce faire, nous sommes partis d'un milieu de base stérile sans matières en suspension (MES) et parfaitement équilibré, représenté par du tampon PBS. A ce milieu, nous avons successivement ajouté un filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens* isolé à partir d'un réseau de distribution, de la Na-montmorillonite et enfin du filtrat et de la Na-montmorillonite simultanément.

L'action du filtrat bactérien est étudiée pour tenter de déterminer si les produits du métabolisme bactérien peuvent influencer sur la persistance du matériel viral. En effet, certains auteurs (Enriquez *et al.*, 1993) suggèrent que la présence de tels produits pourrait avoir une action notamment sur la dégradation du génome viral.

La montmorillonite est ajoutée comme modèle de MES. En effet, il existe dans les eaux environnementales, des concentrations importantes de MES sur lesquelles les virus peuvent s'adsorber massivement. La présence de Na-montmorillonite devrait permettre de juger de l'influence des MES sur le devenir du virus et de son génome.

Pour pouvoir réaliser cette étude de survie, nous avons dans un premier temps été amenés à étudier la sensibilité des différentes méthodologies de détection en fonction de la composition du milieu. Par ailleurs, compte tenu du fait que la RT semi-nested PCR est utilisée de manière qualitative et que les méthodologies de calcul du T_{90} ne sont de ce fait pas utilisables, nous avons envisagé une méthode d'estimation du T_{90} du génome viral à partir de résultats qualitatifs.

III.1 Sensibilité des méthodes de détection

Pour l'étude du devenir du matériel viral dans le milieu hydrique, nous avons choisi de travailler avec 3 techniques, l'inoculation sur souriceaux nouveau-nés, l'isolement sur culture cellulaire et la détection de génome viral par RT semi-nested PCR.

Dans un premier temps, il est fondamental de déterminer la sensibilité respective des protocoles de détection en fonction des milieux testés. Cette détermination est en effet importante notamment pour permettre de calculer le T seuil théorique, c'est à dire le temps au bout duquel il n'est théoriquement plus possible de retrouver dans le milieu étudié le matériel viral recherché.

En ce qui concerne la détection du génome, la sensibilité en eau désionisée a fait l'objet d'une étude dans la partie I (résultats). Pour la culture cellulaire, l'expérience acquise au laboratoire montre qu'en eau désionisée la sensibilité est de 1 NPPUC dans le volume inoculé. Dans ces conditions, la sensibilité de ces deux techniques n'est étudiée que dans les 4 milieux testés.

En ce qui concerne l'inoculation aux souriceaux nouveau-nés, nous avons procédé en deux temps. Dans un premier temps, la dose infectante est déterminée, puis seulement dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux quatre milieux étudiés.

III.1.1 Détection par inoculation aux souriceaux nouveau-nés

Les cox B3 sont détectés classiquement soit par isolement sur cultures cellulaires sur lesquelles ils provoquent un effet cytopathogène, soit par inoculation aux souriceaux nouveau-nés chez lesquels ils provoquent une atteinte du système nerveux central se traduisant par une paralysie de type spastique.

III.1.1.1 Doses infectantes

- Protocole

De façon à déterminer la dose infectante, des échantillons d'eau désionisée contenant des concentrations croissantes en cox B₃ sont inoculés par voie intracérébrale à des portées de souriceaux. Vingt cinq microlitres d'échantillon sont injectés sous la peau du souriceau dans la région cervicale. L'aiguille est ensuite enfoncée dans le cerveau sans appliquer aucune pression sur la seringue, pour éviter les traumatismes par pression. Les morts sont recensés sur une période de 14 jours selon la technique décrite dans matériels et méthodes (V.1.2). Le

délai entre l'inoculation et la mort de l'animal (Temps Moyen de Mortalité : TMM) est calculé en appliquant la formule :

$$\frac{\sum (\text{Jours où les morts sont survenus} \times \text{nombre de morts au cours de ces journées})}{\text{Nombre total de morts}}$$

Les résultats sont exprimés sous forme graphique en appliquant la méthode de Reed et Muench. Cette méthode est basée sur le fait que tout succès (mort de souriceaux) à une dose donnée aurait été a fortiori un succès à une dose supérieure. Il est donc naturel de rajouter ces succès à ceux obtenus à des doses supérieures et de faire ainsi (des faibles doses vers les fortes doses) des totaux cumulatifs des succès. Le même raisonnement est suivi pour les échecs (survivants) en les rajoutant à ceux obtenus à des doses inférieures et en faisant ainsi (des fortes doses vers les faibles doses) les totaux cumulatifs des échecs.

On obtient alors 2 colonnes de totaux cumulatifs (d'échecs et de succès) à partir desquelles un pourcentage de mortalité peut être calculé. En traçant l'évolution de ce pourcentage de mortalité en fonction du logarithme de la concentration virale, on obtient la sigmoïde représentée figure 5.

Plusieurs modèles mathématiques utilisés notamment pour la description de croissances bactériennes permettent la représentation d'une sigmoïde. Parmi ces modèles, on distingue l'équation de Gompertz.

$$Y = A/[1 + \exp(B X + C)]$$

A partir des résultats expérimentaux, 3 paramètres sont calculés :

- le temps moyen de mortalité (TMM) correspondant au délai entre l'inoculation et la mort de l'animal;
- la DL50 calculée à partir de l'équation de la sigmoïde et correspondant à la dose létale pour 50% des souriceaux;
- la dose seuil correspondant à la dose permettant d'observer au moins 1 réponse positive (mort d'un souriceau).

Ces paramètres sont calculés à partir de 20 résultats expérimentaux correspondant à l'inoculation de concentrations croissantes en cox B3 (0 à 10^5 NPPUC.mL⁻¹) dans de l'eau désionisée, chaque concentration étant inoculée à deux portées de souriceaux.

- Résultats

Les résultats rapportés sur la figure 5 représentent la courbe sigmoïde caractéristique ainsi que les pourcentages de mortalité correspondant aux différents totaux cumulatifs.

L'équation de la sigmoïde s'écrit alors :

$$\text{Mortalité} = 100 / [1 + \exp(18,71 - 5,52 \times \log(\text{concentration virale}))]$$

Dans nos conditions expérimentales, le TMM est de 6,5 jours et il apparaît que pour une concentration de 2500 NPPUC.mL⁻¹, on observe 50% de mortalité. La DL50 sous 25μL est donc de 62,5 NPPUC.

Par ailleurs, la dose seuil est de 7,5 NPPUC puisqu'elle constitue la plus petite dose qui provoque encore la mort d'au moins un souriceau.

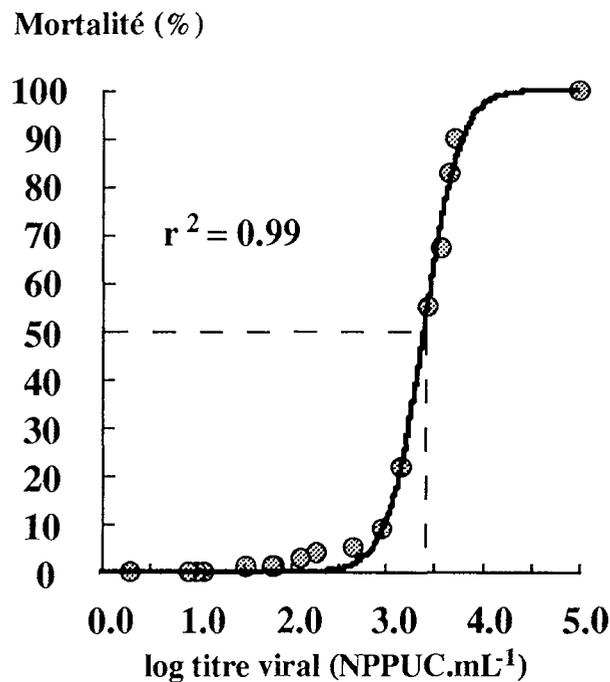


Figure 5 : Evolution de la mortalité des souriceaux nouveau-nés en fonction de la concentration en cox B3.

III.1.1.2 Sensibilité du protocole dans les différents milieux

La sensibilité du protocole de détection par inoculation aux souriceaux nouveau-nés, que nous avons utilisée au cours de ce travail, est testée à partir de 4 milieux (PBS, PBS+200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite, PBS+10% de filtrat de culture de *Pseudomonas*

fluorescens et PBS + 200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite + 10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens*).

Aussitôt après la contamination des milieux par le virus, il est préparé à partir de ceux-ci des dilutions logarithmiques dans le même milieu. Chacune d'entre elles est inoculée à 2 portées de souriceaux, à raison de 25 µL par souriceau. Ceux-ci sont observés pendant une période de 14 jours.

Les résultats (tableau 24) montrent qu'en partant d'une concentration initiale dans les milieux d'environ 10³ NPPUC.mL⁻¹ (de 2,7 à 5 10³ NPPUC.mL⁻¹), des réactions positives (mortalité) sont toujours observées jusqu'à la dilution 10⁻¹, mais que pour les dilutions suivantes, tous les résultats sont négatifs.

La sensibilité du protocole ne semble pas varier en fonction de la nature du milieu testé. Elle se situe entre 270-500 et 27-50 NPPUC.mL⁻¹, ce qui correspond aux résultats obtenus précédemment en eau distillée, pour laquelle la dose seuil était de 300 NPPUC mL⁻¹.

		Dilution				
	Titre viral (NPPUC.mL ⁻¹)	0	-1	-2	-3	-4
PBS	2700	+	+	-	-	-
PBS+filtrat	3700	+	+	-	-	-
PBS+argile	4400	+	+	-	-	-
PBS+argile +filtrat	5000	+	+	-	-	-

Tableau 24 : Sensibilité de détection du cox B3 par inoculation aux souriceaux nouveaux dans du PBS, du PBS + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* (PBS + filtrat), du PBS+200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite (PBS + argile) et dans du PBS + 200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* (PBS + argile + filtrat). Le volume inoculé est de 25µL par souriceau et un signe + représente la mort d'au moins un souriceau sur les 2 portées inoculées.

III.1.2 Isolement sur cultures cellulaires

Comme dans le cas précédent, des dilutions logarithmiques effectuées dans chaque milieu sont inoculées sur une culture de cellules BGM en plaques de 96 cupules, à raison de 6 mL par dilution.

Les résultats rassemblés dans le tableau 25 montrent que concernant le PBS et le PBS + 10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens*, des résultats positifs sont observés jusqu'à la dilution 10^{-4} . La sensibilité du protocole se situe donc pour ces 2 milieux entre 0,27-0,37 et 0,027-0,037 NPPUC.mL⁻¹.

Par contre, pour les 2 milieux contenant de l'argile, il est impossible de détecter le virus directement, car des phénomènes toxiques dus à la concentration d'argile sont constatés sur les cultures cellulaires. Dans ces conditions, il a été nécessaire de procéder pour chaque échantillon à une dilution supplémentaire à 10^{-1} dans du PBS sans argile (alors que les dilutions de départ étaient effectuées dans le milieu original contenant de l'argile). Il est alors possible de détecter les virus jusqu'à la dilution 10^{-3} dans les deux milieux contenant de l'argile.

Compte tenu du fait que ce protocole modifié sera aussi utilisé pour la détermination du T seuil dans l'étude de la survie, nous pouvons considérer que la sensibilité de détection dans ces 2 milieux contenant de l'argile se situe entre 4,4-5 et 0,44-0,50 NPPUC.mL⁻¹, c'est à dire une sensibilité 10 fois plus faible que pour le PBS sans argile

	Titre viral (NPPUC.mL ⁻¹)	Dilution					
		0	-1	-2	-3	-4	-5
PBS	2700	+	+	+	+	+	-
PBS+filtrat	3700	+	+	+	+	+	-
PBS+argile	4400	T	T	T	T	T	T
PBS+argile +filtrat	5000	T	T	T	T	T	T

Tableau 25 : Sensibilité de détection du cox B3 par isolement sur culture cellulaire dans du PBS, du PBS + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* (PBS + filtrat), du PBS + 200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite (PBS + argile) et dans du PBS + 200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* (PBS + argile + filtrat). Le volume inoculé est de 6mL, un signe + représente la présence d'au moins un effet cytopathogène et T représente une toxicité vis à vis du tapis cellulaire.

III.1.3 Détection du génome par RT semi-nested PCR

La détection est réalisée dans des prises d'essai de 25 μL à partir de dilutions logarithmiques par RT semi-nested PCR, selon le protocole décrit dans matériels et méthodes V.1.3.

Les résultats (tableau 26) sont identiques pour les 4 milieux testés avec des résultats positifs observés systématiquement jusqu'à la dilution 10^{-3} , le seuil de détection se situe donc entre 2,7-5 et 0,27-0,5 NPPUC mL^{-1} .

Il apparaît donc clairement que la présence d'argile et/ou de filtrat bactérien n'influence en rien la détection du génome viral.

	Titre viral (NPPUC. mL^{-1})	Dilution					
		0	-1	-2	-3	-4	-5
PBS	2700	+	+	+	+	-	-
PBS+filtrat	3700	+	+	+	+	-	-
PBS+argile	4400	+	+	+	+	-	-
PBS+argile +filtrat	5000	+	+	+	+	-	-

Tableau 26 : Sensibilité de détection du génome du cox B3 par RT semi-nested PCR dans du PBS, du PBS + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* (PBS + filtrat), du PBS + 200 mg.L^{-1} de Na-montmorillonite (PBS + argile) et dans du PBS + 200 mg.L^{-1} de Na-montmorillonite + 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens*. Le volume testé est de 25 μL et un signe + représente la présence d'au moins un génome viral.

Les résultats obtenus lors de cette étude de sensibilité seront pris en compte lors de l'étude de la survie pour la détermination du T seuil.

III.2 Estimation du T₉₀ pour le génome viral

La détection du génome viral donne des réponses de type tout ou rien et de ce fait il n'est pas possible de calculer un T₉₀ selon les techniques classiques. Dans ces conditions, pour pouvoir effectuer une étude comparative de la survie du virus infectieux et du génome viral, il est nécessaire de déterminer un mode de calcul pour le T₉₀ génome. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Professeur Maul (Université de Metz) et a donné lieu à la mise au point d'un programme informatique donné en annexe 3.

Notre hypothèse de départ repose sur une décroissance du génome viral selon un modèle exponentiel monophasique : $\lambda_t = \mu_0 c^t$. Cette hypothèse est étayée par certains résultats expérimentaux, notamment ceux d'Enriquez *et al.*, (1993) et ceux de Dubois (1995).

Dans ces conditions, le coefficient de dégradation du génome « c » peut être estimé par le principe du maximum de vraisemblance. L'estimation du maximum de vraisemblance \hat{c} du coefficient de dégradation est la solution de l'équation 1. \hat{c} est la valeur de « c » qui correspond au maximum de la fonction de vraisemblance.

$$\sum_{t_i \in P} \frac{(t_i c^{t_i-1})}{(e^{\mu_0 c^{t_i}} - 1)} - \sum_{t_i \in N} (t_i c^{t_i-1}) = 0 \quad (\text{éq1})$$

avec t : durée d'incubation (jours)

c : coefficient de dégradation

μ_0 : concentration initiale en génome

P : ensemble des temps (exprimés en jours) correspondant à des résultats positifs

N : ensemble des temps (exprimés en jours) correspondant à des résultats négatifs

Les coefficients de dégradation du génome sont comparés entre eux par le test du rapport de vraisemblance. Le calcul des coefficients de dégradation et leur comparaison sont réalisés à l'aide d'un programme informatique donné en annexe 3.

Pour résoudre l'équation 1, il est nécessaire de disposer :

- de l'ensemble des temps correspondant à des résultats positifs (P). Ex: 0, 30,49,70,96,146,153, 169 (tableau 27),

- de l'ensemble des temps correspondant à des résultats négatifs (N). Ex: 180, 190, 204, 232 (tableau 27),
- de la concentration initiale en génome (μ_0).

Durée d'incubation (jours)	0	30	49	70	96	146	153	169	180	190	204	232
Détection du génome viral	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

Tableau 27 : Détection du génome viral par RT semi-nested PCR en fonction du temps à 25°C dans du PBS. Un signe + représente la présence de génome et un signe - l'absence de génome.

La concentration initiale en génome peut être estimée par la méthode du NPP de la même manière que pour le virus infectieux. Les résultats ne sont alors plus exprimés en Nombre le Plus Probable d'Unité Cytopathogène (NPPUC) mais en Nombre le Plus Probable d'Unité Génomique (NPPUG).

Si on prend comme exemple la persistance du génome viral à 25°C dans un milieu PBS au premier jour de l'expérimentation, le titre en virus infectieux dans le PBS est de 2700 NPPUC.mL⁻¹ (IC_{95%} : 1,8 10³ - 4,0 10³). La concentration initiale en génome est déterminée à partir de cinq séries de 3 dilutions logarithmiques réalisées dans du PBS : 10⁻² ; 10⁻³ ; 10⁻⁴. Le génome viral est recherché par RT semi-nested PCR dans chacune de ces dilutions. Le nombre des réponses positives observées par niveau de dilution est respectivement de 5, 2, 0. Dans ce cas où il y a trois dilutions successives avec un nombre invariant d'inoculum par niveau de dilution fixé à 5, le NPP correspondant peut être lu dans une table (De Man, 1977) et est accompagné d'un intervalle de confiance à 95%.

D'après cette table, le NPP correspondant aux nombres caractéristiques 5, 2, 0 est 5 et les limites de confiance à 95% (intervalle de Bayes) sont 2 et 17. Dans nos conditions expérimentales, l'inoculum étant de 0,025 mL, la densité en génome de l'échantillon non dilué s'élève donc à :

$(5 \times 10^2)/0,025 = 2.10^4$ NPPUG.mL⁻¹ (IC_{95%} : 8.10³ - 6,8.10⁴), avec NPPUG = nombre le plus probable d'unités génomiques.

Le rapport « r » défini comme étant le rapport unités génomiques sur unités cytopathogènes est donc de 7. Cela signifie qu'au départ de l'expérimentation dans le PBS et en tenant compte des intervalles de confiance, il y a entre 2 et 38 fois plus d'unités génomiques que d'unités cytopathogènes.

Compte tenu du fait que, dans la suite de l'expérimentation, il sera matériellement impossible de déterminer le NPPUG pour chaque type de milieu apportant ainsi un élément d'incertitude supplémentaire, il a été décidé arbitrairement d'utiliser un intervalle de confiance plus important et de considérer que le rapport « r » pourrait varier dans un intervalle entre 1 et 100 au lieu de 2 et 38 déterminé expérimentalement. Il est impératif de préciser que le même stock viral est utilisé dans toutes les expérimentations réduisant ainsi la variabilité du rapport « r » et que nous vérifierons que la sensibilité de détection du génome est identique quel que soit le milieu.

Dans ces conditions, les T_{90} génomiques sont calculés d'une part pour $r = 1$ (1 NPPUG = 1 NPPUC) et d'autre part pour $r = 100$ (100 NPPUG = 1 NPPUC). Le T_{90} réel est donc compris entre les 2 T_{90} ainsi calculés.

Le protocole général d'estimation du T_{90} ou du coefficient de dégradation pour le génome viral quel que soit le milieu est donc le suivant :

- Evaluer le titre en virus infectieux (NPPUC.mL⁻¹),
- Déterminer la sensibilité de détection du génome viral par RT semi-nested PCR par des dilutions logarithmiques,
- Détecter le génome viral en fonction du temps jusqu'après le seuil de détection,
- Estimer le coefficient de dégradation du génome pour $r = 1$ (1 NPPUG = 1 NPPUC),
- Estimer le coefficient de dégradation du génome pour $r = 100$ (100 NPPUG = 1 NPPUC),
- Calculer les T_{90} à partir de chaque coefficient de dégradation. Le T_{90} du génome est compris entre les deux bornes de l'intervalle.

III.3 Persistance du coxsackievirus B3 et de son génome dans le PBS

Dans cette partie le devenir du pouvoir pathogène, du pouvoir infectieux et du génome du cox B3 dans du PBS stérile à 25°C est étudié. Le pouvoir pathogène est déterminé par inoculation sur souriceaux nouveau-nés, le pouvoir infectieux par isolement sur cellules sensibles et le génome viral par RT semi-nested PCR.

Cette étude est réalisée à partir des suspensions utilisées lors de la détermination de la sensibilité.

Comme il est décrit dans matériels et méthodes (VI.1), 2 litres de PBS sont contaminés avec du cox B3 de façon à obtenir une concentration initiale de 2700 NPPUC.mL⁻¹. Après répartition en flacons, ceux-ci sont stockés à 25°C et l'analyse virologique est réalisée à des intervalles de temps réguliers sur une période de 435 jours.

Les résultats concernant la persistance d'une dose pathogène, du virus infectieux et du génome viral en fonction du temps sont rapportés respectivement dans le tableau 28 (A, B et C).

A

Durée d'incubation (jours)	0	10	15	23	26	30	36	54
Détection sur souriceaux	+	+	+	-	+	-	-	-
23 < T seuil < 26								

B

Durée d'incubation (jours)	0	30	68	70	74	78	81	85	89	92	96	105
Détection sur culture cellulaire	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
70 < T seuil < 85												

C

Durée d'incubation (jours)	0	30	49	70	96	146	153	169	180	190	204	232
Détection du génome viral	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
169 < T seuil < 180												

Tableau 28 : Détection de matériel viral en fonction du temps à 25°C dans du PBS. Le matériel viral est détecté par inoculation sur souriceaux (A), par inoculation sur culture cellulaire (B) et par RT semi-nested PCR (C). Le T seuil est évalué par un intervalle de temps correspondant soit au premier échantillon négatif et au dernier échantillon positif (A et B), soit au dernier échantillon positif et au premier échantillon négatif (C).

En ce qui concerne le virus infectieux, une décroissance exponentielle est observée (figure 6) avec un coefficient de corrélation linéaire de 0,99 (n = 33) et un T₉₀ de 14,5 jours (IC_{95%} = 13,8 ; 15,3). L'équation de régression de la concentration virale en fonction du temps s'écrit :

$$\log C_t = -0,069 T + 3,45 \quad (\text{éq2})$$

avec C_t : concentration virale au temps t (NPPUC.mL⁻¹) ; T : temps (jours) et log : logarithme décimal

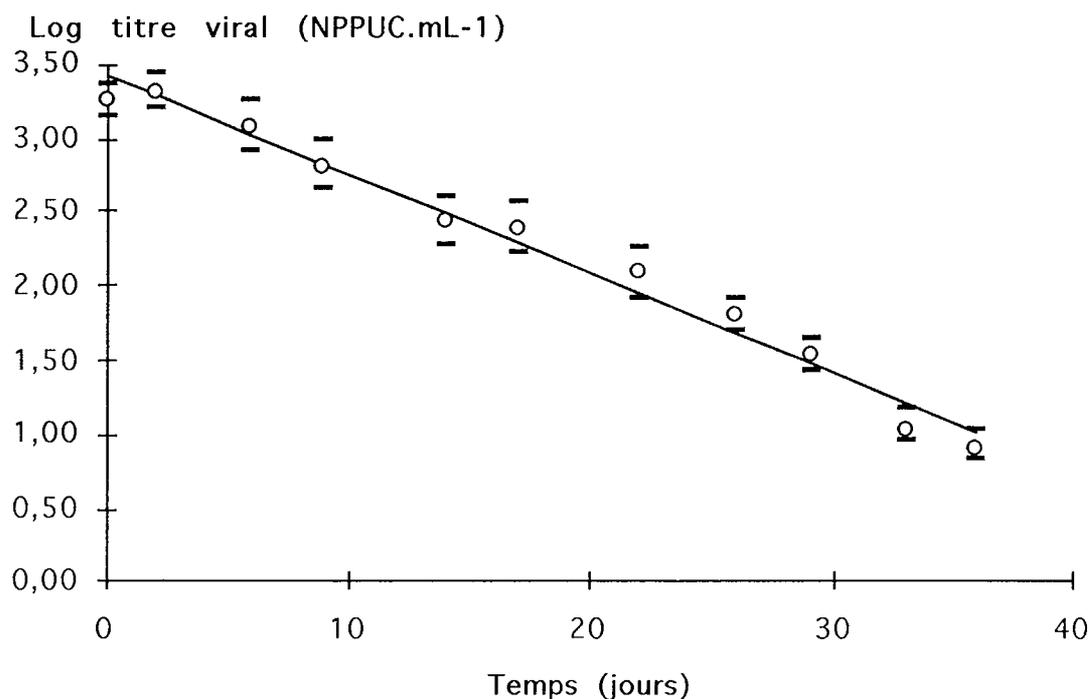


Figure 6 : Survie du cox B3 infectieux à 25°C dans du PBS

Par ailleurs, le T seuil expérimental qui est le temps au bout duquel aucun virus n'est mis en évidence dans la prise d'essai, se situe entre 70 et 85 jours.

Le T seuil théorique déterminé à partir de l'équation 2, en considérant comme valeur de C la limite de sensibilité du protocole (III.1.2), se situe entre 60 et 75 jours.

Les valeurs des T seuil expérimentaux et théoriques sont comparables, ce qui confirme que dans nos conditions expérimentales, la décroissance du virus infectieux est bien de type exponentiel jusqu'à la limite de détection.

En ce qui concerne le virus pathogène, le T seuil expérimental se situe entre 23 et 26 jours.

Enfin, pour le génome viral, le T seuil se situe entre 169 et 180 jours.

A partir de ces données, il nous a paru intéressant de déterminer si la décroissance du virus pathogène et du génome viral suivait une décroissance exponentielle identique à celle du virus infectieux selon l'équation 2. Nous avons donc calculé pour chacun de ces deux paramètres un T seuil théorique selon l'équation 2 en tenant compte de la sensibilité de chacun des protocoles (III.1.1 et III.1.3).

Il apparaît que pour le pouvoir pathogène, le T seuil théorique (15-30 jours) est comparable au T seuil expérimental (23-26 jours). Il semble donc que la décroissance du pouvoir pathogène suive le même modèle de décroissance que le pouvoir infectieux.

Par contre, pour ce qui est du génome, une discordance de plus d'un facteur 2 est constatée entre le T seuil théorique (45-60 jours) et le T seuil expérimental (169-180 jours). Ceci montre que l'équation qui caractérise la décroissance du virus infectieux n'est pas applicable à celle du génome viral.

En ce qui concerne les durées de survie estimées à partir des T_{90} , seuls le virus infectieux et le génome sont pris en compte du fait que le pouvoir pathogène suit une décroissance équivalente à celle du pouvoir infectieux.

Le T_{90} est de 14,5 jours pour le virus infectieux et celui du génome viral est compris entre 30 ($r=1$) et 47 jours ($r=100$). La persistance du génome en tampon PBS est donc de 2 à 3 fois supérieure à celle du virus infectieux.

III.3.1 Influence du filtrat bactérien

Au cours de cette étude, une solution de PBS est additionnée de 10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens* avant d'être contaminée par du cox B3 en quantité telle que la concentration finale du milieu est de 3700 NPPUC.mL⁻¹.

Les résultats concernant la persistance d'une dose pathogène, du virus infectieux et du génome viral en fonction du temps sont rapportés dans le tableau 29 (A,B et C).

A

Durée d'incubation (jours)	0	10	15	21	25	30	36	54
Détection sur souriceaux	+	-	+	+	-	-	-	-
10<T seuil<21								

B

Durée d'incubation (jours)	0	30	68	71	74	78	81	85	89	92	96	105
Détection sur culture cellulaire	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
74<T seuil<81												

C

Durée d'incubation (jours)	0	30	49	70	96	146	153	169	180	190	204	232
Détection du génome viral	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
169 < T seuil < 180												

Tableau 29 : Détection de matériel viral en fonction du temps à 25°C dans du PBS additionné de 10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens*. Le matériel viral est détecté par inoculation sur souriceaux (A), par isolement sur culture cellulaire (B) et par RT semi-nested PCR (C). Le T seuil est évalué par un intervalle de temps correspondant au premier échantillon négatif et au dernier échantillon positif.

En ce qui concerne le virus infectieux, une décroissance exponentielle est observée (figure 7) avec un coefficient de corrélation de 0,98 (n = 33) et un T_{90} de 15,8 jours ($IC_{95\%} = 14,6 ; 17,1$). L'équation de la régression s'écrit :

$$\log C = - 0,063 T + 3,63 \quad (\text{éq3})$$

avec C : concentration virale (NPPUC.mL⁻¹) et T : temps (jours)

La comparaison statistique (test de Student : comparaison de pentes) ne fait apparaître aucune différence significative au seuil de 5% entre la survie du virus infectieux en PBS ($T_{90} = 14,5$ jours) et en PBS additionné de filtrat ($T_{90} = 15,8$ jours).

Par ailleurs, le T seuil expérimental pour le virus infectieux se situe entre 74 et 81 jours.

Le T seuil théorique déterminé à partir de l'équation 3 en considérant comme valeur de C la limite de sensibilité du protocole se situe entre 62 et 77 jours.

Les valeurs des T seuil expérimentaux et théoriques sont donc comparables, ce qui confirme que dans nos conditions expérimentales, la décroissance du virus infectieux est bien de type exponentiel jusqu'à la limite de détection.

En ce qui concerne le virus pathogène, le T seuil expérimental se situe entre 10 et 21 jours.

Enfin, pour le génome viral, le T seuil se situe entre 169 et 180 jours.

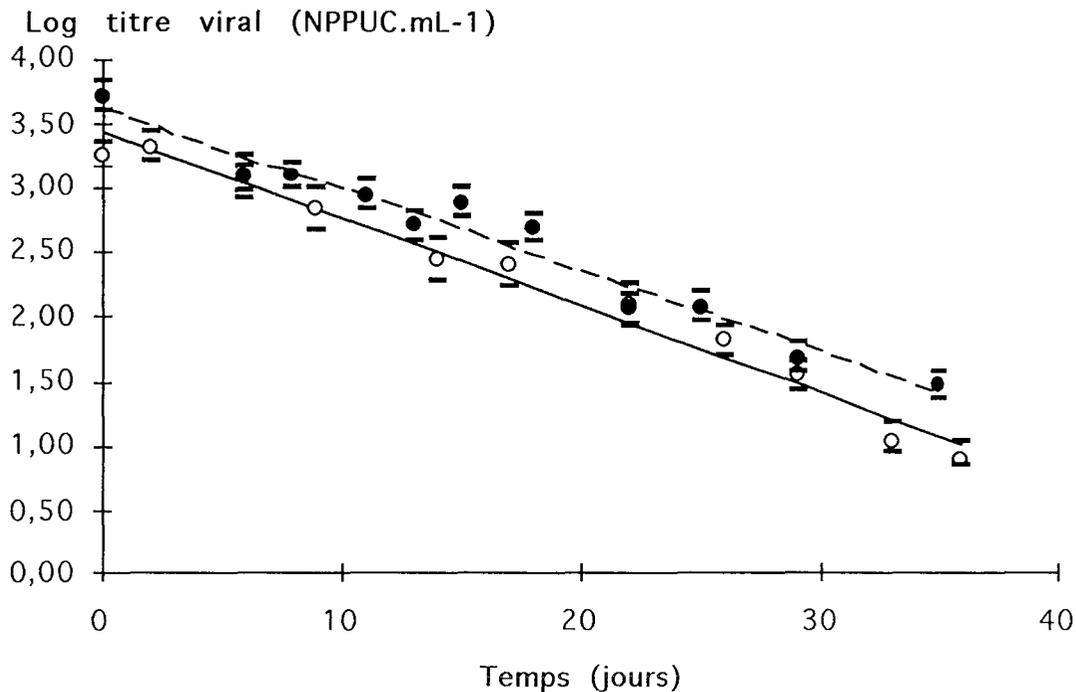


Figure 7 : Survie du cox B3 infectieux à 25°C dans du PBS (—) et du PBS+10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens* (-----).

Comme précédemment les T seuil théoriques, « virus pathogène » et « génome », sont calculés à partir de l'équation 3 et sont comparés à ceux obtenus expérimentalement.

Il apparaît que pour le pouvoir pathogène, le T seuil théorique (17-32 jours) est identique au T seuil expérimental (10-21 jours). Il semble donc que la décroissance du pouvoir pathogène suive le même modèle de décroissance que le pouvoir infectieux.

Par contre pour ce qui est du génome, une discordance de plus d'un facteur 2 est constatée entre le T seuil théorique (47-67 jours) et le T seuil expérimental (169-180 jours). Ceci montre que l'équation qui caractérise la décroissance du virus infectieux n'est pas applicable à celle du génome viral.

En ce qui concerne les durées de survie estimées à partir des T_{90} , seuls le virus infectieux et le génome sont pris en compte du fait que le pouvoir pathogène suit une décroissance équivalente à celle du pouvoir infectieux.

Le T_{90} est de 15,8 jours pour le virus infectieux et celui du génome est compris entre 27 et 41 jours. La durée de persistance du génome en tampon PBS additionné de 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* est donc de 2 à 3 fois supérieure à celle du virus infectieux.

Par contre, il est important de noter qu'il n'y a pas de différence significative au seuil 5% entre la persistance du génome en milieu PBS ($30 < T_{90} < 47$ jours) et celle en milieu PBS + filtrat bactérien ($27 < T_{90} < 41$ jours).

III.3.2 Influence de l'argile

Au cours de cette étude une solution de PBS est additionnée de 200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite avant d'être contaminée par du cox B3 en quantité telle que la concentration finale du milieu est de 4400 NPPUC.mL⁻¹.

Les résultats concernant la persistance d'une dose pathogène, du virus infectieux et du génome viral en fonction du temps sont rapportés dans le tableau 30.

A

Durée d'incubation (jours)	0	10	15	21	25	30	36	54
Détection sur souriceaux	+	+	-	+	+	-	-	-
15 < T seuil < 25								

B

Durée d'incubation (jours)	0	30	55	63	68	78	81	85	89	92	96	105
Détection sur culture cellulaire	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
68 < T seuil < 78												

C

Durée d'incubation (jours)	0	70	146	180	190	232	396	399	403	406	417	435
Détection du génome viral	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
396 < T seuil < 406												

Tableau 30 : Détection du matériel viral en fonction du temps à 25°C dans du PBS additionné de 200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite. Le matériel viral est détecté par inoculation sur souriceaux (A), par inoculation sur culture cellulaire (B) et par RT semi-nested PCR (C). Le T seuil est évalué par un intervalle de temps correspondant soit au premier échantillon négatif et au dernier échantillon positif (A et C) soit au dernier échantillon positif et au premier échantillon négatif (B).

En ce qui concerne le virus infectieux, une décroissance exponentielle est observée (figure 8) avec un coefficient de corrélation de 0,97 (n = 36) et un T₉₀ de 18,9 jours (IC_{95%} = 17,3 ; 20,8). L'équation de la régression s'écrit :

$$\log C = - 0,053 T + 3,65 \quad (\text{éq4})$$

avec C : concentration virale (NPPUC.mL⁻¹) et T : temps (jours)

Il apparaît une différence significative au seuil 5% entre les T₉₀ du virus infectieux en milieu PBS (14,5 jours) et en PBS + argile (18,9 jours). Par ailleurs, le T seuil expérimental pour le virus infectieux se situe entre 68 et 78 jours.

Le T seuil théorique déterminé à partir de l'équation 4 en considérant comme valeur de C la limite de sensibilité du protocole se situe entre 57 et 76 jours.

Les valeurs des T seuil expérimentaux et théoriques sont comparables, ce qui confirme que dans nos conditions expérimentales, la décroissance du virus infectieux est bien en présence d'argile, de type exponentiel jusqu'à la limite de détection.

En ce qui concerne le virus pathogène, le T seuil expérimental se situe entre 15 et 25 jours.

Enfin, pour le génome viral, le T seuil se situe entre 396 et 406 jours.

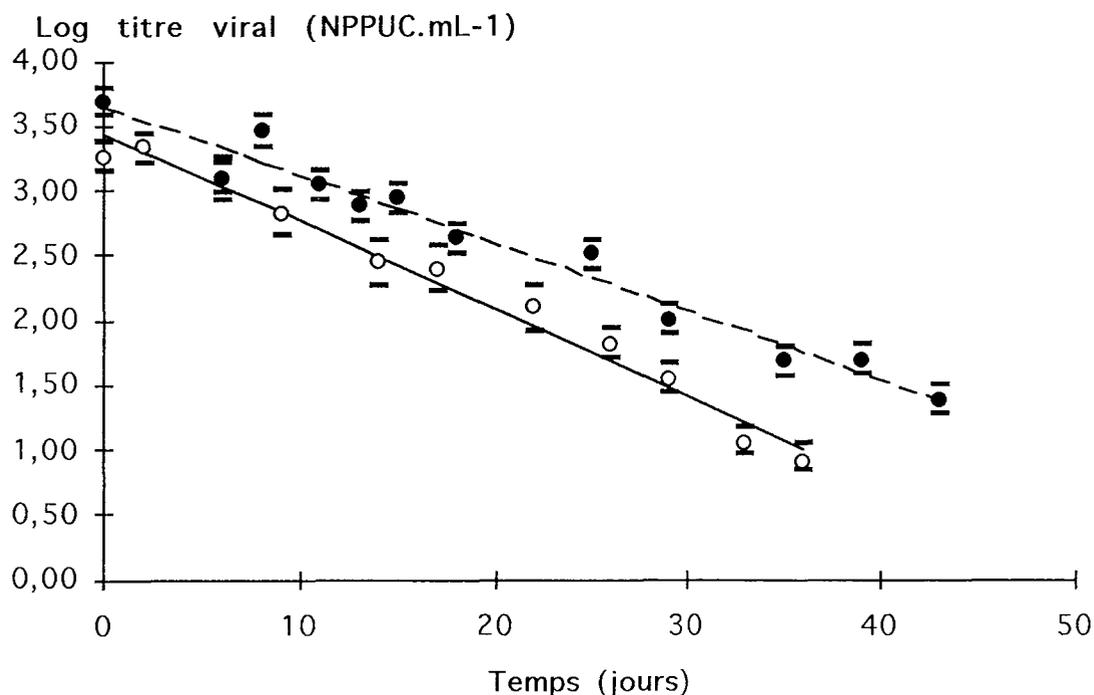


Figure 8 : Survie du cox B3 infectieux à 25°C dans du PBS (—) et du PBS+200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite (-----).

Comme précédemment les T seuil théoriques pour ces deux paramètres sont calculés à partir de l'équation 4 et sont comparés à ceux obtenus expérimentalement.

Il apparaît que pour le pouvoir pathogène, le T seuil théorique (19-38 jours) est comparable au T seuil expérimental (15-25 jours). Il semble donc qu'en présence d'argile, la décroissance du pouvoir pathogène suive le même modèle de décroissance que le pouvoir infectieux.

Par contre pour ce qui est du génome, une discordance de plus d'un facteur 5 est constatée entre le T seuil théorique (57-76 jours) et le T seuil expérimental (396-406 jours). Ceci montre que l'équation qui caractérise la décroissance du virus infectieux n'est pas applicable à celle du génome viral.

En ce qui concerne les durées de persistance, le T₉₀ est de 18,9 jours pour le virus infectieux et celui du génome est compris entre 67 et 101 jours. La persistance du génome en tampon PBS additionné de 200mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite est donc de 3,5 à 5 fois supérieure à celle du virus infectieux.

Si on compare le devenir du génome en PBS en présence et en absence d'argile, il apparaît qu'il existe une différence significative au seuil 5% entre la durée de persistance du génome viral en milieu PBS (30 < T₉₀ < 47) et PBS + argile (67 < T₉₀ < 101). Le génome viral persiste donc au moins 2 fois plus longtemps en présence d'argile qu'en tampon PBS.

III.3.3 Influence simultanée des matières en suspension et du filtrat bactérien

Au cours de cette étude une solution de PBS est additionnée de 200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite et de 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* avant d'être contaminée par du cox B3 en quantité telle que la concentration finale du milieu est de 5000 NPPUC.mL⁻¹. Les résultats concernant la persistance d'une dose pathogène, du virus infectieux et du génome viral en fonction du temps sont rapportés dans le tableau 31.

A

Durée d'incubation (jours)	0	10	15	21	25	30	36	54
Détection sur souriceaux	+	+	+	-	+	+	-	-
21 < T seuil < 30								

B

Durée d'incubation (jours)	0	30	55	63	68	78	81	85	89	92	96	105
Détection sur culture cellulaire	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
68 < T seuil < 78												

C

Durée d'incubation (jours)	0	70	146	180	232	399	403	406	410	417	425	435
Détection du génome viral	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
417 < T seuil < 425												

Tableau 31 : Détection de matériel viral en fonction du temps à 25°C dans du PBS additionné de 200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite et 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens*. Le matériel viral est détecté par inoculation sur souriceaux (A), par inoculation sur culture cellulaire (B) et par RT semi-nested PCR (C). Le T seuil est évalué par un intervalle de temps correspondant soit au premier échantillon négatif et au dernier échantillon positif (A), soit au dernier échantillon positif et au premier échantillon négatif (B et C).

En ce qui concerne le virus infectieux, une décroissance exponentielle est observée (figure 9) avec un coefficient de corrélation de 0,98 (n = 39) et un T_{90} de 18,8 jours ($IC_{95\%} = 17,5 ; 20,3$). L'équation de la régression s'écrit :

$$\log C = - 0,053 T + 3,73 \quad (\text{éq5})$$

avec C : concentration virale (NPPUC.mL⁻¹) et T : temps (jours)

Il apparaît une différence significative au seuil 5% entre les T_{90} du virus infectieux en milieu PBS (14,5 jours) et en PBS + argile (18,8 jours). Par ailleurs, le T seuil expérimental pour le virus infectieux se situe entre 68 et 78 jours.

Le T seuil théorique déterminé à partir de l'équation 5 en considérant comme valeur de C la limite de sensibilité du protocole se situe entre 57 et 76 jours.

Les valeurs des T seuil expérimentaux et théoriques sont donc comparables, ce qui confirme que dans nos conditions expérimentales, la décroissance du virus infectieux est bien de type exponentiel jusqu'à la limite de détection.

En ce qui concerne le virus pathogène, le T seuil expérimental se situe entre 21 et 30 jours.

Enfin, pour le génome viral, le T seuil expérimental se situe entre 417 et 425 jours.

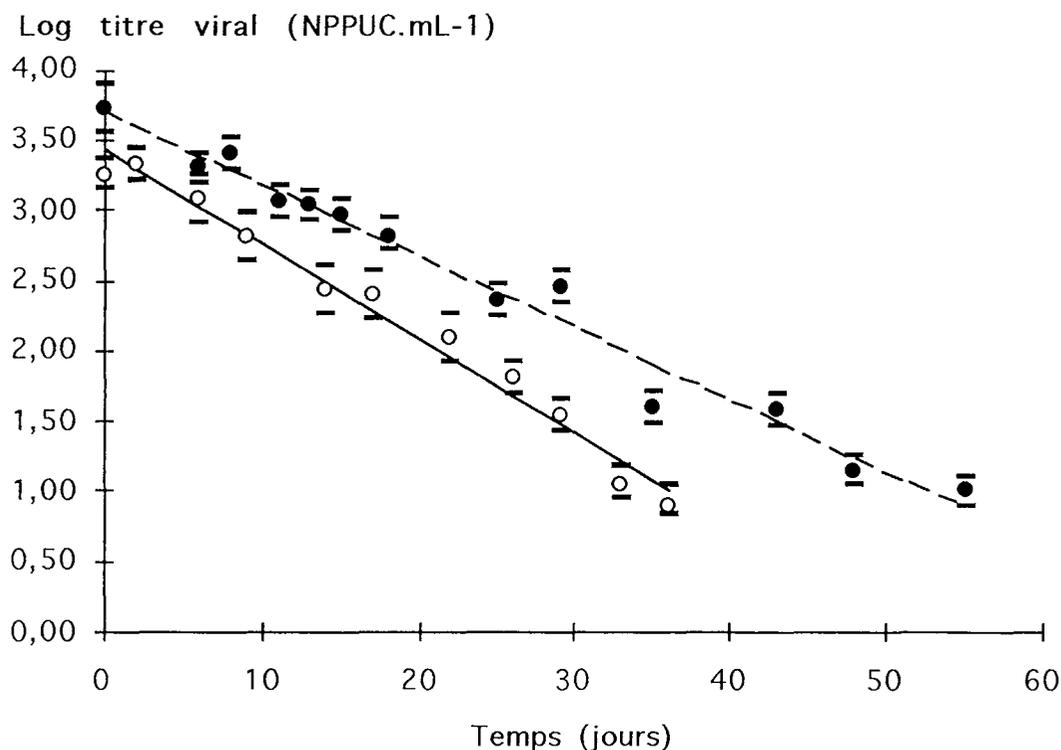


Figure 9 : Survie du cox B3 infectieux à 25°C dans du PBS (—) et du PBS+200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite+10% de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens* (-----).

Comme précédemment, les T seuil théoriques sont calculés à partir de l'équation 5 et sont comparés à ceux obtenus expérimentalement.

Il apparaît que pour le pouvoir pathogène, le T seuil théorique (19-38 jours) est comparable au T seuil expérimental (21-30 jours). Par contre pour ce qui est du génome, une discordance de plus d'un facteur 5 est constatée entre le T seuil théorique (57-76 jours) et le T seuil expérimental (417-425 jours). Ceci confirme que l'équation qui caractérise la décroissance du virus infectieux n'est pas applicable à celle du génome viral.

En ce qui concerne les durées de persistance estimées à partir des T_{90} , seuls le virus infectieux et le génome sont pris en compte du fait que le pouvoir pathogène suit une décroissance équivalente à celle du pouvoir infectieux.

Le T_{90} est de 18,8 jours pour le virus infectieux et celui du génome est compris entre 71 et 109 jours pour le génome viral. La persistance du génome en tampon PBS additionné de 10% de filtrat de *Pseudomonas fluorescens* et de 200 mg.L⁻¹ de Na-montmorillonite est donc de 4 à 5 fois supérieure à celle du virus infectieux.

En ce qui concerne le devenir du génome, il existe une différence significative au seuil 5% entre la durée de persistance du génome viral en milieu PBS (30 < T_{90} < 47 jours) et PBS + argile + filtrat (71 < T_{90} < 109 jours). Le génome viral persiste donc au moins 2 fois plus longtemps en présence d'argile et de filtrat qu'en tampon PBS.

III.4 Discussion

Les études de sensibilité montrent que la dose de cox B3 susceptible de provoquer la mort d'un souriceau est faible et de 7,5 NPPUC. Ce résultat est en accord avec les données de la littérature où les doses minimales infectantes rapportées pour les virus entériques varient de 1 à 100 unités infectieuses (Graham *et al.*, 1987 ; Ward *et al.*, 1986 ; Schiff *et al.*, 1984). Les survies réalisées dans les différents milieux font apparaître que le pouvoir pathogène (inoculation aux souriceaux) et le pouvoir infectieux (culture cellulaire) suivent des cinétiques de décroissance identiques dans tous les cas.

En milieu PBS, le génome viral persiste au moins deux fois plus longtemps que le virus infectieux (30 < T_{90} < 47 vs 14,5 jours) et le dernier échantillon positif en génome a une probabilité < 10⁻⁷ de correspondre à du virus infectieux.

La présence de filtrat de culture de *Pseudomonas fluorescens* n'a aucune influence ni sur la survie du virus infectieux (T_{90} = 14,5 jours vs 15,8 jours), ni sur la persistance du génome viral (30 < T_{90} < 47 jours vs 27 < T_{90} < 41 jours). Il n'existe donc aucune substance

dissoute provenant du métabolisme de *Pseudomonas fluorescens* ayant une activité virucide ou RNasique. L'hypothèse de dégradation rapide du génome en présence de produits du métabolisme bactérien émise par Enriquez *et al.* (1993), n'est donc pas vérifiée dans nos conditions expérimentales, malgré une culture bactérienne dense de 5 jours.

Par contre, la présence de Na-montmorillonite augmente la durée de survie du virus infectieux d'environ 4 jours, et la durée de persistance du génome d'un facteur 2. Il apparaît de plus qu'en présence d'argile, le génome viral persiste au moins 3 fois plus longtemps que le virus infectieux, et le dernier échantillon positif en génome viral a une probabilité $< 10^{-17}$ de contenir du virus infectieux.

Dans nos conditions expérimentales, c'est à dire en présence de sel (PBS), la majorité des virus est adsorbée sur l'argile (Quignon, 1995 ; Gantzer *et al.*, 1994). Cette adsorption augmente donc la survie du virus infectieux, mais plus encore la persistance du génome. Dans l'environnement, la majorité des virus est agrégée ou adsorbée à des éléments particuliers, et dans ces conditions, la présence de génome doit être interprétée avec une extrême prudence, notamment lors d'analyses de sédiments.

Il existe vraisemblablement deux types de matériel viral qui présentent des cinétiques de décroissance différentes, les virus infectieux mis en évidence sur culture cellulaire et les virus non infectieux mis en évidence en même temps que les virus infectieux lors de la détection du génome par RT semi-nested PCR.

Dans nos conditions expérimentales, l'inactivation du virus infectieux s'effectue par des lésions ou des changements de conformation de la capsid virale qui empêchent l'infection cellulaire, le génome viral persiste quant à lui plus longtemps dans le milieu.

En conclusion, la détection de génome viral dans un milieu tamponné tel que le PBS, ne peut donc pas témoigner de la présence de virus infectieux pathogènes pour un organisme sensible et n'est en fait qu'un indicateur de contamination virale plus ou moins récente. La culture cellulaire est et reste la seule méthode de référence permettant de témoigner d'un risque d'infection immédiat. Cependant, la détection de génome viral peut témoigner d'une contamination virale plus ou moins récente du milieu.

Cette étude doit impérativement être poursuivie en milieu naturel où de nombreux paramètres peuvent avoir une action sur la survie du virus infectieux et du génome viral. Une telle étude permettra en outre d'évaluer l'intérêt de la détection de génome en tant qu'indicateur de contamination virale.

IV

*Devenir du coxsackievirus B3
en milieu naturel*

Les résultats rapportés dans le chapitre précédent montrent que le pouvoir pathogène et le pouvoir infectieux suivent un même modèle d'inactivation en milieu tamponné et que la présence dans un milieu d'une unité infectieuse peut témoigner d'un risque d'infection chez un hôte sensible.

Par ailleurs, ces résultats mettent en évidence que le génome viral a des modalités de dégradation différentes de celles des particules virales infectieuses, et qu'en particulier sa durée de persistance dans le milieu est plus longue que celle du virus infectieux.

Dans ces conditions il est clair, du moins en milieu tamponné, que le génome ne peut pas témoigner de la présence de virus infectieux ou pathogènes, mais que par contre, il est un indicateur d'une contamination plus ou moins récente de ce milieu.

Compte tenu de ces différentes données, nous avons considéré que, pour la suite du travail, d'une part il était inutile de poursuivre l'étude comparative du devenir du pouvoir infectieux et du pouvoir pathogène, et nous travaillerons exclusivement sur le virus infectieux et extrapolerons ces résultats pour le pouvoir pathogène, d'autre part que l'étude du génome devrait être poursuivie.

Enfin nous travaillerons non plus dans un milieu tamponné, mais sur des eaux naturelles filtrées (adduction et forage), de façon à prendre en compte l'influence des substances dissoutes et de la composition chimique de l'eau sur le devenir du matériel viral.

Cette partie du travail comporte deux étapes :

- l'étude du devenir du matériel viral dans une eau de distribution de faible conductivité et contenant du chlore résiduel,
- l'étude de la durée de persistance du matériel viral dans une eau de forage n'ayant pas subi de traitement de potabilisation et ayant une forte conductivité.

IV.1 Devenir du matériel viral en eau de distribution

La survie du cox B3 infectieux et la persistance du génome viral sont étudiées à 25°C dans de l'eau de distribution de Nancy. Cette eau est caractérisée par une conductivité de 40 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et contient un résiduel de chlore.

L'eau est prélevée au robinet puis stérilisée par filtration. Le protocole expérimental est décrit dans matériels et méthodes (VI.1).

Une première étape consiste à déterminer la teneur en chlore résiduel et à suivre son évolution en fonction du temps.

IV.1.1 Dosage du chlore résiduel

Le dosage du chlore résiduel est réalisé par la méthode au DPD (N,N-diéthyl-p-phénylènediamine décrite dans matériels et méthodes X) avant contamination et 1 heure après l'ajout de la suspension virale. Ce dosage est ensuite poursuivi au cours du temps et les résultats sont rapportés dans le tableau 32.

Il apparaît qu'avant contamination, l'eau contient 0,08 mg.L⁻¹ de chlore libre et que cette quantité de chlore résiduel diminue rapidement. Après la contamination virale et 8 heures d'incubation à 25°C (C+8), sa concentration est en dessous du seuil de détection. Dans ces conditions, il est possible de considérer qu'après un jour d'incubation, la concentration en chlore résiduel est sinon nulle, du moins négligeable.

Durée d'incubation (heures)	Chlore libre (mg.L ⁻¹)
0	0,08
C+1	0,06
C+3	0,04
C+5	0,02
C+8	<0,02
C+18	<0,02
C+25	<0,02

C : contamination virale

Tableau 32 : Dosage du chlore résiduel en fonction du temps à 25°C dans une eau de distribution contaminée (C) artificiellement par du cox B3.

IV.1.2 Devenir du virus infectieux et de son génome

Les résultats concernant la survie des 2 paramètres au cours du temps sont représentés sur la figure 10.

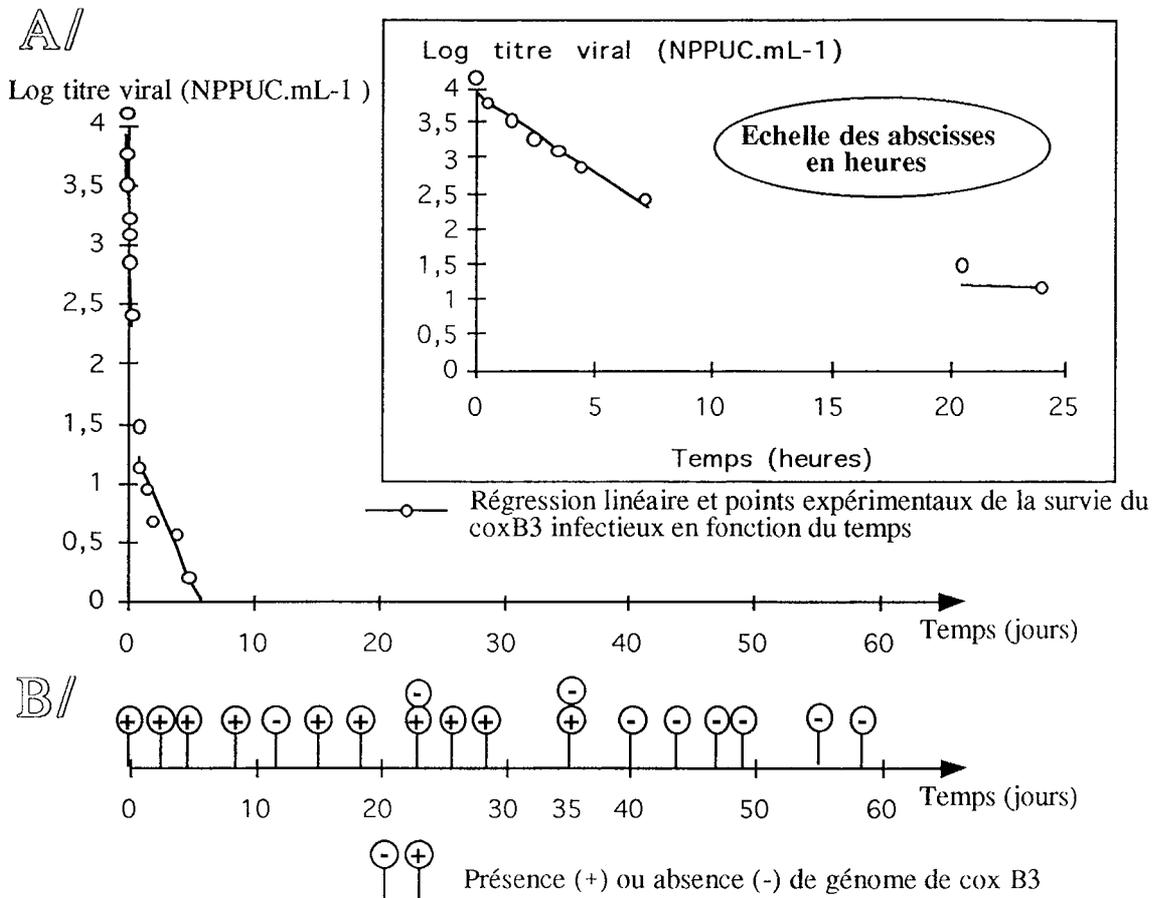


Figure 10 : Survie du cox B3 infectieux(A) et persistance du génome viral en fonction du temps (B), à 25°C dans une eau de distribution stérilisée par filtration.

L'analyse de la figure 10A montre que, en ce qui concerne le virus infectieux, la décroissance ne suit pas la courbe exponentielle classique monophasique obtenue dans le tampon PBS. Il est possible de concevoir l'existence d'une courbe biphasique correspondant dans sa première partie à une inactivation très rapide et dans sa deuxième partie à une inactivation plus lente.

La première partie suit un modèle exponentiel avec un coefficient de corrélation de 0,98. Le T_{90} calculé est alors de 0,19 jours ($IC_{95\%}$: 0,15 - 0,24), le titre initial étant de $1,27 \cdot 10^4$ NPPUC mL^{-1} (C_0).

La deuxième partie, toujours selon un modèle exponentiel, présente un coefficient de corrélation de 0,92 et un T_{90} de 4,2 jours ($IC_{95\%}$: 2,7 - 9,6). Elle est caractérisée par l'équation de régression suivante :

$$\log C_t = -0,240 T + 1,40 \quad (\text{éq 1})$$

avec C_t : concentration virale au temps t (NPPUC. mL^{-1}); et T : temps (jours)

L'équation 1 permet de calculer le titre viral (C_1 reg) correspondant au point de départ de la courbe (après une incubation de 1 jour) : $C_1 \text{ reg} = 14 \text{ NPPUC.mL}^{-1}$.

Il existe donc un facteur 907 entre C_0 et C_1 reg. Ce facteur représente la disparition virale entre 0 et 1 jour d'incubation.

Enfin, il est montré de manière expérimentale que le virus infectieux est détecté pendant une période de 10 à 15 jours.

A la lecture de la figure 10B, en ce qui concerne le génome viral, il apparaît que celui-ci est détecté pendant une période de 35 jours. Or après 35 jours d'incubation, la probabilité de détecter du virus infectieux est extrêmement faible puisqu'elle est inférieure à 10^{-5} .

Dans ces conditions expérimentales, il est difficile de calculer le T_{90} génome. En effet, pour le calcul de ce T_{90} , nous avons fait l'hypothèse (chapitre III.2), que la dégradation du génome suivait une courbe exponentielle monophasique du même type que celle du virus infectieux. Or dans ce cas, l'inactivation du virus infectieux est représentée par une courbe biphasique.

Quoi qu'il en soit, il est licite de constater que, dans ce type d'eau, la présence de génome viral ne peut pas témoigner de la présence de virus infectieux et que le génome persiste au moins deux fois plus longtemps que le virus infectieux.

Le fait que le devenir du virus infectieux dans ce type d'eau soit décrit par une courbe biphasique, mérite d'être analysé.

Cette particularité peut être expliquée par diverses hypothèses :

- inactivation par le chlore résiduel ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$)
- adsorption des virus sur les parois des récipients de stockage
- agrégation ou inactivation virale non chlore dépendante

Des expérimentations complémentaires nous ont paru nécessaires pour tenter de déterminer l'hypothèse (ou les hypothèses) la plus probable. Pour ce faire, nous avons comparé le devenir des différents paramètres dans l'eau filtrée, dans la même eau autoclavée et dans la même eau additionnée de thiosulfate de sodium.

En effet, l'autoclavage permet d'éliminer le chlore résiduel ainsi que d'éventuelles substances inactivantes dissoutes thermosensibles, alors que l'addition de thiosulfate de sodium neutralise seulement le chlore.

IV.1.2.1 Influence de l'autoclavage

L'expérimentation est réalisée après autoclavage à 121°C pendant 20 min. de l'eau d'adduction filtrée ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel). Celle-ci est ensuite contaminée avec du

L'équation 2 permet de calculer le titre viral correspondant au point de départ de la courbe ($C_{1,reg}$) qui est de 76 NPPUC.mL⁻¹.

Il existe donc un facteur 35 entre C_0 et $C_{1,reg}$. Ce facteur représente la disparition virale entre 0 et 1 jour d'incubation.

Enfin, il apparaît que le virus infectieux est détecté dans le milieu pendant une période de 10 à 18 jours.

En ce qui concerne le génome viral (figure 11B), celui-ci est détecté pendant une période de 45 jours et la probabilité de détecter un virus infectieux à cette date est extrêmement faible puisque de l'ordre de 10^{-10} .

De la même manière et pour les mêmes raisons que pour l'eau filtrée, le T_{90} ne peut être calculé. Cependant là encore, le génome viral persiste au moins deux fois plus longtemps que le virus infectieux et ne permet donc pas de témoigner de la présence de virus infectieux.

IV.1.2.2 Influence du thiosulfate de sodium

Le thiosulfate de sodium qui permet de neutraliser le chlore résiduel est ajouté à l'eau d'adduction filtrée à raison de 10 μ M. Les résultats sont rassemblés dans la figure 12.

Il apparaît en ce qui concerne le virus infectieux (figure 12A) que l'inactivation est exponentielle monophasique avec un coefficient de corrélation de 0,98 et un T_{90} de 4,8 jours ($IC_{95\%}$: 4,2 - 5,9). Le titre initial est de 18356 NPPUC.mL⁻¹.

De plus, il est montré que le virus infectieux est détecté dans le milieu pendant une période de 20 à 26 jours.

En ce qui concerne le génome (figure 12B), celui-ci est détecté pendant une période de 55 jours et la probabilité de détecter du virus infectieux à cette date est inférieure à 10^{-5} .

Compte tenu du mode d'inactivation du virus infectieux (exponentielle monophasique), il est possible de calculer le T_{90} du génome selon le protocole décrit en III.2.

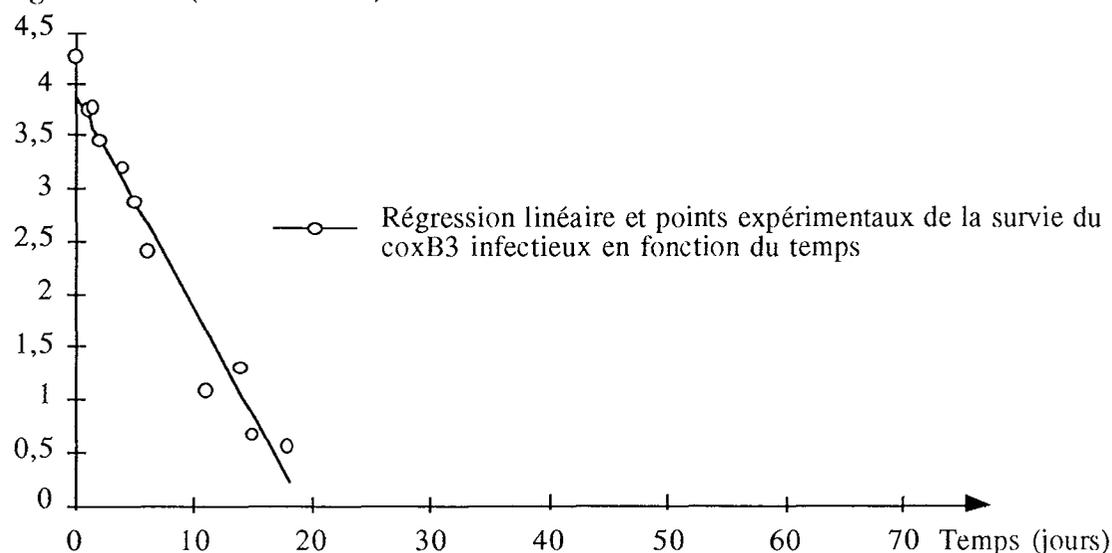
Ce T_{90} se situe entre 8 et 12 jours et est donc environ 2 fois supérieur à celui du virus infectieux et au moins 3 fois plus faible que celui observé pour le génome en milieu PBS qui est de 30 à 45 jours.

Il est possible de s'interroger sur les raisons de cette diminution du T_{90} génomique dans l'eau d'adduction sans chlore résiduel par rapport au tampon PBS. Or, l'action de RNases thermostables est souvent invoquée pour expliquer la disparition du génome. Dans

ces conditions, nous avons mis sur pied une expérimentation afin de déterminer d'une manière indirecte, si l'action des RNases pouvait être responsable de cette diminution.

A/

Log titre viral (NPPUC.mL-1)



B/

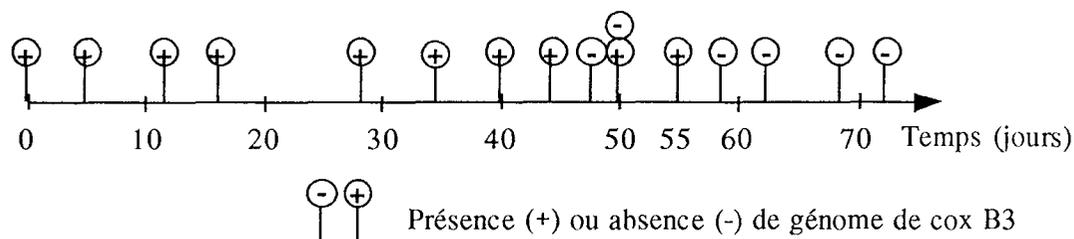


Figure 12 : Survie du cox B3 infectieux(A) et persistance du génome viral en fonction du temps (B), à 25°C dans une eau de distribution filtrée et additionnée de thiosulfate de sodium.

IV.1.2.3 Influence des RNases

De façon à déterminer si les RNases sont responsables de la diminution de la durée de persistance du génome dans l'eau d'adduction en l'absence de chlore, nous avons effectué 3 expérimentations de survie du cox B3. L'une dans l'eau d'adduction autoclavée, la deuxième dans l'eau additionnée de DEPC et la troisième dans une eau traitée au DEPC et dans laquelle le contaminant viral était exempt de RNases (traitement préalable par des inhibiteurs de RNases).

L'eau autoclavée contient les RNases du stock viral et celles de l'eau, l'eau traitée au DEPC ne contient plus les RNases de l'eau qui sont éliminées par le DEPC, et le troisième milieu ne contient aucune RNase.

Pour la réalisation pratique, six litres d'eau sont prélevés et filtrés puis répartis en 3 fractions de 2 litres. La première fraction est autoclavée à 121°C pendant 20 min., les 2 autres sont additionnées de 0,1% de DEPC, incubées 12 heures à 37°C puis autoclavées. L'eau autoclavée et l'une des eaux traitées au DEPC sont contaminées avec une suspension de cox B3 et la troisième est contaminée par la même suspension de cox B3 préalablement additionnée de 10000 U d'inhibiteurs de RNases (Promega). Les différentes eaux sont ensuite réparties en flacons et placées à 25°C.

Le génome viral est détecté en fonction du temps dans les différents milieux jusqu'à l'obtention d'échantillons négatifs. Les résultats sont rapportés dans le tableau 33.

De façon à vérifier que le comportement du virus infectieux n'est pas modifié dans ces trois types d'eaux, nous avons parallèlement déterminé l'évolution du cox B3 infectieux.

Milieux	Temps (jours)													
	1	21	23	30	35	42	45	48	50	57	63	68	72	78
Auto	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Auto+DEPC	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Auto+DEPC +inh.RNases	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

Tableau 33 : Persistance du génome du cox B3 à 25°C dans de l'eau de distribution autoclavée (auto), traitée au DEPC et autoclavée (auto+DEPC) et traitée au DEPC, autoclavée et contaminée avec une suspension virale préalablement traitée aux inhibiteurs de RNases (auto+DEPC+inh. RNases).

En ce qui concerne le génome, il apparaît que dans l'eau autoclavée, le premier échantillon négatif est observé après 42 jours et le dernier échantillon positif après 45 jours, dans l'eau traitée au DEPC, le premier échantillon négatif est observé après 48 jours et le dernier échantillon positif après 57 et enfin dans l'eau traitée au DEPC et aux inhibiteurs de RNases, le génome viral est détecté jusqu'à 45 jours et à partir de 48 jours plus aucun génome n'est détecté.

Si l'hypothèse d'une décroissance exponentielle pour le génome viral est émise, il est possible de réaliser une comparaison statistique des résultats (chapitre III.2). Cette comparaison réalisée à l'aide du test du rapport de vraisemblance ne fait apparaître aucune différence significative au seuil de 5% ($P_c > 70\%$).

Par ailleurs, le comportement du virus infectieux est caractérisé par un T_{90} respectivement de 3,3 jours ($IC_{9,5\%}$: 1,3 - 5,3), 3,9 jours ($IC_{9,5\%}$: 1,3 - 8,3) et 2,4 jours ($IC_{9,5\%}$: 1,0 - 4,8) dans l'eau autoclavée ($n = 20$), l'eau traitée au DEPC ($n = 18$) et l'eau traitée au DEPC et aux inhibiteurs de RNases ($n = 18$). La comparaison statistique (test de Student) de ces T_{90} ne fait apparaître aucune différence significative au seuil 5%, et donc il n'y a pas de variation de survie du virus infectieux en fonction du milieu.

En conclusion, dans l'eau traitée au DEPC et aux inhibiteurs de RNases où les RNases potentiellement présentes ont été inactivées, la durée de persistance du génome est identique à celle observée dans les 2 autres milieux potentiellement contaminés par des RNases. Ceci montre que dans l'eau d'adduction, il n'y a pas de RNases thermostables actives et que la quantité de RNases (thermostables ou non) apportée par le stock viral n'a aucune influence sur le devenir du génome.

IV.1.2.4 Discussion

Après avoir constaté que la courbe de disparition virale dans l'eau filtrée était biphasique, nous avons émis 3 hypothèses pour expliquer ce phénomène :

- adsorption virale sur les parois des récipients de stockage,
- inactivation par le chlore résiduel,
- agrégation virale ou inactivation indépendante du chlore résiduel.

- **L'hypothèse de l'adsorption sur les parois** peut être rejetée en tenant compte des résultats obtenus par Schemmel (com. pers.). Cet auteur a étudié la survie du poliovirus de type 1 (PV_1) dans la même eau de distribution et observe cette même chute initiale rapide, que le milieu soit réparti en flacons siliconés ou non. Compte tenu du fait qu'il est très improbable qu'il y ait une adsorption virale sur des parois siliconées, la chute brutale du titre viral ne peut être attribuée à une adsorption virale sur les parois.

- **L'hypothèse de l'inactivation par le chlore résiduel** est par contre beaucoup plus plausible, même si la dose de chlore est faible ($0,08\text{mg.L}^{-1}$). D'ailleurs, l'inactivation virale par de faibles doses de chlore a déjà été suggérée par Quignon *et al.*

(1996). Ces auteurs ont en effet étudié le comportement du PV₁ dans un pilote alimenté par de l'eau de distribution contenant de faibles doses de chlore résiduel (de 0,04 mg.L⁻¹ à < 0,02 mg.L⁻¹) et comparé le titre viral obtenu après passage dans le pilote (T = 3,5 heures) d'eaux contenant des concentrations croissantes en thiosulfate de sodium. Ils constatent que le titre viral augmente avec la concentration en thiosulfate ajoutée et concluent que le chlore, même à très faible concentration, présente une action inactivante importante vis à vis de ce virus.

Dans notre expérimentation, aussi bien avec l'eau filtrée qu'avec l'eau autoclavée, nous constatons l'existence d'une première phase d'inactivation rapide. Cependant, il existe une différence importante entre les 2 eaux, en ce sens que le facteur de décroissance entre 0 et 1 jour est de 907 dans l'eau filtrée et seulement de 35 dans l'eau autoclavée. Dans ces conditions, nous pouvons considérer que la première phase d'inactivation serait pour une part importante due au chlore. L'action du chlore expliquerait le passage d'un facteur 907 à un facteur 35 dans l'eau autoclavée qui ne contient plus de chlore. Ceci est confirmé par le fait que dans l'eau additionnée de thiosulfate de sodium (absence de chlore), cette première phase d'inactivation rapide n'existe pas.

S'il est donc parfaitement clair que le chlore joue un rôle fondamental et incontestable dans l'inactivation observée lors de la première phase, il n'en demeure pas moins qu'après autoclavage et donc théoriquement en absence de chlore, il persiste une inactivation qui peut être chiffrée à un facteur 35.

Pour ce qui est du génome, sa durée de persistance (T₉₀) est 2 fois plus importante (test du rapport de vraisemblance) dans une eau sans chlore (thiosulfate de sodium ou autoclavage) que dans une eau avec 0,08mg.L⁻¹ de chlore résiduel (eau filtrée).

Le chlore joue donc un rôle aussi bien au niveau de la destruction du génome qu'au niveau de l'inactivation du virus infectieux.

- **L'hypothèse d'une agrégation virale ou d'une inactivation indépendante du chlore** se traduisant par une diminution du titre viral peut être envisagée pour éventuellement expliquer la différence de comportement entre l'eau autoclavée et l'eau additionnée de thiosulfate de sodium.

En fait, nous constatons que dans les eaux d'adduction dépourvues de chlore résiduel, le devenir du virus infectieux est différent selon la nature des traitements appliqués à l'eau (autoclavage ou ajout de thiosulfate de sodium). Ainsi, en eau additionnée de 10µM de thiosulfate de sodium, l'inactivation virale est décrite par une exponentielle monophasique alors que, après autoclavage, elle suit une courbe biphasique avec une chute rapide du titre viral au cours des premières heures suivant l'ajout du virus.

Par ailleurs, Schemmel (Com. pers.) travaillant avec le PV₁ dans le même type d'eau d'adduction observe que, en absence de chlore et en présence de 1µM de thiosulfate de

sodium, le facteur de décroissance entre 0 et 1 jour est de 10. Or, dans les mêmes conditions avec du cox B3 et en présence d'une dose 10 fois plus importante de thiosulfate de sodium, nous constatons que ce facteur de décroissance est négligeable. Dans ces conditions, si on admet que le cox B3 et PV₁ réagissent de la même façon, il apparaît que l'importance du facteur de décroissance est en relation avec la teneur en thiosulfate de sodium du milieu.

Enfin Paulus (com. pers.), travaillant sur le devenir du PV₁ en eau désionisée et en eau désionisée additionnée de 3 et 9 g.L⁻¹ de NaCl, observe qu'une heure après l'ajout du virus, le titre viral est de 3,5 10⁴ NPPUC.mL⁻¹ en présence de 9 g.L⁻¹ (valeur attendue), 1,5 10⁴ NPPUC.mL⁻¹ avec 3 g.L⁻¹ et de 5 10³ NPPUC.mL⁻¹ dans l'eau désionisée. Ces résultats montrent qu'en absence de sels, le titre viral obtenu est 6 fois plus faible qu'en solution isotonique.

Ces observations peuvent être expliquées en envisageant 2 hypothèses :

- une agrégation virale qui provoquerait une diminution apparente du titre viral
- une inactivation due à une faible force ionique.

Agrégation virale. Il est classiquement admis que le virus peut être considéré comme une particule colloïdale et que dans ces conditions, la théorie de l'adhésion connue sous le nom de DLVO peut lui être appliquée. Cette théorie postule que l'adhésion ou l'agrégation est le résultat de la compétition entre divers types de forces, les forces électrostatiques, les forces de Van der Waals, les liaisons hydrophobes...

Si l'on considère que le virus est, dans nos conditions expérimentales (pH 6,8), chargé négativement comme la plupart des entérovirus (Gerba 1984), il apparaît que les forces de répulsion électrostatiques sont très importantes et ne permettent pas aux autres types de liaisons de se manifester. L'addition de sels dans le milieu devrait permettre la diminution de l'intensité de ces forces de répulsion (baisse du potentiel Zeta), de favoriser le rapprochement des particules virales et donc de faciliter le processus d'agrégation. Or, dans les diverses expériences citées précédemment, l'effet inverse est observé.

Dans ces conditions, la thèse de l'agrégation ne peut pas être envisagée pour expliquer la chute du titre viral observée dans des eaux de faible conductivité.

Inactivation indépendante du chlore. Le rôle de la force ionique peut aussi être envisagée pour expliquer la décroissance rapide du titre viral. En effet, un certain nombre d'auteurs ont décrit des phénomènes d'inactivation virale dans des eaux de faible force ionique. Il est bien connu que les rotavirus subissent une inactivation très importante lorsqu'ils sont incorporés dans de l'eau distillée (Estes *et al.*, 1979 ; Shirley *et al.*, 1981). Pour ce qui est des entérovirus, dès 1975 Cords *et al.* rapportent une rapide inactivation de différentes souches de coxsackievirus A dans des solutions de faible force ionique. Wetz et

Kucinki (1991) et Gromeier et Wetz (1990) signalent que, en tampon hypotonique et à 37°C, le poliovirus subit en moins d'une heure des altérations irréversibles au niveau de la capsid. Cette inactivation se traduit par la transformation de virus infectieux (c.s. : 156 S) en particules inactivées (c.s. : 80 S). De plus ces auteurs montrent qu'un simple ajout de 2mM de CaCl₂ dans le milieu permet de stabiliser une forme intermédiaire (c.s. : 135 S) qui reste infectieuse.

Dans le cas de nos résultats, de ceux de Schemmel et de ceux de Paulus, cette hypothèse peut être envisagée en admettant cependant, qu'une faible variation de force ionique (addition de 10µM de thiosulfate de sodium) soit suffisante pour empêcher l'action sur la capsid ou stabiliser une forme virale infectieuse de 135 S.

Les résultats obtenus au niveau du génome sont aussi un élément en faveur d'une action seulement au niveau de la capsid, car la durée de la persistance du génome ne varie pas significativement au seuil 5% (test du rapport de vraisemblance) dans l'eau autoclavée et dans l'eau additionnée de thiosulfate de sodium.

De tels phénomènes d'inactivation virale très rapides en eaux douces peuvent d'ailleurs être observés si certains résultats sont analysés. Ainsi une différence entre la concentration initiale en virus déterminée de manière expérimentale (C_0 exp) et celle calculée à partir de la régression tenant compte de tous les autres points expérimentaux (C_0 reg) peut être observée dans de nombreuses études. Par exemple, le rapport C_0 exp / C_0 reg est de plus d'un log dans une étude de survie du PV₁ à 25°C dans de l'eau de distribution sans chlore résiduel (Enriquez *et al.*, 1995) et d'environ 0,75 log dans une étude de survie du PV₁ à température ambiante dans de l'eau de distribution sans chlore résiduel (Enriquez *et al.*, 1993).

En résumé il apparaît que, l'inactivation des virus infectieux dans une eau d'adduction est dans sa première phase due au chlore résiduel mais aussi à la faible teneur en sels.

En ce qui concerne la deuxième phase, les pentes sont identiques, quel que soit le traitement appliqué à l'eau (autoclavage ou thiosulfate de sodium), mais l'inactivation est 3 fois plus faible que dans le PBS. Ceci montre que, au cours de cette deuxième phase, il est possible que l'hypotonocité continue à avoir une action sur la survie des virus, certes moins importante mais cependant défavorable.

En ce qui concerne la persistance du génome, il apparaît qu'en présence de chlore, sa durée de persistance est plus faible qu'en absence de chlore. Ceci peut être dû soit à un effet

indirect du chlore qui détruit les capsides et permet ainsi une dégradation secondaire du génome, soit à une action directe du chlore sur le génome. En effet, les résultats rapportés dans la littérature concernant l'action du chlore sur le génome sont discordants. Moore et Margolin (1994) n'observent aucune dégradation du génome viral en 60 minutes dans de l'eau désionisée contenant $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore libre, alors que le virus infectieux est indétectable dès la deuxième minute. Par contre, Ma *et al.* (1994b) observent une baisse de la quantité de génome de 3 log en 6 minutes en présence de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel dans de l'eau désionisée.

En eau d'adduction et en absence de chlore, la durée de persistance du génome est 3 fois plus faible qu'en milieu PBS, cette observation suggère soit la présence dans l'eau d'adduction de facteurs solubles, capables de dégrader le génome comme le virus infectieux, soit simplement un effet inactivant dû à la faible teneur en sels. Nous avons cependant montré que ces facteurs solubles ne pouvaient être représentés par des RNases thermostables.

En fait il apparaît que, dans une eau d'adduction avec ou sans chlore résiduel, la présence de génome viral ne permet pas de témoigner de la présence de virus infectieux. Dans ce type d'eau, le génome viral persiste au moins deux fois plus longtemps que le virus infectieux et n'est donc qu'un indicateur de contamination virale plus ou moins récente.

IV.2 Survie en eau de forage

La survie du cox B3 infectieux et la persistance du génome viral sont étudiées à 25°C dans de l'eau de forage stérilisée par filtration. Cette eau n'a subi aucun traitement de potabilisation et est caractérisée notamment par une forte conductivité de $1030 \mu\text{S.cm}^{-1}$.

Le protocole expérimental est décrit dans matériels et méthodes (VI.1).

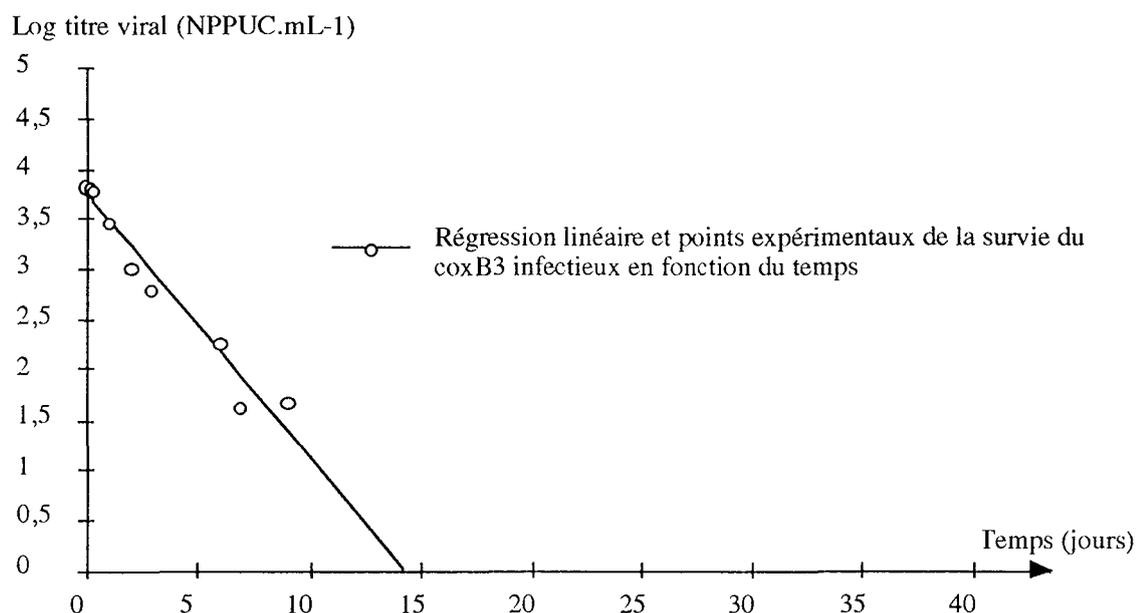
IV.2.1 Résultats

Les résultats concernant la persistance des deux paramètres en fonction du temps sont représentés sur la figure 13.

Il apparaît que la survie du cox B3 infectieux est traduite par une exponentielle monophasique ($r = 0,98$) avec un T_{90} de 3,6 jours ($IC_{95\%} : 2,5 - 4,4$). De plus, il est montré que le virus infectieux reste présent dans le milieu pendant une période de 16 à 20 jours.

En ce qui concerne le génome viral, le T₉₀ se situe entre 16 et 24 jours. Les probabilités d'observer une unité virale infectieuse après ces temps d'incubation sont respectivement de 1 et 0,1. Si on fait l'hypothèse d'une décroissance exponentielle pour le génome viral, comme cela est observé pour le virus infectieux, il apparaît que le T₉₀ est compris entre 2 (r = 1) et 5 jours (r = 100).

A/



B/

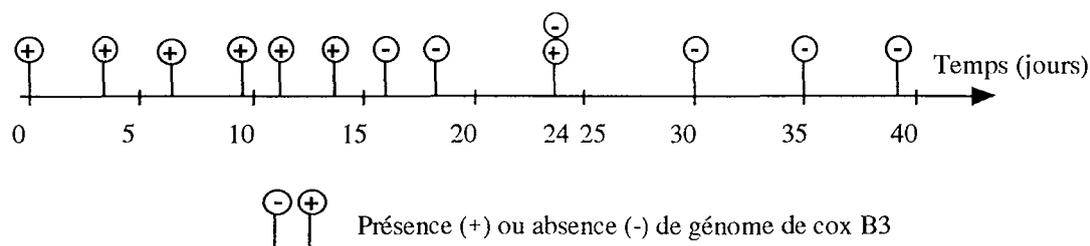


Figure 13 : Survie du cox B3 infectieux(A) et persistance du génome viral en fonction du temps (B), à 25°C dans une eau de forage stérilisée par filtration.

IV.2.2 Discussion

Il apparaît que les T₉₀ concernant le virus infectieux et le génome sont parfaitement comparables. Cette constatation tendrait à prouver que dans ce cas, la présence de génome est associée à une probabilité non négligeable de correspondre à la présence de virus infectieux.

Le T_{90} du virus infectieux est de 14,6 jours en PBS, alors qu'en eau de forage il est seulement de 3,6 jours, soit une durée près de 4 fois inférieure. Le T_{90} du génome est compris entre 30 et 47 jours en PBS et entre 2 et 5 jours en eau de forage, soit une durée au moins 6 fois inférieure.

La forte inactivation du virus infectieux dans l'eau de forage a déjà été observée par Quignon (1995) qui émet l'hypothèse, qu'il existerait une relation entre le niveau de conductivité et la capacité inactivante d'une eau vis à vis des entérovirus.

Si ces résultats sont comparés à ceux obtenus en tampon PBS, il est constaté une différence d'un facteur 2 entre les T_{90} du génome et du virus infectieux, alors qu'en eau de forage, les T_{90} de ces deux entités ne diffèrent pas. Cette faible durée de persistance du génome et cette quasi identité de comportement entre génome et virus infectieux en eau de forage ont déjà été constatées par Enriquez *et al.* (1993) dans de l'eau de puits. Ces auteurs expliquent ce phénomène par la présence de substances thermosensibles dissoutes dans l'eau qui dégradent rapidement le génome dès que celui-ci est accessible.

Compte tenu de ces observations, et si on compare les résultats obtenus en eau de forage et en eau de distribution sans chlore, il apparaît que :

- dans une eau de forage de forte conductivité, la survie du virus infectieux est exponentielle monophasique alors que dans l'eau de distribution sans chlore libre résiduel (autoclavée), elle est de type biphasique.

Il apparaît une différence significative de survie entre l'eau de forage (3,6 jours) et la première phase de décroissance en eau de distribution (0,19 jours), par contre aucune différence n'est observée par rapport à la deuxième phase (4,2 jours).

Cette observation confirme l'influence des sels sur la disparition rapide du virus durant les premières heures d'incubation, en effet lorsque la concentration en sels augmente, la première phase de décroissance disparaît.

- la survie du virus infectieux et la durée de persistance du génome viral aussi bien en eau de forage qu'en eau de distribution est inférieure à celle observée dans le PBS. Ce phénomène ne peut pas être expliqué par la différence de conductivité mais par la présence de substances dissoutes dans le milieu rejoignant ainsi l'hypothèse d'Enriquez *et al.* (1993) ou celle de Quignon (1995).

En conclusion, il apparaît que la présence de génome viral peut témoigner de la présence de virus infectieux dans l'eau de forage testée, par contre elle n'est qu'un indicateur de contamination virale dans une eau de distribution.

V

*Devenir du phage de Bacteroides fragilis en
milieux hydriques*

Les résultats obtenus dans les chapitres III et IV, concernant le génome viral, font apparaître que celui-ci peut témoigner de la présence de virus infectieux dans une eau de forage, mais qu'il est simplement un indicateur d'une contamination virale plus ou moins récente dans l'eau d'adduction.

Dans ces conditions, il nous a paru intéressant d'étudier la survie d'un autre candidat potentiel au titre d'indicateur de contamination virale dans les mêmes milieux.

Notre choix s'est porté sur les bactériophages de *Bacteroides fragilis*. Ces phages ont été initialement proposés en tant qu'indicateur par Jofre *et al.* (1986) et présentent l'avantage d'être spécifiques d'une contamination humaine.

Nous avons étudié la survie du phage de *Bacteroides fragilis* HSP40 dans 3 milieux :

- le PBS
- l'eau d'adduction
- l'eau de forage.

L'étude est réalisée selon les mêmes protocoles et dans les mêmes conditions que pour celle concernant la persistance du cox B3 infectieux et de son génome.

V.1 Survie dans le PBS

La survie du phage de *Bacteroides fragilis* est étudiée à 25°C dans du PBS dans les mêmes conditions que celles utilisées avec le coxsackievirus B3 (chap. III). Les résultats sont rapportés figure 14.

Il apparaît que la survie du phage est de type exponentiel avec un T_{90} de 11,0 jours ($IC_{95\%}$: 8,5 - 15,5) et un coefficient de corrélation de 0,95.

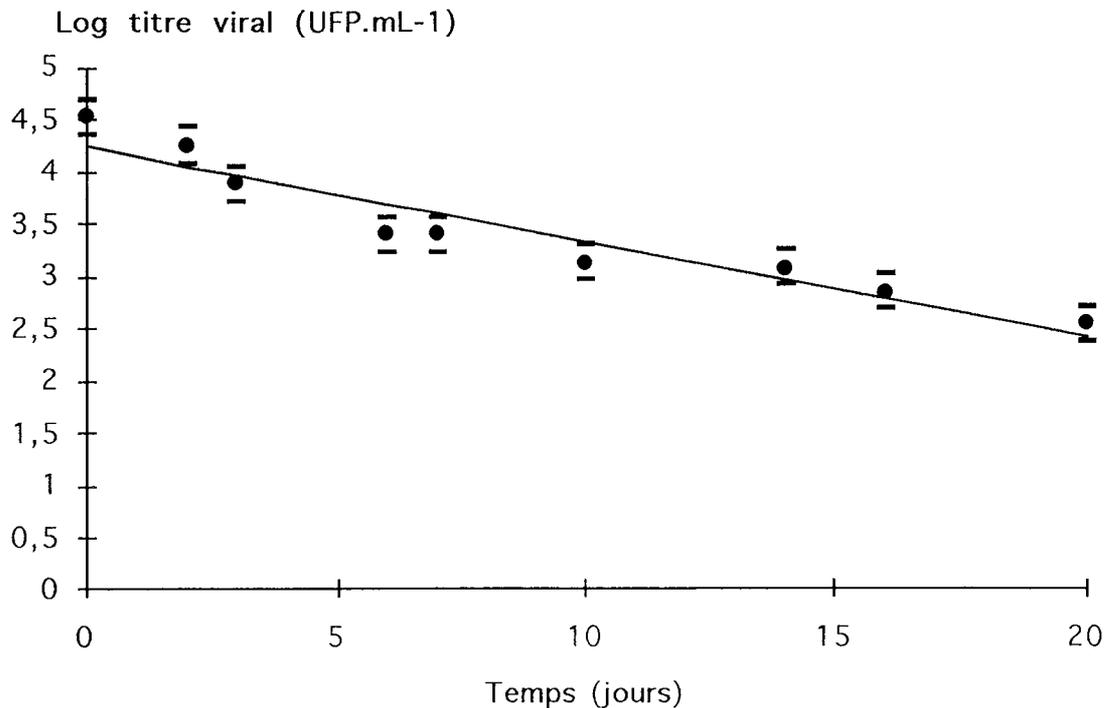


Figure 14 : Survie du phage de *Bacteroides fragilis* à 25°C dans du tampon PBS.

V.2 Survie dans de l'eau de distribution

La survie du phage de *Bacteroides fragilis* est étudiée dans de l'eau de distribution filtrée de conductivité 40 $\mu\text{S.cm}^{-1}$ et contenant un résiduel de chlore de 0,08 mg.L^{-1} , le titre initial étant de 12480 UFP.mL⁻¹. Les résultats sont rapportés dans la figure 15.

Il apparaît que, au cours des premières heures suivant l'introduction des phages dans l'eau, il se produit une chute très brutale du titre viral, se traduisant par une perte de près de 1,5 unité log de virus. Dans ces conditions, la survie du phage ne peut être modélisée par une exponentielle monophasique classique. Par ailleurs et compte tenu du faible nombre de points expérimentaux correspondant à cette première période, il est impossible d'estimer le T_{90} pour cette phase.

Après le premier jour, la décroissance semble exponentielle ($r = 0,93$) et ce modèle permet de calculer un T_{90} de 6,7 jours ($\text{IC}_{95\%} : 4,8 - 11,1$). L'équation de la régression s'écrit alors :

$$\log C_t = -0,149 T + 2,57 \quad (\text{éq 4})$$

Le titre en phages après 1 jour est selon l'équation 4 de 264 UFP. mL⁻¹ (C₁ reg). Il existe donc un facteur de disparition virale entre 0 et 1 jour (C₀/C₁ reg) de 47.

De plus, il apparaît que le phage est détecté dans le milieu pendant une période de 18 à 25 jours.

L'analyse statistique (test de Student) ne fait apparaître aucune différence significative au seuil de 5% entre le T₉₀ du phage observé durant la deuxième phase en eau d'adduction (6,7 jours) et celui observé dans le PBS (11 jours).

Dans ces conditions et de la même manière que pour le cox B3, il nous a paru intéressant d'étudier l'influence de l'autoclavage et de l'addition de thiosulfate de sodium sur la survie du phage.

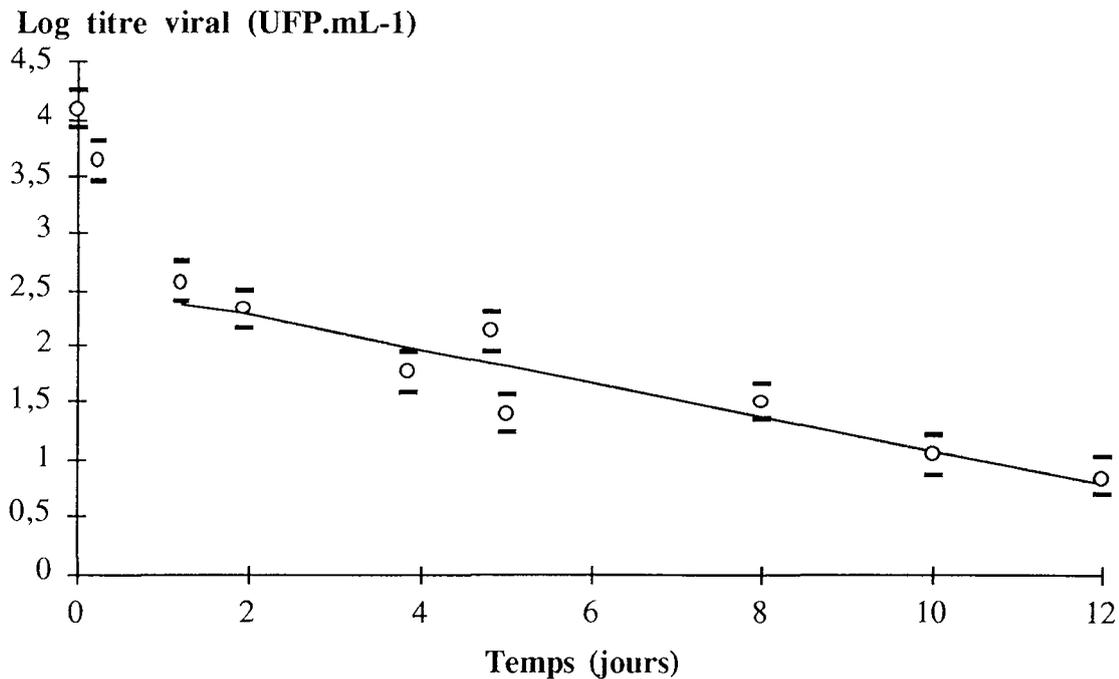


Figure 15 : Survie du phage de *Bacteroides fragilis* à 25°C dans de l'eau d'adduction filtrée.

V.2.1 Influence de l'autoclavage

L'expérimentation est réalisée après autoclavage 121°C, 20 min. de l'eau de distribution filtrée. Celle-ci est ensuite contaminée avec du phage de *Bacteroides fragilis*, de manière à obtenir une concentration initiale (C₀) de 31400 UFP.mL⁻¹. Les résultats sont rapportés sur la figure 16.

Comme précédemment, il est observé une inactivation importante et rapide dans les 24 premières heures suivant l'introduction des phages dans l'eau, alors qu'ensuite la décroissance semble exponentielle avec un T_{90} de 11,2 jours ($IC_{9,5\%}$: 9,5 - 13,7). Ce T_{90} , quoique plus élevé que celui observé dans l'eau filtrée (6,7 jours), n'en diffère pas significativement au seuil 5% (test de Student).

L'équation de régression s'écrit :

$$\log C_t = -0,089 T + 3,21 \quad (\text{éq 5})$$

Le titre en phages après un jour d'incubation selon l'équation 5 est de 1321 UFP.mL⁻¹. Il apparaît donc que la décroissance entre 0 et 1 jour d'incubation (C_0/C_1 reg) est de 24 alors que celle observée dans l'eau filtrée est de 47.

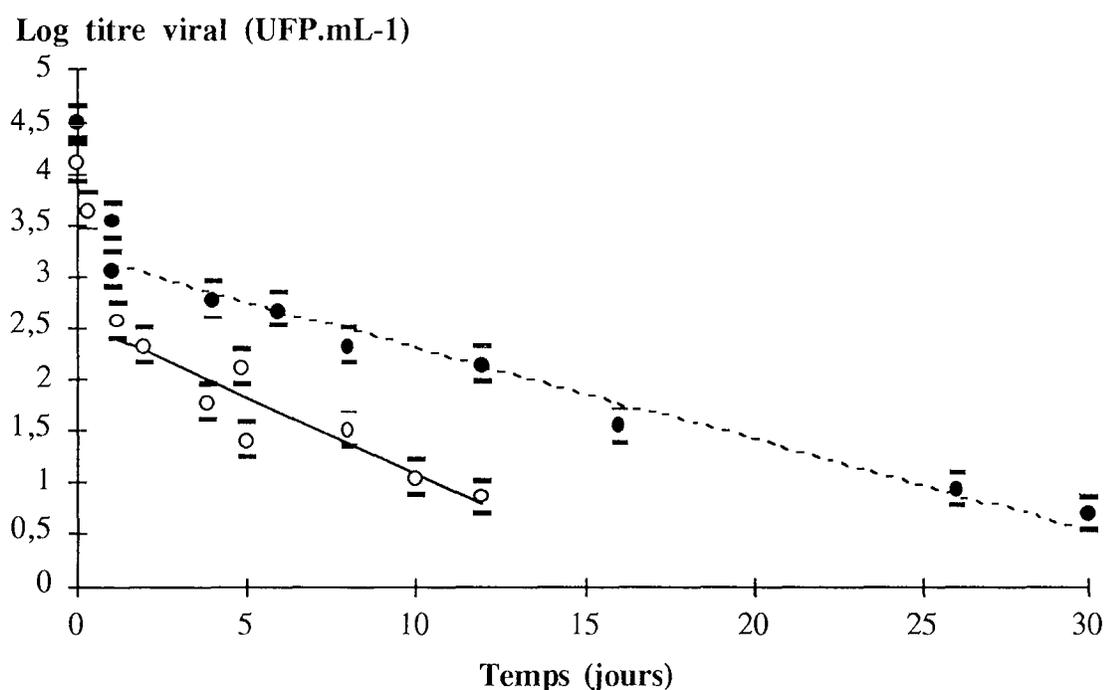


Figure 16 : Survie du phage de *Bacteroides fragilis* à 25°C dans de l'eau d'adduction filtrée (—) et autoclavée (- - - - -).

V.2.2 Influence de l'ajout de thiosulfate de sodium

Le thiosulfate de sodium qui permet de neutraliser le chlore résiduel est ajouté à raison de 10 μ M. Les résultats sont représentés sur la figure 17.

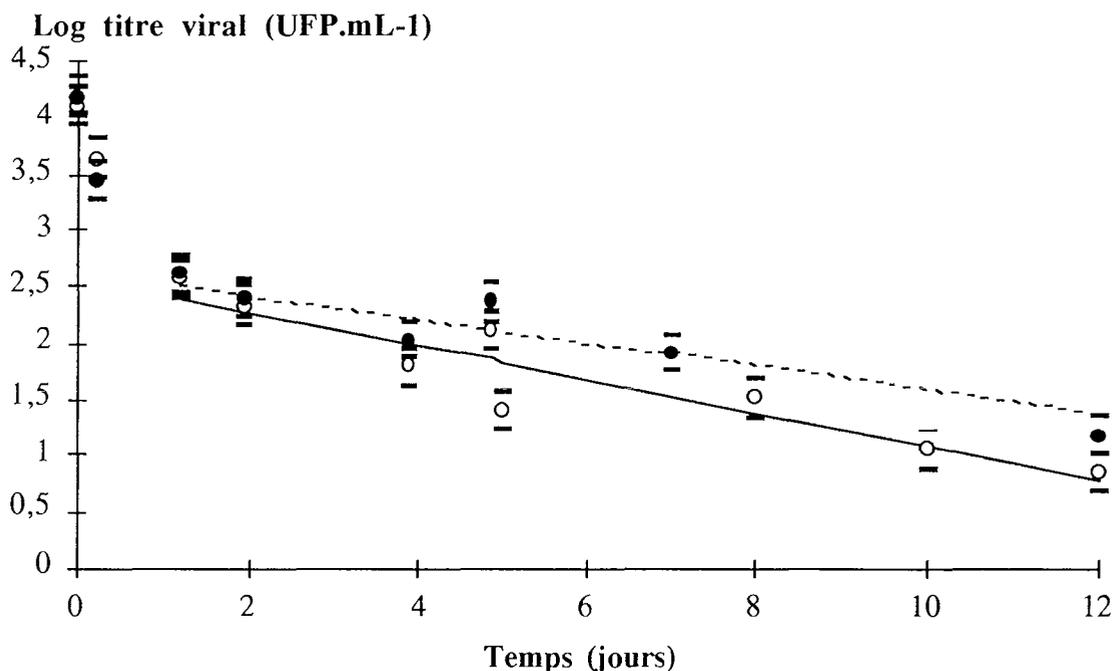


Figure 17 : Survie du phage de *Bacteroides fragilis* à 25°C dans de l'eau d'adduction filtrée et additionnée (-----) ou non (—) de 10 μ M de thiosulfate de sodium.

Le titre initial en phages (C_0) dans l'eau additionnée de thiosulfate est de 15400 UFP.mL⁻¹. Comme précédemment, il est constaté une chute rapide du titre viral au cours des premières heures, suivie par une phase de décroissance décrite par une exponentielle classique. Cette deuxième phase est caractérisée par un T_{90} de 9,6 jours ($IC_{95\%}$: 8,0 - 12,2) et par un coefficient de corrélation de 0,98. Il apparaît qu'il n'y a pas de différence significative entre ce T_{90} (9,6 jours) et celui observé dans l'eau filtrée (6,7 jours).

L'équation de la régression s'écrit :

$$\log C_t = -0,10 T + 2,62 \quad (\text{éq 6})$$

Selon l'équation 6, la concentration virale après un jour (C_1 reg) est de 331 UFP.mL⁻¹. La décroissance virale entre le début et le premier jour d'expérimentation (C_0/C_1 reg) est

donc d'un facteur 47. Ce facteur est identique à celui observé dans l'eau filtrée. De plus, il apparaît que le phage est détecté pendant une période de 28 à 34 jours.

V.3 Survie dans de l'eau de forage

La survie du phage de *Bacteroides fragilis* est étudiée à 25°C dans de l'eau de forage filtrée de conductivité 1030 $\mu\text{S.cm}^{-1}$. Les résultats sont rapportés dans la figure 18.

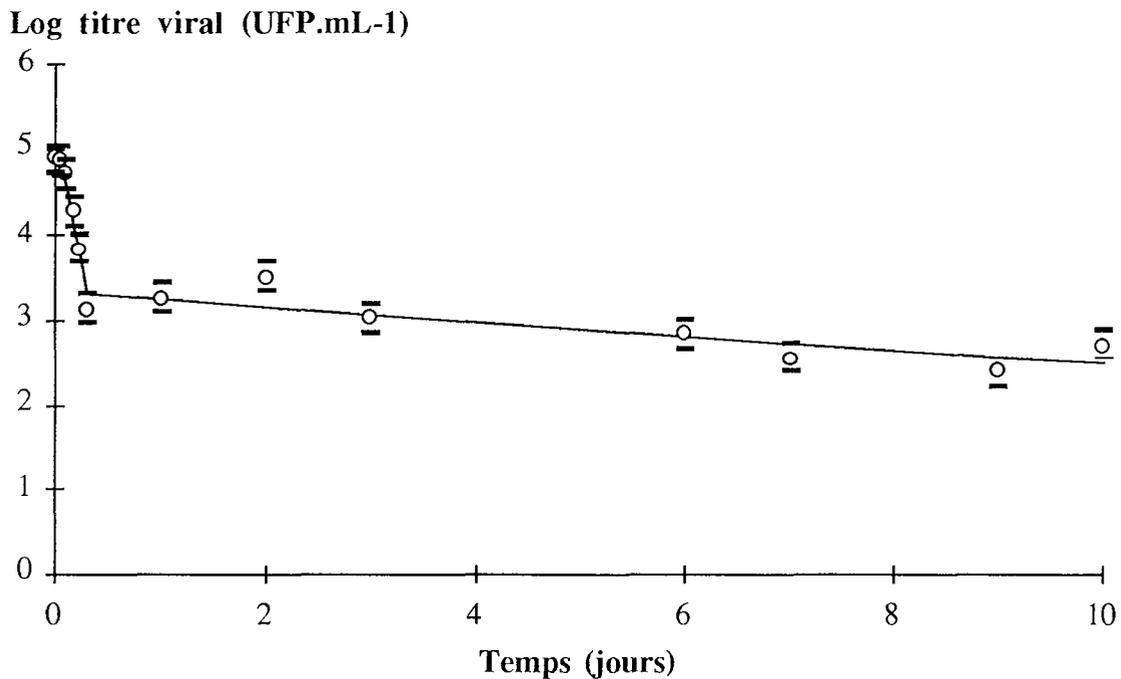


Figure 18 : Survie du phage de *Bacteroides fragilis* à 25°C dans de l'eau de forage filtrée.

Il apparaît qu'à partir d'un titre initial de $7,9 \cdot 10^4$ UFP.mL⁻¹ (C_0), la concentration chute rapidement durant les premières heures d'incubation, et que la survie du phage ne peut pas être exprimée par une exponentielle monophasique, mais par une courbe biphasique. La première droite obtenue à partir de 7 points expérimentaux permet de calculer un T_{90} qui s'établit à 0,16 jours ($IC_{95\%}$: 0,13 - 0,22), le coefficient de corrélation étant de 0,97.

Après le premier jour, un modèle exponentiel ($r = 0,86$) permet de calculer un T_{90} de 11,6 jours ($IC_{95\%}$: 7,4 - 27,6).

L'équation de la régression s'écrit alors :

$$\log C_t = -0,086 T + 3,33 \quad (\text{éq 7})$$

Le titre phagique après un jour d'incubation est selon l'équation 7 de 1754 UFP.mL^{-1} (C_1 reg). La décroissance phagique entre 0 et 1 jour d'incubation (C_0/C_1 reg) est donc de 45.

Il apparaît qu'il n'y a pas de différence significative au seuil de 5% entre le T_{90} du phage observé durant la deuxième phase dans l'eau de forage (11,6 jours) et ceux observés dans les mêmes conditions dans les différentes eaux d'adduction et le PBS.

V.4 Discussion

L'analyse des résultats montre que la survie du phage de *Bacteroides fragilis* en milieu PBS, peut être modélisée par une équation de type exponentiel simple. Par contre, dans les autres types d'eaux (eau de distribution et eau de forage), la survie du phage semble biphasique, et il est possible d'observer une réduction du titre viral entre 0 et 1 jour d'un facteur 47 et 45 respectivement dans l'eau de distribution et dans l'eau de forage.

Si on considère les mêmes hypothèses que celles retenues pour le coxackievirus B3, à savoir l'inactivation par le chlore et l'inactivation due à la faible force ionique, il apparaît que :

- l'inactivation par le chlore résiduel est négligeable. En effet, la réduction du titre viral entre 0 et 1 jour est la même en eau filtrée et en eau filtrée additionnée de thiosulfate de sodium (47 dans les 2 cas). De plus, ces facteurs d'inactivation sont comparables à celui observé dans l'eau de forage qui ne contient pas de résiduel de chlore (facteur 45). La plus grande résistance au chlore du phage de *Bacteroides fragilis* par rapport aux entérovirus a déjà été observée et est en accord avec la classification des micro-organismes en fonction de leur sensibilité vis à vis du chlore donnée par Bosch *et al.* (1989) qui est la suivante (du moins résistant au plus résistant) :

$E.coli = \text{Phage } f_2 > \text{Poliovirus 1} > \text{Phages de } Bacteroides fragilis.$

- l'inactivation due à la faible teneur en sels semble donc l'hypothèse la plus probable. Dans ces conditions, il apparaît que contrairement au cox B3, cette inactivation se produit aussi bien dans une eau d'adduction de conductivité $40 \mu\text{S.cm}^{-1}$, que dans une eau de forage de conductivité $1030 \mu\text{S.cm}^{-1}$, par contre elle n'est pas observée dans le tampon PBS. Il est cependant impossible d'appuyer cette hypothèse sur des données de la littérature, étant donné que la survie du phage de *Bacteroides fragilis* en eau douce n'a été rapportée que dans une seule publication. Dans ces conditions, il est simplement possible de dire que Jofre *et al.* (1986) n'observent pas ce phénomène d'inactivation rapide en eau de rivière. Cependant, si la conductivité n'est pas mesurée dans cette eau, il semble néanmoins qu'il s'agisse d'une eau

de rivière fortement contaminée et présentant des concentrations importantes en coliformes fécaux (10^5 à 10^7 NPPUC.L⁻¹) et en COD (45 à 493 mg.L⁻¹).

L'inactivation rapide observée durant les premières heures d'incubation ne constitue que la première phase de la survie du phage, mais après un jour d'incubation, aucune différence significative de survie n'est observée dans les différentes eaux, y compris le PBS.

Lorsque la survie du phage est comparée à celle du coxackievirus B3 dans les différents types d'eaux, il peut être considéré que :

- dans le PBS, la survie du coxackievirus B3 et celle du phage sont comparables et peuvent être modélisées par une exponentielle monophasique. La comparaison statistique entre la survie du phage (11,0 jours) et celle du cox B3 infectieux (14,6 jours) ne fait apparaître aucune différence significative au seuil 5% (test de Student).

- dans l'eau d'adduction filtrée en présence de 0,08 mg.L⁻¹ de chlore, il est observé aussi bien avec le coxackievirus B3 qu'avec le phage, une inactivation en 2 phases. Une première phase très rapide, suivie d'une deuxième phase plus lente. Cependant au cours de la première phase, l'inactivation est beaucoup plus importante pour le coxackievirus B3 que pour les phages (facteur de décroissance de 907 vs 47). Par contre, le processus d'inactivation semble être identique pour les 2 virus au cours de la deuxième phase (T_{90} de 6,7 vs 4,2 jours). En effet, la comparaison statistique (test de Student) ne met en évidence aucune différence significative au seuil 5% entre les deux T_{90} . Néanmoins, d'une manière globale et à partir d'un titre viral équivalent, le phage reste présent dans le milieu environ 2 fois plus longtemps que le cox B3 infectieux.

Ce phénomène peut être expliqué par le fait que le phage de *Bacteroides fragilis* est plus résistant au chlore que le coxackievirus B3.

- dans l'eau d'adduction additionnée de thiosulfate de sodium, la survie du cox B3 infectieux est exponentielle monophasique alors que celle du phage reste biphasique. La comparaison du T_{90} de la deuxième phase pour le phage (9,6 jours) avec celui observé pour le cox B3 (4,8 jours) fait apparaître une différence significative au seuil 5% (test de Student). Le phage présente donc une survie inférieure à celle du cox B3 durant les premières heures et supérieure après le premier jour d'incubation. Dans ces conditions et à partir d'un titre initial comparable, le phage reste présent dans le milieu environ 1,5 fois plus longtemps que le cox B3.

- dans l'eau d'adduction autoclavée le phage et le cox B3 présentent tous les deux une survie biphasique. Lors de la première phase, le facteur de décroissance est comparable pour les phages et le cox B3 (24 vs 35), alors qu'une différence significative au

seuil 5% est observée entre le T_{90} du phage (11,2 jours) et celui du cox B3 (3,3 jours). Dans ces conditions, il apparaît que le phage persiste environ 3 fois plus longtemps que le virus infectieux dans le milieu.

- dans l'eau de forage filtrée, une inactivation en 2 phases est observée pour le phage alors que pour le coxsackievirus B3 elle est de type exponentielle monophasique. Au cours de la première phase, le titre phagique chute d'un facteur 45. Au cours de la deuxième phase, la survie du phage est 3 fois supérieure à celle du coxsackievirus B3 (11,6 jours vs 3,6 jours). Dans ces conditions, il apparaît que pour un titre viral initial équivalent et selon les modèles de décroissance déterminés pour le phage et le cox B3, le phage reste présent dans le milieu environ 2 fois plus longtemps que le cox B3

Ces résultats suggèrent que le phage de *Bacteroides fragilis* est un bon indicateur de contamination virale dans le PBS, dans l'eau d'adduction et dans l'eau de forage étant donné que sa survie dans ces milieux est au minimum équivalente et jusqu'à 3 fois supérieure à celle du cox B3. Cependant, dans l'eau de forage, son inactivation rapide peut être la source d'une sous-estimation de la contamination du milieu.

Lorsque la persistance du phage de *Bacteroides fragilis* est comparée à celle du génome du cox B3, il apparaît que :

- dans le PBS, la persistance du génome est au moins 3 fois plus importante ($30 \text{ jours} < T_{90} < 47 \text{ jours}$) que celle du phage ($T_{90} = 11 \text{ jours}$) ;

- dans l'eau d'adduction, en présence de $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel, à partir d'un titre initial comparable en phages ($12480 \text{ UFP.mL}^{-1}$) et en cox B3 infectieux ($12700 \text{ UFP.mL}^{-1}$), le génome viral et le phage persistent respectivement pendant une période de 22 à 35 jours et de 18 à 25 jours. Dans ce milieu les 2 paramètres présentent donc des durées de persistance similaires ;

- dans l'eau d'adduction additionnée de thiosulfate, à partir d'un titre initial comparable en phages ($15400 \text{ UFP.mL}^{-1}$) et en cox B3 infectieux ($18356 \text{ UFP.mL}^{-1}$), le génome viral et le phage persistent respectivement pendant une période de 48 à 55 jours et de 20 à 25 jours. Dans ces conditions, le génome viral persiste 2 fois plus longtemps que le phage ;

- dans l'eau d'adduction autoclavée, les concentrations initiales en phages et en cox B3 infectieux diffèrent significativement et dans ces conditions il est impossible de comparer directement les durées de persistance du génome et du virus infectieux. Cependant

nous avons montré que la survie du phage est équivalente dans l'eau autoclavée et dans l'eau additionnée de thiosulfate et qu'il en était de même en ce qui concerne le génome. Dans ces conditions, les conclusions obtenues dans l'eau additionnée de thiosulfate de sodium restent vraies dans l'eau autoclavée ;

- dans l'eau de forage, le génome viral se comporte comme le virus infectieux et donc le phage persiste 2 fois plus longtemps que le génome.

Ces résultats montrent que, mis à part le PBS, la persistance du génome est soit similaire (eau d'adduction), soit inférieure (eau de forage) à celle du phage. Dans ces conditions, la détection du génome viral constitue un indicateur potentiel de contamination virale au même titre que le phage de *Bacteroides fragilis*. Cependant en absence de chlore libre, le génome viral persiste 2 fois plus longtemps que le phage et dans ces conditions, il constitue un indicateur plus drastique que le phage.

VI

*Entérovirus et indicateurs de contamination
virale dans les eaux usées traitées*

En vue d'évaluer l'intérêt de la détection de bactériophages et de génome d'entérovirus en tant qu'indicateurs de contamination virale, une étude est menée à partir d'eaux usées traitées. Ce milieu hydrique est relativement riche en entérovirus et en bactériophages, ce qui devrait permettre de comparer les différents paramètres entre eux, cependant il est susceptible de renfermer des inhibiteurs variés des réactions enzymatiques (matières organiques, matières en suspension ...) qui peuvent interférer avec la détection du génome viral. Les entérovirus infectieux, le génome d'entérovirus, les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 et les coliphages somatiques sont recherchés dans différents types d'eaux usées traitées et sont comparés entre eux en vue de déterminer le ou les meilleurs indicateurs de contamination par des entérovirus.

Le travail est réalisé sur 3 types d'eaux usées urbaines :

⇒ des eaux traitées par voie biologique (décantation primaire, traitement biologique par boues activées, décantation secondaire) avec un temps de séjour dans la station variant selon les conditions atmosphériques de 8 à 12 heures (station de Nancy - eaux secondaires).

⇒ des eaux traitées par voie biologique (décantation primaire, traitement biologique comprenant des phases d'aération et d'anoxie, décantation secondaire) avec un temps de séjour de l'ordre de 30 heures (station d'Epinal - eaux secondaires).

⇒ des eaux secondaires après traitement tertiaire de déphosphatation par précipitation physico-chimique et décantation accélérée (station d'Epinal - eaux tertiaires).

L'analyse est menée d'une part directement à partir des eaux et d'autre part après concentration des micro-organismes et des génomes viraux présents dans les échantillons. Nous envisagerons d'abord les résultats de l'analyse directe puis ceux obtenus après concentration.

VI.1 Analyse directe des eaux usées traitées

La recherche s'effectue directement après décontamination des échantillons d'eaux par filtration sur filtre Milipore de porosité 0,22 μm . Elle est réalisée sur 48 échantillons prélevés du 18 mars au 7 mai 1996.

VI.1.1 Recherche des coliphages somatiques

La recherche de coliphages somatiques est réalisée sur un volume de 4 mL d'eau, et dans ces conditions la limite de détection théorique est de $2,5 \cdot 10^2$ UFP.L⁻¹. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 34. Ils montrent sur un plan général que les coliphages somatiques sont présents en quantité non négligeable (densité moyenne de $1,7 \cdot 10^4$ UFP.L⁻¹) dans les 48 échantillons d'eaux usées traitées analysées. Dans ces conditions, une analyse pratiquée directement sans concentration préalable est parfaitement justifiée.

Ils mettent aussi en évidence des différences au niveau des quantités de coliphages somatiques retrouvés en fonction du type de traitement ou des origines de l'eau.

Ainsi après traitement secondaire, les densités moyennes diffèrent significativement au seuil 5% (test de Mann-Withney) selon que les eaux proviennent de Nancy ou d'Epinal ($41 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹ vs $9,8 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹). Une différence significative existe aussi selon la nature du traitement, ainsi à Epinal après traitement secondaire il est retrouvé en moyenne $9,8 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹ alors qu'après traitement tertiaire, la densité n'est plus en moyenne que de $1,4 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹.

VI.1.2 Recherche de phages de *Bacteroides fragilis*

La recherche des phages de *Bacteroides fragilis* est réalisée sur un volume de 2 mL d'eau et la limite de détection théorique est donc de $5 \cdot 10^2$ UFP.L⁻¹. Les résultats sont rapportés dans le tableau 34. Il apparaît qu'aucun échantillon n'est positif dans les eaux d'Epinal tertiaire et d'Epinal secondaire. Par contre dans les eaux de Nancy secondaire, 37,5% des échantillons sont positifs et la densité moyenne en phages de *Bacteroides fragilis* est comprise entre $5,5 \cdot 10^2$ et $8,4 \cdot 10^2$ UFP.L⁻¹. La borne inférieure de cet intervalle correspond à la densité moyenne calculée en considérant que les échantillons négatifs présentent une concentration virale nulle et la borne supérieure est calculée en considérant que les échantillons négatifs présentent une concentration virale égale au seuil de détection ($5 \cdot 10^2$ UFP.L⁻¹).

Ces résultats mettent clairement en évidence que la densité de phages de *Bacteroides fragilis* dans les eaux usées traitées est faible puisque seulement 12,5% des 48 échantillons sont positifs. En fait dans 87,5% des cas, la densité phagique est inférieure au seuil de détection ($5 \cdot 10^2$ UFP.L⁻¹).

Il apparaît donc que le seuil de détection pour une inoculation directe est trop élevé et que pour augmenter la sensibilité de l'analyse, il est souhaitable d'abaisser ce seuil soit en augmentant le volume de l'inoculum, soit en procédant à une concentration sous un faible volume des bactériophages contenus dans un grand volume d'eau.

Après traitement secondaire, la densité de phages est supérieure dans les eaux de Nancy à celle observée dans les eaux d'Epinal.

En ce qui concerne l'influence des traitements sur la présence de bactériophages de *Bacteroides fragilis*, la faible sensibilité de la méthode de détection ne permet pas de faire d'observation significative.

		Provenance des eaux usées traitées		
		Nancy (secondaire) N=16	Epinal (secondaire) N=16	Epinal (tertiaire) N=16
Coliphages somatiques	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	100	100	100
	Densité moyenne (UFP.L ⁻¹)	$41 \cdot 10^3$	$9,8 \cdot 10^3$	$1,4 \cdot 10^3$
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	37,5	0	0
	Densité moyenne (UFP.L ⁻¹)	de $5,5 \cdot 10^2$ à $8,4 \cdot 10^2$	$< 5 \cdot 10^2$	$< 5 \cdot 10^2$
Entérovirus	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	0	0	0
	Densité moyenne (NPPUC.L ⁻¹)	$< 10^2$	$< 10^2$	$< 10^2$
Génome entéroviral (RT-PCR)	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	43,8	13	0

Tableau 34 : Recherche de coliphages somatiques, de phages de *Bacteroides fragilis*, d'entérovirus et de génome d'entérovirus dans 3 types d'eaux usées traitées. L'analyse est effectuée directement à partir de l'eau sans aucun traitement de concentration préalable.

VI.1.3 Recherche des entérovirus

La recherche des entérovirus est réalisée sur 10 mL de chaque type d'eau et la limite de détection théorique est donc de 10^2 NPPUC.L⁻¹. Les résultats obtenus sont rapportés dans le tableau 34. Aucun entérovirus n'a pu être mis en évidence, le titre viral des échantillons testés est donc toujours inférieur à 10^2 NPPUC.L⁻¹.

La sensibilité de la méthode de détection apparaît trop faible pour pouvoir obtenir des résultats interprétables. Il est donc nécessaire d'abaisser le plus possible le seuil de détection en concentrant sous un faible volume les entérovirus présents dans un grand volume. En effet, il n'est pas possible sur un plan technique d'améliorer la sensibilité en augmentant le volume d'inoculum.

VI.1.4 Recherche des génomes d'entérovirus

La recherche des génomes est effectuée par RT semi-nested PCR sur un volume de 25 μ L, la limite de détection théorique est donc de $4 \cdot 10^4$ génome L⁻¹. Les résultats sont rapportés dans le tableau 34.

Les résultats montrent que dans 81% des cas, soit il n'y a pas de génome entéroviral, soit la quantité présente est inférieure à $4 \cdot 10^4$ génome L⁻¹ qui représente le seuil de détection.

Il semble donc nécessaire, de façon à pouvoir obtenir des résultats significatifs, de diminuer le seuil de détection en procédant à une étape de concentration des génomes à partir d'un grand volume d'échantillons.

Cependant à partir des résultats obtenus, il est d'ores et déjà possible de considérer que le traitement tertiaire appliqué à Epinal permet une élimination du génome viral en dessous du seuil de détection, alors que le traitement secondaire réalisé à Nancy n'y parvient pas dans 43,8% des cas.

VI.1.5 Conclusion

Dans les eaux testées, les coliphages somatiques sont présents en quantité importante et suffisante pour être recherchés par analyse directe. Par contre la densité des phages de *Bacteroides fragilis*, des entérovirus et du génome des entérovirus est trop faible pour que l'analyse puisse être effectuée directement, les seuils de détection étant trop élevés. C'est pourquoi une étape de concentration doit être envisagée.

Cependant il est d'ores et déjà possible de conclure que l'eau usée traitée à la station d'épuration de Nancy (Nancy secondaire) est la plus contaminée en coliphages somatiques,

en phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 et en génomes d'entérovirus, et que le traitement tertiaire appliqué à Epinal permet de diminuer significativement la densité de coliphages somatiques par rapport au traitement secondaire.

VI.2 Analyse globale des eaux usées traitées après concentration

Les phages de *Bacteroides fragilis* sont quantifiés après concentration par filtration de 100 mL d'eau sur membrane inorganique. Les entérovirus et le génome d'entérovirus sont détectés après concentration de 20 litres d'eau sur laine de verre.

La détection des différents paramètres est réalisée sur 32 échantillons d'eaux usées ayant subi un traitement secondaire (16 à Epinal, 16 à Nancy) et 16 échantillons d'eaux usées soumis à un traitement tertiaire (Epinal).

Le tableau 35 rapporte les pourcentages d'échantillons positifs et les densités moyennes en phages et en entérovirus après concentration des eaux.

		Provenance des eaux usées traitées		
		Nancy (secondaire) N=16	Epinal (secondaire) N=16	Epinal (tertiaire) N=16
Phages de <i>Bacteroides fragilis</i>	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	100	44	6
	Densité moyenne (UFP.L ⁻¹)	1,3 10 ³	de 17 à 24	de 0,8 à 13
Entérovirus	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	31,3	0	0
	Densité moyenne (NPPUC.L ⁻¹)	de 3,5 à 4,5	< 1	< 1
Génome entéroviral	Pourcentage d'échantillons positifs (%)	100	56	19

Tableau 35 : Recherche de phages de *Bacteroides fragilis*, d'entérovirus et de génome d'entérovirus dans 3 types d'eaux usées traitées. L'analyse est effectuée après concentration de 100 mL d'eau pour la détection de phages et de 20 L d'eau pour la détection d'entérovirus et des génomes d'entérovirus.

Les résultats montrent que pour les eaux de Nancy secondaire, Epinal secondaire et Epinal tertiaire, les pourcentages d'échantillons positifs sont respectivement de 100%, 44% et 6% pour les phages, de 31%, 0% et 0% pour les entérovirus et enfin de 100%, 56% et 19% pour les génomes d'entérovirus.

Une analyse statistique (test du χ^2) montre que, quel que soit le paramètre recherché, il y a une différence significative au seuil 5% entre les résultats obtenus avant et après concentration. Une étape de concentration des eaux usées traitées augmente donc le sensibilité de détection des entérovirus, du génome des entérovirus et des phages de *Bacteroides fragilis*.

VI.3 Analyse des eaux de Nancy secondaire

L'analyse a été effectuée à partir de 16 échantillons prélevés du 10 avril au 7 mai 1996.

Les coliphages somatiques sont recherchés directement sur l'échantillon alors que les phages de *Bacteroides fragilis*, les entérovirus et les génomes d'entérovirus sont recherchés après concentration.

VI.3.1 Résultats

Les résultats obtenus concernant la détection des entérovirus et des trois indicateurs potentiels sont rapportés sur la figure 19.

Les coliphages sont présents dans 100% des échantillons analysés à des concentrations variant de $1,1 \cdot 10^4$ à $9,7 \cdot 10^4$ UFP.L⁻¹. Les résultats font apparaître que dans les dix premiers prélèvements (10 avril - 19 avril) la moyenne des concentrations en coliphages somatiques est de $1,89 \cdot 10^4$ UFP.L⁻¹, alors que dans les 6 derniers (2 mai - 7 mai) elle est de $7,88 \cdot 10^4$ UFP.L⁻¹. La différence significative au seuil de 5% (test de Mann-Withney) entre ces deux séries de prélèvements traduit une augmentation d'un facteur 4 de la teneur en coliphages somatiques.

Les phages de *Bacteroides fragilis* sont retrouvés dans 100% des échantillons à des concentrations variant de $1,3 \cdot 10^1$ à $5,1 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹. De la même manière que pour les coliphages mais de façon beaucoup plus nette, il est possible d'observer une augmentation de la contamination en phages entre les prélèvements effectués entre le 10 et le 19 avril et ceux effectués entre le 2 et le 7 mai. La moyenne des concentrations est de $3,5 \cdot 10^1$ UFP.L⁻¹ entre le 10 et le 19 avril alors qu'elle est de $3,4 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹ entre le 2 et le 7 mai. La différence significative au seuil 5% (test de Mann-Withney) entre ces deux séries traduit une augmentation d'un facteur 97 des phages de *Bacteroides fragilis*.

Il est à noter que les eaux prélevées entre le 2 et le 7 mai ont permis la détection de phages de *Bacteroides fragilis* dans 100% des cas sans étape de concentration, alors que celles prélevées entre le 10 et le 19 avril se sont révélées négatives dans tous les cas.

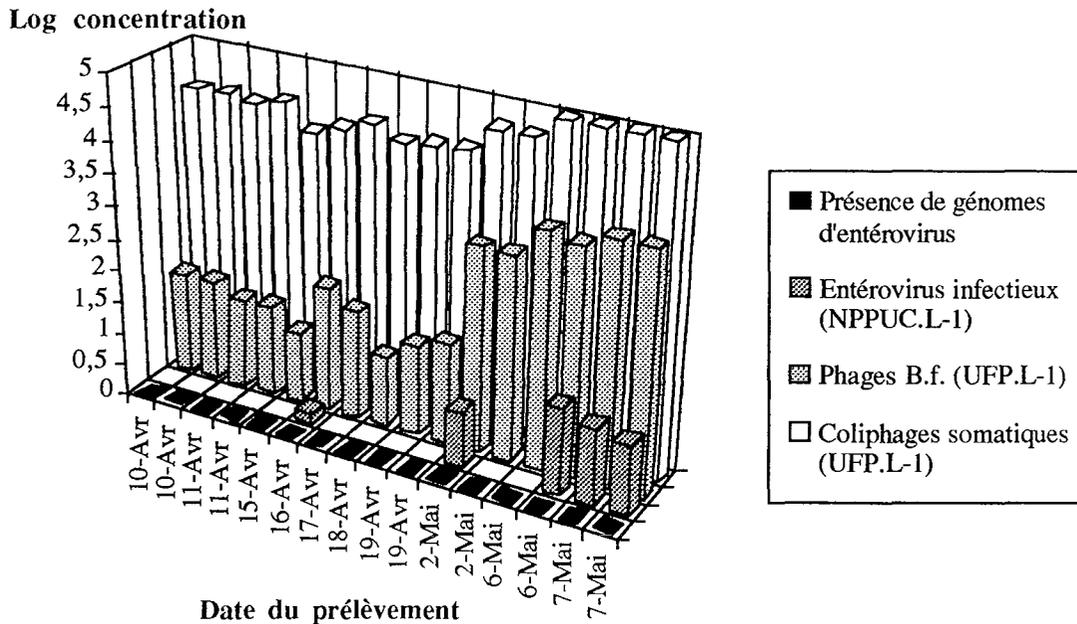


Figure 19 : Densité de coliphages somatiques, de phages de *Bacteroides fragilis* (B.f.), d'entérovirus et présence de génome d'entérovirus dans les eaux usées traitées de Nancy.

Les entérovirus infectieux mis en évidence sur culture cellulaire sont isolés dans 31% des échantillons à des densités variant de 1,5 à 22,5 NPPUC.L⁻¹ ce qui correspond à une concentration moyenne comprise entre 3,5 et 4,5 NPPUC.L⁻¹ (les bornes de cet intervalle sont calculées de la même manière que pour les phages de *Bacteroides fragilis* VI.1.2). En dissociant les deux séries de prélèvements comme précédemment, il apparaît qu'entre le 10 et le 19 avril le pourcentage d'échantillons positifs est de 10% (un seul échantillon positif renfermant 1,5 NPPUC L⁻¹), avec une densité moyenne comprise entre 0,15 et 1 NPPUC.L⁻¹ et qu'entre le 2 et le 7 mai le pourcentage est de 67% avec une densité moyenne comprise entre 9,5 et 10 NPPUC.L⁻¹. La différence entre ces deux séries de prélèvements traduit une augmentation d'un facteur compris entre 10 et 63 en entérovirus.

En ce qui concerne le génome viral, il est présent dans 100% des échantillons (détection par RT semi-nested PCR).

VI.3.2 Conclusion

Dans les eaux usées traitées de la station de Nancy, les bactériophages (*Bacteroides fragilis*, *E. coli*) et le génome d'entérovirus sont présents dans tous les échantillons analysés qu'il y ait ou non isolement de virus infectieux.

Si on envisage les résultats en considérant deux séries de prélèvements (première série du 10 au 19 avril ; deuxième série du 2 au 7 mai), il faut noter qu'entre ces deux séries, les entérovirus augmentent d'un facteur compris entre 10 et 63, les coliphages d'un facteur 4 et les phages de *Bacteroides fragilis* d'un facteur 97. De plus, le rapport coliphages sur phages de *Bacteroides fragilis* est de 540 pour la première série et seulement de 23 pour la deuxième série.

Ceci tiendrait à montrer que lorsque les entérovirus sont présents avec une fréquence et à des taux relativement élevés, le rapport coliphages somatiques sur phages de *Bacteroides fragilis* est peu élevé (23 versus 540).

En fait, il semble que parmi les indicateurs potentiels de contamination virale, le seul dont les variations témoignent de celles des entérovirus est représenté par les phages de *Bacteroides fragilis*.

VI.4 Analyse des eaux d'Epinal secondaire

L'analyse a été réalisée sur 16 échantillons dans les mêmes conditions que celles utilisées pour les eaux de Nancy.

VI.4.1 Résultats

Les résultats sont représentés sur la figure 20. Les coliphages sont présents dans 100% des échantillons à des densités variant de $0,65 \cdot 10^4$ à $1,65 \cdot 10^4$ UFP.L⁻¹ avec une concentration moyenne de $9,8 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹. Les phages de *Bacteroides fragilis* sont présents dans 44% des cas à des densités variant de $1,7 \cdot 10^1$ à $6,7 \cdot 10^1$ UFP.L⁻¹ et une densité moyenne comprise entre 17 et 24 UFP.L⁻¹. Par contre, aucun entérovirus n'a pu être mis en évidence alors que le génome d'entérovirus est présent dans 56% des 16 échantillons.

L'étude statistique permet de montrer qu'il n'y a pas de différence significative au seuil 5% entre le nombre d'échantillons positifs en phages de *Bacteroides fragilis* et celui en génome (test du χ^2).

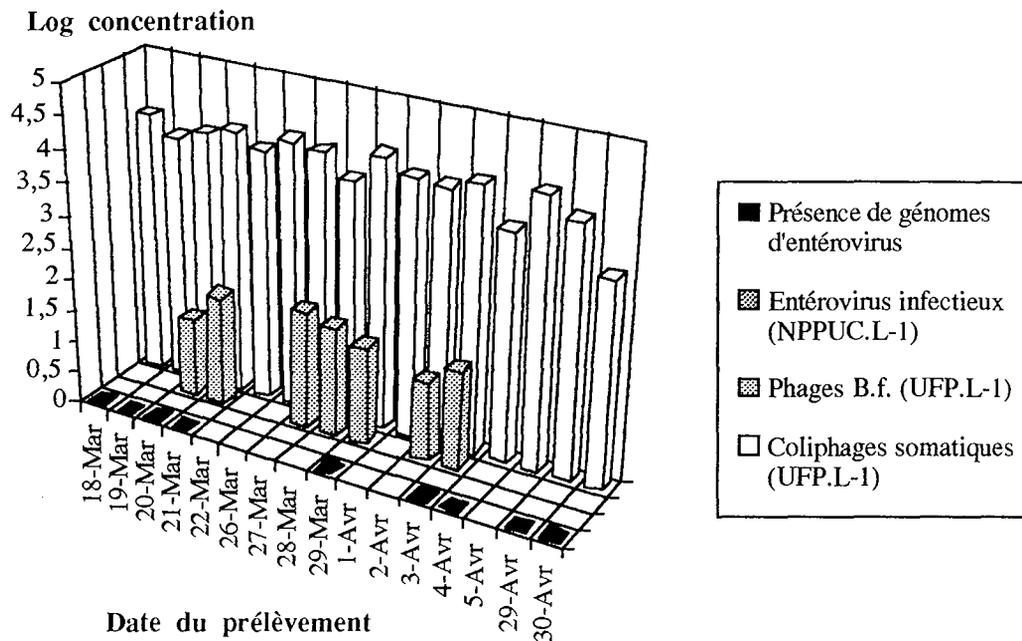


Figure 20 : Densité de coliphages somatiques, de phages de *Bacteroides fragilis* (B.f.), d'entérovirus et détection des génomes d'entérovirus dans les eaux d'Epinal secondaire.

VI.4.2 Conclusion

Le niveau de contamination des eaux d'Epinal secondaire est plus faible que celui de Nancy. En effet, si les coliphages sont présents dans 100% des cas, les phages de *Bacteroides fragilis* ne sont retrouvés que dans 44% des cas au lieu de 100% à Nancy, le génome d'entérovirus dans 56% des cas au lieu de 100% à Nancy et aucun entérovirus infectieux n'a été isolé.

Par ailleurs, si la densité moyenne des coliphages somatiques varie peu entre Nancy et Epinal (facteur 4), celle des phages de *Bacteroides fragilis* est nettement plus faible dans les eaux d'Epinal par rapport à celle de Nancy (facteur 76).

Enfin le rapport entre coliphages somatiques et phages de *Bacteroides fragilis* est élevé puisqu'il est compris entre 408 et 576.

Sur un plan global il n'y a pas de différence significative au seuil 5% (test du χ^2) entre la présence de phages de *Bacteroides fragilis* et celle de génome d'entérovirus. Cependant l'analyse plus détaillée permet d'observer que si 4 échantillons sont à la fois positifs en génome et en phage, 5 renferment du génome entéroviral mais pas de phage et 3 ne contiennent pas de génome mais sont positifs en phage.

Ceci montre que dans 8 cas sur 12, il y a discordance entre présence de génome entéroviral et présence de phage de *Bacteroides fragilis*.

Cependant il faut aussi remarquer qu'aucun entérovirus infectieux n'a été isolé dans ces échantillons et que la densité de phage est faible, qu'il y ait ou non présence de génome.

VI.5 Analyse des eaux d'Epinal tertiaire

L'analyse est réalisée à partir de 16 échantillons dans les mêmes conditions que pour les eaux secondaires.

VI.5.1 Résultats

Les résultats sont représentés sur la figure 21.

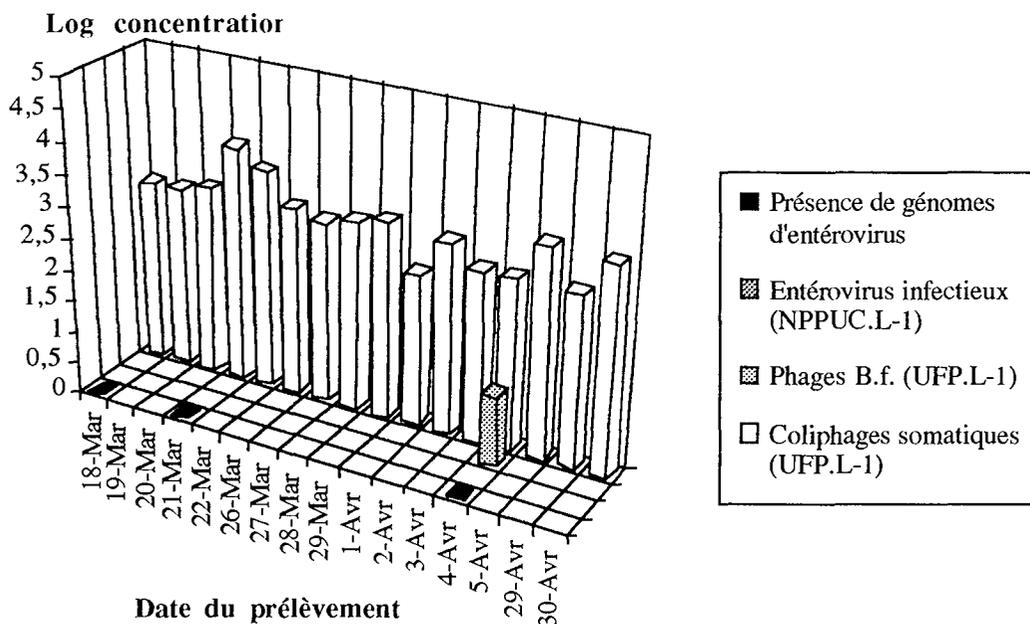


Figure 21 : Densité de coliphages somatiques, de phages de *Bacteroides fragilis* (B.f.), d'entérovirus et détection des génomes d'entérovirus dans les eaux d'Epinal tertiaire.

Les coliphages sont présents dans 100% des échantillons analysés à des concentrations variant de $2,5 \cdot 10^2$ à $5,5 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹, la concentration moyenne étant de $1,4 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹. Les phages de *Bacteroides fragilis* sont présents dans un seul échantillon à une

densité de 13 UFP.L⁻¹, ce qui permet de déterminer une densité moyenne comprise entre 0,8 et 12 UFP.L⁻¹. Aucun entérovirus n'a pu être mis en évidence alors que le génome d'entérovirus est détecté dans 19% des échantillons.

Le faible nombre d'échantillons positifs en phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 et en génomes d'entérovirus ne permet pas une comparaison statistique des différents paramètres.

VI.5.2 Conclusion

A la lecture des résultats plusieurs observations peuvent être faites.

Les coliphages somatiques sont présents dans tous les échantillons mais à une densité inférieure à celle observée dans les eaux secondaires (1,4 10³ vs 9,8 10³ UFP.L⁻¹).

Les phages de *Bacteroides fragilis* ont pratiquement disparu à l'issue du traitement tertiaire puisque seulement 1 échantillon sur 16 en contient et à une densité proche du seuil de détection (13 UFP.L⁻¹).

Il y a une réduction importante du nombre d'échantillons contenant des génomes viraux par rapport aux eaux secondaires (9/16 Epinal secondaire versus 3/16 Epinal tertiaire).

Enfin, la faible présence de génome semble être corrélée avec une faible présence de phage de *Bacteroides fragilis*.

VI.6 Discussion

L'analyse des eaux usées a permis de montrer que les entérovirus infectieux, leurs génomes et les phages de *Bacteroides fragilis* sont en quantité trop faible pour être détectés directement, alors que la densité des coliphages somatiques est suffisamment élevée pour permettre leur mise en évidence directe. Il apparaît donc qu'une analyse directe de l'eau n'apporte que très peu d'informations sur la contamination virale dans les eaux étudiées.

Une étape de concentration doit donc être envisagée dans les eaux usées traitées pour rechercher les entérovirus, leurs génomes et les phages de *Bacteroides fragilis*.

Après concentration, les résultats font apparaître des différences de qualité entre les 3 types d'eaux étudiés.

En ce qui concerne les eaux usées ayant subi un traitement secondaire, les eaux de Nancy présentent des densités en entérovirus, génomes d'entérovirus, coliphages somatiques et phages *Bacteroides fragilis* supérieures aux eaux d'Epinal secondaire.

Ce phénomène peut s'expliquer d'une part par le temps de séjour plus élevé dans la station d'Epinal que dans celle de Nancy (30 heures versus 8 à 12 heures), et d'autre part par la différence du traitement biologique. En effet, la station d'Epinal traite à la fois les pollutions

carbonées et azotées (alternance phase aérée / phase anoxie), alors que celle de Nancy ne s'intéresse qu'à la pollution carbonée (phase aérée).

En ce qui concerne les eaux ayant subi un traitement tertiaire (déphosphatation), il apparaît que celui-ci permet d'obtenir un abattement d'un facteur 7 en coliphages somatiques et d'un facteur compris entre 2 et 30 en phages de *Bacteroides fragilis* par rapport aux eaux secondaires. En comptabilisant le nombre d'échantillons positifs, ce traitement permet à partir d'une eau secondaire, dont 7 échantillons sur 16 contiennent des phages et 9 des génomes d'entérovirus, d'obtenir une eau dont le nombre de positifs n'est plus que de 1 pour les phages et de 3 pour les génomes, soit un abattement de 7 pour les phages et de 3 pour les génomes.

Il apparaît au niveau des eaux prélevées à Nancy, des différences importantes de contamination en fonction des dates de prélèvement. En fait il ressort clairement que, au cours d'une première période, la pollution virale est relativement faible avec notamment un échantillon sur 16 contenant des entérovirus infectieux alors que lors d'une deuxième période le niveau est beaucoup plus élevé puisque 4 échantillons sur 6 renferment des entérovirus infectieux, soit une augmentation d'un facteur compris entre 10 et 63.

Une première explication peut être fournie par les données pluviométriques. En effet, les prélèvements réalisés au cours de la première période le sont en période de sécheresse (seulement 1mm le 10 avril) avec un débit moyen entrant à la station d'environ 69 000 m³.j⁻¹. Lors de la deuxième période, la pluviométrie est plus importante. Ainsi le 2 mai, elle est de 5,2 mm et la quantité d'eau admise de la station est de 92 000 m³.j⁻¹. Ceci se traduit par une baisse du temps de séjour et pourrait expliquer l'augmentation des différents paramètres en sortie de station. Cependant, la baisse de la qualité de l'eau semble persister dans le temps puisque les prélèvements réalisés le 6 et le 7 mai présentent des densités importantes en entérovirus, phages *Bacteroides fragilis* et coliphages somatiques, alors qu'aucune pluviométrie n'est observée à ces dates. En fait, il apparaît que le 2 mai au matin, la station de traitement des eaux potables a procédé à une vidange des décanteurs. Cette vidange prévue pour être espacée dans le temps, a été réalisée en une seule fois. Cette libération massive de boues s'est traduite non seulement par une valeur en MES très importante de 370 mg.L⁻¹ à l'entrée de la station (moyenne du mois d'avril 147 mg.L⁻¹), mais surtout par une déstabilisation de la flore bactérienne du traitement biologique. L'équilibre n'a été rétabli qu'après le 15 mai. Le rendement de la décantation secondaire a fortement baissé durant cette période et par voie de conséquence, la qualité de l'eau rejetée était médiocre.

Cette baisse de la qualité est mise en évidence à la station par des paramètres telles que les MES totales, la DBO₅ et la DCO qui sont en moyenne respectivement de 12,5 mg.L⁻¹, 19,6 mg.L⁻¹ et 67 mg.L⁻¹ lors de la première période et de 22 mg.L⁻¹, 24 mg.L⁻¹ et 83 mg.L⁻¹ lors de la deuxième période.

Les paramètres mesurés dans cette étude mettent en évidence ce défaut de traitement de manière bien plus spectaculaire. En effet, entre les deux séries de prélèvements, les entérovirus augmentent d'un facteur compris entre 10 et 63 et les phages de *Bacteroides fragilis* d'un facteur 97. L'augmentation en coliphages somatiques est par contre beaucoup moins importante (facteur 4).

Sur un plan global, cette étude permet d'évaluer l'intérêt de chacun des paramètres d'une part en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement et d'autre part en tant qu'indicateur de présence d'entérovirus.

Les coliphages somatiques présentent l'avantage de pouvoir être détectés dans toutes les eaux testées quel que soit le niveau de contamination en entérovirus, cet indicateur permet d'évaluer globalement la qualité du traitement des eaux usées. En effet, plus le niveau de traitement des eaux usées augmente (Nancy secondaire - Epinal secondaire - Epinal tertiaire), plus la concentration des coliphages diminue ($4,1 \cdot 10^4$ - $9,8 \cdot 10^3$ - $1,4 \cdot 10^3$ UFP.L⁻¹). La concentration demeure non négligeable même dans les eaux usées traitées de relative « bonne qualité » (satisfaisant les normes européennes).

Cependant, les coliphages somatiques ne peuvent être proposés en tant qu'indicateur de présence d'entérovirus infectieux. En effet, la corrélation entre ces deux paramètres est discutable. Ainsi, entre les deux séries de prélèvements effectuées sur le site de Nancy, il est constaté une augmentation de la densité en entérovirus d'un facteur compris entre 10 et 63, alors que les coliphages somatiques n'augmentent que d'un facteur 4.

Les phages de *Bacteroides fragilis* permettent aussi d'évaluer la qualité du traitement, mais leurs faibles concentrations dans les eaux testées ne permettent pas de se baser sur des densités mais plutôt sur des fréquences de détection. Cet inconvénient pourrait être pallié par la mise au point de techniques de concentration permettant de concentrer de plus grands volumes d'eaux.

Il apparaît que lorsque la qualité du traitement augmente entre Nancy, Epinal secondaire et Epinal tertiaire, le pourcentage de détection en phages de *Bacteroides fragilis* diminue respectivement de 100% à 44% et 6%.

L'utilisation des phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement semble possible mais devrait être optimisée notamment par la mise au point de nouvelles techniques de concentration plus performantes.

En tant qu'indicateur de contamination en entérovirus, son utilisation peut par contre être préconisée. En effet, l'augmentation de la concentration en entérovirus d'un facteur compris entre 10 et 63 observée entre les deux campagnes de prélèvements effectuées à Nancy se traduit par une augmentation d'un facteur 97 de la densité en phages de *Bacteroides fragilis*. La corrélation entre les deux paramètres est donc possible en tenant compte du fait qu'aucun

entérovirus n'a pu être détecté en l'absence de phage. De plus, les entérovirus ne sont détectés que dans des eaux présentant 100% d'échantillons positifs en phages.

Le génome d'entérovirus doit être utilisé en terme de fréquence de détection dans les eaux, non pas pour un problème de faible densité mais parce que la technique de détection est uniquement qualitative. Ce paramètre peut apporter lui aussi des informations en tant qu'indicateur d'efficacité de traitement. En effet, lorsque le traitement des eaux usées traitées augmente de Nancy à Epinal secondaire et Epinal tertiaire, les pourcentages de détection du génome sont respectivement de 100%, 56% et de 19%.

L'utilisation de la présence de génome d'entérovirus en tant qu'indicateur de contamination virale est donc tout à fait prometteuse. Les résultats obtenus démontrent une faible inhibition des réactions enzymatiques mises en jeu pour la détection du génome dans les conditions expérimentales, et tous les échantillons positifs en entérovirus infectieux sont aussi positifs en génome viral. Il est à noter que les pourcentages de détection des phages de *Bacteroides fragilis* et ceux du génome d'entérovirus sont tout à fait comparables, mais présentent des discordances entre les échantillons. Les entérovirus ne sont détectés que dans des eaux présentant 100% d'échantillons positifs en génome.

En conclusion, les résultats de cette étude montrent que les phages de *Bacteroides fragilis* HSP40 ainsi que les génomes d'entérovirus constituent des marqueurs intéressants pour évaluer la contamination en entérovirus des eaux usées traitées. Ils doivent cependant être validés pour d'autres types d'eaux, en particulier des eaux de surface et des eaux de mer.

Conclusion

La mise au point de nouvelles méthodologies rapides et très sensibles de détection des acides nucléiques a ouvert de nouvelles perspectives en ce qui concerne la virologie du milieu hydrique. Depuis les années 1990, la RT-PCR est de plus en plus utilisée pour la détection de génome viral dans les eaux, mais de nombreuses questions se posent encore sur la validité de cette technique appliquée à l'environnement. Ainsi, certains auteurs se sont interrogés sur la représentativité d'une analyse d'eau par RT-PCR, compte tenu du faible volume testé (5 à 100 μ L). De plus sur le plan technique, la RT-PCR est fondée sur des réactions enzymatiques qui sont susceptibles d'être inhibées par de nombreuses substances, dont certaines sont souvent présentes dans le milieu hydrique (acides humiques, matières en suspension ...). Par ailleurs, il y a peu de données concernant le comportement du génome viral dans l'environnement, en particulier par rapport au virus infectieux. Enfin une question a fait l'objet de nombreux débats et n'est pour l'instant pas résolue, elle concerne l'interprétation d'une réaction de « RT-PCR positive » dans un échantillon d'eau. Cette présence de génome ou de fragment de génome dans l'eau témoigne-t-elle de la présence de virus infectieux ou bien doit-elle être considérée seulement comme un témoin d'une contamination virale plus ou moins récente ?

Partant de ces constatations et de cette interrogation, notre travail de thèse est consacré à l'étude du devenir du génome entéroviral dans le milieu hydrique.

Au cours d'une première partie, nous avons d'abord travaillé dans des milieux hydriques parfaitement connus, stériles et exempts de matières en suspension (MES), de façon à étudier sur un plan fondamental le devenir du matériel viral, en s'affranchissant de tous les paramètres environnementaux mal maîtrisés. Ces milieux sont constitués, soit d'eau désionisée, soit d'une solution tamponnée (PBS). Puis, l'étude est poursuivie en eaux d'adduction et dans une eau de forage, mais exemptes de MES et de micro-organismes, de façon à déterminer uniquement l'influence des substances dissoutes.

Tous ces milieux ont été artificiellement contaminés avec du virus coxsackie B3 (cox B3) et dans la plupart des cas avec du phage de *Bacteroides fragilis*. Nous avons ainsi étudié le comportement du génome par rapport, d'une part à celui du virus infectieux, et d'autre part à un indicateur potentiel de contamination virale représenté par le bactériophage de *Bacteroides fragilis*.

Cette étude a d'abord nécessité un travail méthodologique préliminaire qui a permis de fixer les conditions précises de réalisation de la RT semi-nested PCR, en particulier, au niveau des amorces qui ont été choisies dans la région 5'NC du génome, ce qui permet la mise en évidence du génome de tous les entérovirus à l'exception du virus Echo 22. Il a été montré que cette méthodologie présentait une sensibilité, à volume égal, 100 fois supérieure à celle de la

culture cellulaire. Enfin, cette étude méthodologique a permis de proposer une démarche statistique pour estimer le coefficient d'inactivation du génome viral.

L'étude proprement dite consiste à étudier dans une première phase le devenir du cox B3 et de son génome en fonction de la chaleur, et dans une deuxième phase la persistance du génome, du virus infectieux et du bactériophage de *Bacteroides fragilis* dans différents types d'eaux.

En fonction de la température, le comportement du cox B3 infectieux et de son génome apparaissent très différents. En effet, le virus infectieux est totalement inactivé après incubation à 55°C pendant 15 min., alors que pour dégrader la totalité du génome viral, une incubation à 95°C pendant 30 min. est nécessaire. Le comportement du génome est identique que celui-ci soit encapsidé ou non.

Ces résultats suggèrent que l'incubation à des températures supérieures à 55°C, provoquent des clivages ou des changements de conformation de la capside virale, se traduisant par une inactivation rapide du virus. Le génome peut lui aussi subir des changements de conformation, mais la dégradation de la séquence nucléotidique est plus lente, et la détection du génome par RT semi-nested PCR reste possible après incubation à des températures de 95°C. Il apparaît donc clairement qu'après traitement à des températures supérieures à 55°C, la détection de génome ne peut pas témoigner de la présence de virus infectieux.

A la suite de ces observations, il a été décidé d'étudier le comportement du génome viral, du cox B3 infectieux et du phage de *Bacteroides fragilis* en fonction du temps, à 25°C, dans différents milieux.

En milieu PBS, la persistance du génome viral ($30 < T_{90} < 47$ jours) est au moins deux fois supérieure à celle du virus infectieux ($T_{90} = 14,5$ jours) et à celle du phage de *Bacteroides fragilis* ($T_{90} = 11,0$ jours). Cette persistance n'est pas influencée par l'addition de produits du métabolisme de *Pseudomonas fluorescens*, par contre, la présence de MES (Nanmontmorillonite) augmente la durée de persistance du génome d'un facteur 2, alors qu'elle ne modifie que très peu celle du virus infectieux. Il est donc clair que, en milieu stérile parfaitement équilibré, le génome persiste plus longtemps que le virus infectieux et que cette persistance est nettement augmentée en présence de MES. Dans ce type de milieu, le génome ne peut donc en aucun cas être considéré comme un témoin de la présence de virus infectieux. Nous montrons parallèlement que le génome entéroviral est plus résistant que le phage de *Bacteroides fragilis*, considéré comme indicateur potentiel de contamination virale, puisqu'il survit au moins trois fois plus longtemps.

En milieu naturel, représenté par de l'eau de forage et de l'eau d'adduction, les résultats sont extrêmement différents.

En eau de forage, la persistance plus courte que dans le PBS est identique pour le génome ($2 < T_{90} < 5$ jours) et pour le virus infectieux ($T_{90} = 3,6$ jours). En ce qui concerne le phage de *Bacteroides fragilis*, celui-ci subit d'emblée une inactivation brutale (environ 1,5 log), mais la population restante présente une survie équivalente à celle observée dans le PBS ($T_{90} = 11,6$ jours). Il n'en demeure pas moins que, sur un plan global et à partir d'un titre viral équivalent, la durée de persistance du phage est supérieure d'environ un facteur 2 à celle du cox B3 et de son génome.

Dans ce type de milieu, la présence de génome peut donc témoigner de la présence de virus infectieux, alors que le phage de *Bacteroides fragilis* se comporte en bon indicateur puisqu'il survit plus longtemps que le virus pathogène.

En eau d'adduction contenant $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel, il apparaît que le génome viral persiste au moins 2 fois plus longtemps que le virus infectieux, et la probabilité de détecter du virus infectieux dans le dernier échantillon positif en génome est inférieure à 10^{-5} . Le phage de *Bacteroides fragilis* présente une durée de persistance supérieure à celle du cox B3 infectieux (facteur 2), mais comparable à celle du génome.

Dans cette même eau d'adduction, si le chlore résiduel est neutralisé, les observations diffèrent selon le mode d'élimination de ce chlore.

Si cette opération est réalisée par addition de thiosulfate de sodium, on constate par rapport à l'eau contenant $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ de chlore résiduel, une augmentation d'environ un facteur 2 de la persistance du génome et du virus infectieux, alors que le comportement du phage de *Bacteroides fragilis* reste identique. Dans ces conditions, la probabilité de détecter du virus infectieux dans le dernier échantillon positif en génome est faible et demeure inférieure à 10^{-5} , quant au phage sa durée de persistance est supérieure à celle du virus pathogène (facteur 1,5), mais est inférieure à celle du génome (facteur 2).

Si le chlore est éliminé par autoclavage, il est observé par rapport à l'eau présentant un résiduel de chlore, une augmentation de la durée de persistance du génome d'un facteur 2 et une augmentation significative mais plus faible qu'en présence de thiosulfate de sodium de la survie du virus infectieux. Le phage de *Bacteroides fragilis* présente par contre un comportement strictement identique à celui décrit dans l'eau chlorée.

Ces différents résultats montrent clairement, que le chlore résiduel même à faible dose, a une action inactivante sur le virus infectieux et destructrice sur le génome viral. Par contre, la dose de chlore résiduel présente ($0,08 \text{ mg.L}^{-1}$) n'a aucune action sur le phage de *Bacteroides fragilis*.

Cependant dans l'eau autoclavée, une inactivation partielle portant uniquement sur le virus infectieux est observée et cette inactivation ne peut pas être imputée au chlore résiduel. Parmi les hypothèses envisagées, la plus crédible semble être représentée par le fait que la faible teneur en sels dans l'eau d'adduction autoclavée provoque une fragilisation du virus par des changements de conformation de la capsid virale. Ce phénomène a d'ailleurs déjà été observé par Gromeier et Wetz (1990) et Wetz et Kucinski (1991). Ces auteurs décrivent la transformation de poliovirus 1 infectieux (c.s : 156 S) en particules inactivées (c.s : 80 S) en milieu hypotonique à 37°C, et ils montrent qu'un simple ajout de 2 mM de CaCl₂ dans le milieu permet de stabiliser une forme intermédiaire (c.s : 135 S) qui reste infectieuse. Dans nos conditions expérimentales, le thiosulfate de sodium pourrait avoir la même action que le CaCl₂, et expliquer les discordances observées en fonction du mode d'élimination du chlore.

Sur le plan indicateur de contamination virale, ces résultats permettent de conclure que :

- dans une eau d'adduction contenant un faible résiduel de chlore (0,08 mg.L⁻¹), le génome viral quoique ne pouvant pas témoigner de la présence de virus infectieux, peut constituer un bon indicateur de contamination. Il présente en particulier la capacité de réagir dans le même sens que le virus infectieux à l'action du chlore, ce qui n'est pas le cas du phage de *Bacteroides fragilis* qui est insensible à ces faibles doses ;

- dans l'eau d'adduction sans chlore résiduel, le génome ne témoigne pas de la présence de virus infectieux et présente une durée de survie supérieure à celle du phage. Dans ces conditions, la détection de génome doit être considérée comme un indicateur plus drastique que le phage de *Bacteroides fragilis*.

La deuxième partie de cette étude est réalisée en milieux strictement naturels constitués par des eaux usées traitées de différentes qualités, et consiste à rechercher trois indicateurs potentiels de contamination virale (génomés d'entérovirus, phages de *Bacteroides fragilis* et coliphages somatiques) en même temps que les entérovirus infectieux.

Dans un premier temps, il a été déterminé si l'analyse par RT semi-nested PCR devait être réalisée directement sur l'eau ou à partir de concentrats viraux.

Pour ce faire, en partant de 25 échantillons d'eaux usées de la station de Nancy, le génome des entérovirus a été recherché simultanément à partir d'échantillons d'eau, de concentrats primaires obtenus d'une part sur poudre de verre (PDV) et d'autre part sur laine de verre (LDV) et enfin de concentrats secondaires obtenus par floculation organique.

Les résultats montrent que, aucun génome d'entérovirus n'a pu être détecté directement dans les eaux usées traitées, et donc qu'une étape de concentration est nécessaire.

Au contraire, des génomes ont été retrouvés respectivement dans 48% et 56% des concentrats primaires LDV et PDV.

Après concentration secondaire, le pourcentage de réponses positives est de 72% à partir des concentrats PDV et de 20% à partir des concentrats LDV. Mais des phénomènes de toxicité sur les cultures cellulaires sont dans ce cas observés, et peuvent être la source d'une sous-estimation de la concentration en entérovirus infectieux des eaux traitées.

Nous avons donc considéré que la concentration primaire était plus adaptée à nos conditions expérimentales, et avons choisi le support LDV, compte tenu que ce support est préconisé dans la norme AFNOR XTP 90-451 et que, les résultats obtenus en concentration primaire ne diffèrent pas significativement de ceux obtenus avec la PDV.

Les entérovirus infectieux et les différents indicateurs ont été recherchés dans des eaux usées ayant subi un traitement secondaire avec un temps de séjour de 8 à 12 heures (Nancy secondaire), dans des eaux ayant subi un traitement secondaire avec un temps de séjour de 30 heures (Epinal secondaire), et dans des eaux ayant subi un traitement tertiaire (déphosphatation) (Epinal tertiaire).

Dans les eaux de Nancy secondaire, 100% des échantillons sont positifs en génome d'entérovirus, alors que seulement 31% le sont en entérovirus infectieux, avec une concentration moyenne comprise entre 3,5 et 4,5 NPPUC.L⁻¹. Les coliphages somatiques et les phages de *Bacteroides fragilis* sont présents dans 100% des échantillons à des concentrations moyennes respectivement de 41.10³ et 1,3.10³ UFP.L⁻¹.

L'analyse plus détaillée des résultats nous a conduit à séparer la campagne de 16 prélèvements en 2 séries distinctes, l'une correspondant aux 10 premiers prélèvements, et l'autre aux 6 derniers. Entre ces deux séries, il est observé une augmentation de la concentration moyenne en entérovirus d'un facteur compris entre 10 et 63. Cette augmentation coïncide avec un défaut du traitement d'épuration dû à la déstabilisation de la flore bactérienne du traitement biologique qui a provoqué un mauvais rendement de la décantation secondaire.

Il faut signaler que ce défaut de traitement n'est pas mis en évidence par la détection de génome entéroviral, puisque dans les 2 séries, 100% des échantillons sont positifs. Par contre, il l'est par les coliphages somatiques et les phages de *Bacteroides fragilis* dont la concentration moyenne augmente respectivement d'un facteur 4 et 97.

Dans les eaux d'Epinal secondaire, le génome d'entérovirus est présent dans 56% des échantillons, alors qu'aucun entérovirus infectieux n'a pu être isolé. Les phages de *Bacteroides fragilis* et les coliphages somatiques sont détectés respectivement dans 44% et 100% des échantillons.

Enfin dans les eaux d'Epinal tertiaire, le génome d'entérovirus est présent dans seulement 19% des échantillons, alors qu'aucun entérovirus n'est détecté. Les phages de *Bacteroides fragilis* et les coliphages somatiques sont détectés respectivement dans 6% et 100% des échantillons.

L'analyse globale des résultats montre que la détection de génome ne permet pas de témoigner de la présence de virus infectieux et n'est qu'un indicateur de contamination virale. Dans ces conditions, l'intérêt de chacun des paramètres recherchés en terme d'indicateur de contamination virale peut être évalué.

Les coliphages somatiques sont retrouvés systématiquement dans tous les échantillons, par contre leur densité diminue au fur et à mesure que l'intensité du traitement augmente. Leur simple détection ne peut donc être considérée comme un témoignage spécifique de contamination virale et en particulier la concentration en coliphages somatiques ne reflète pas les fluctuations de la concentration en entérovirus infectieux. Par contre, leur quantification peut être utile pour juger d'un niveau ou de la qualité d'un traitement.

En ce qui concerne les phages de *Bacteroides fragilis*, ils ne sont pas retrouvés dans tous les échantillons et leur pourcentage de détection diminue parallèlement à la qualité des traitements appliqués aux eaux usées. Ils sont présents, lorsque des entérovirus infectieux sont détectés, et ils reflètent parfaitement les fluctuations de la concentration en entérovirus.

Il est possible de considérer que dans les eaux usées épurées, ils constituent un bon indicateur de contamination virale.

Enfin, pour ce qui est du génome, il n'est pas retrouvé dans tous les échantillons et leur pourcentage de détection diminue lorsque les traitements d'épuration augmentent. Il est présent lorsque des entérovirus sont détectés et il peut donc être considéré comme un bon indicateur de contamination par des entérovirus. Cependant la détection de génome présente l'inconvénient, dans l'état actuel des choses, d'être uniquement qualitative.

A l'issue de ce travail, il peut être considéré que la détection du génome d'entérovirus ne peut pas témoigner de la présence de virus infectieux du moins dans les eaux traitées (eaux d'adduction, eaux usées traitées), mais qu'elle peut être considérée au même titre que les bactériophages de *Bacteroides fragilis*, comme un indicateur de contamination virale.

Cependant, ce travail devrait être poursuivi en ce qui concerne l'étude de la survie du génome, et devrait être élargi à l'influence des MES ainsi qu'à celles des bactéries, et sur le plan des milieux testés aux eaux de surface et aux eaux profondes. En particulier, il conviendrait de vérifier si dans ces types d'eaux non traitées, la présence de génome peut témoigner de manière reproductible de la présence de virus infectieux. La confirmation de ces résultats permettrait de disposer d'une méthode de détection rapide et sensible de détection de virus. Enfin, une étude devrait tenter d'établir si les résultats obtenus avec le modèle entérovirus peuvent être extrapolés aux autres virus entériques.

Références Bibliographiques

- ABBASZADEGAN M., HUBER M.S., GERBA C.P. and PEPPER I.L.** (1993). Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1318-1324.
- ADRIAN T., WIGAND R. and RICHTER J.** (1987). Gastroenteritis in infants associated with genome type of adenovirus 31 and with combined rotavirus and adenovirus 31 infection. *Eur. J. Pediatr.*, **146**, 38-40.
- AKIN E.W., HILL W.F. Jr., CLINE G.B. and BENTON W.H.** (1976). The loss of poliovirus 1 infectivity in marine waters. *Wat. Res.*, **10**, 59-63.
- ALAIN R., NADON F., SEGUIN C., PAYMENT P. and TRUDEL M.** (1987). Rapid virus subunit visualization by direct sedimentation of samples on electron microscope grids. *J. Virol. Meth.*, **16**, 209-216.
- ALBERT M.** (1989). Extraction des virus entériques des boues résiduelles et des sédiments. Thèse d'Université, Metz, France.
- ALLSOP K. and STICKLER D.J.** (1984). The enumeration of *Bacteroides fragilis* group organisms from sewage and natural waters. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 15-24.
- ALVAREZ A., HERNANDEZ-DELGADO and TORANZO** (1993). Advantages and disadvantages of traditional and molecular techniques applied to the detection of pathogens in waters. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 253-256.
- ANDERSON Y. et STENSTROM A.** (1987). Waterborne outbreaks in Sweden. Causes and etiology, *Wat. Sci. Tech.*, **19**, 575-580.
- ANSARI S.A., SPRINGTHORPE V.S. and SATTAR S.A.** (1991). Survival and vehicular spread of human rotaviruses : possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.*, **13**, 448-461.
- APAIRE-MARCHAIS V.** (1994). Le génome du virus de l'hépatite A. Mise au point de techniques de détection chez l'homme et dans l'environnement. Etude de souches d'une épidémie. Thèse d'Université. Nantes, France, 151 p.
- APAIRE-MARCHAIS V., ROBERTSON B.H., AUBINEAU-FERRE V., LE ROUX M.G., LEVEQUE F., SCHWARTZBROD L. and BILLAUDEL S.** (1995). Direct sequencing of hepatitis A virus strains isolated during an epidemic in France. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3977-3980.
- APHA-AWWA-WPCF** (1989). Standards methods for the examination of water and wastewater. 17 th. Edition Washington, DC 20005.
- APPLETON H.** (1987). Small round viruses : classification and role in food-borne infections in novel diarrhea viruses. Wiley Chichester (Ciba foundation symposium), **128**, 108-125.
- ARCE-GOMEZ B., MOLITERNO R.A., RODRIGUES A.L., BARBOSA J., DE OLIVEIRA M.R.P., ABREU J.C.S., SPECKDONASCIMENTO V.A. and SASAKI M.G.** (1987). Association of viral hepatitis A with HLA-A9. *Hum. Imm.*, **18**, 205-209.
- ARMON R., ARELLA M. and PAYMENT P.** (1988). A highly efficient second step concentration technique for bacteriophages and enteric viruses using ammonium sulfate and tween 80. *Can J. Microbiol.*, **34**, 651-655.

ASHBOLT N., RIEDY C. and HAAS C. (1996). Microbial health risk a Sydney's coastal bathing beaches. IAWQ. Health related water microbiology. Mallorca 1996.

ATMAR R.L., METCALF T.G., NEILL F.H. and ESTES M.K. (1993). Detection of enteric virus in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 631-635.

ATMAR R.L., NEILL F.H., ROMALDE J.L., LE GUYADER F., WOODLEY C.M., METCALF T.G. and ESTES M.K. (1995). Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissue with PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 3014-3018.

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.

BARRON J., JORET J.C., LESAVRE J. et PERROT J.Y. (1995). Désinfection par ultraviolets des poliovirus et des bactériophages à RNA F-spécifiques. *TSM* **12**, 931-936.

BATIK O., CRAUN G.F., TUTHILL R.W. and KRAEMER D.F. (1980). An epidemiologic study of the relationship between hepatitis A and water supply characteristics and treatment. *Am. J. Public Health*, **70**, 167-168.

BATTIGELLI D.A., SOBSEY M.D. and LOBE D.C. (1993). The inactivation of hepatitis A virus and other model viruses by UV irradiation. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 339-342.

BEHAC J.P., BOUTIN P., MERCIER B. et NUER P. (1987). Traitement des eaux usées. Eyralles adt. Paris.

BELABLES E.H., BOUGUEMOUTH A., BENATALLAH A. and ILLOUL G. (1985). Epidemic non A non B viral hepatitis in Algeria : Strong evidence for its spreading by water. *J. Med. Virol.*, **16**, 257-263.

BERG G. and METCALF T.G. (1978). Indicators of viruses in water. In indicator of viruses in water and food. *Ann. Arbor : Ann. Arbor Science*, 267-296.

BERG G., SANJAGHSAZ H. and WANGWONGWATANA S. (1989). Potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine by substances in drinking water. *Appl. Environ., Microbiol.*, **55**, 390-393.

BERG G., SANJAGHSAZ H. and WANGWONGWATANA S. (1990). KCI Potentiation of the virucidal effectiveness of free chlorine at pH 9.0. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1571-1575.

BERGEISEN G.H., HINDS M.N. and SKAGGS J.W. (1985). A waterborne outbreak of hepatitis A in meade County, Kentucky. *Am. J. Public Health*, **75**, 161-164.

BERIL C., BOHER S. and SCHWARTZBROD L. (1991). Detoxification by Sephadex LH20 of seafood concentrates for rotavirus assay. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 417-421.

BERMAN D., ROHR M.E. et SAFFERMAN R.S. (1980). Concentration of poliovirus in water by molecular filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 426-428.

BIRCH C. and GUST I. (1989). Sewage pollution of marine waters : the risk of viral infection. *Editorial Med. J. Aust.*, **151**, 609-610.

BITTON G. (1980). Introduction to environmental virology. J. Wiley and Sons, New York, NY, USA. 308-318

- BITTON G. et MITCHELL R.** (1974). Effects of colloids on the survival of bacteriophages in seawater. *Wat. Res.*, **8**, 227.
- BIZIAGOS E.** (1989). Virus de l'hépatite A : Méthodes d'étude dans les milieux hydriques. Effets de substances antivirales sur la multiplication in vitro. Thèse Université Claude-Bernard, Lyon (153 p).
- BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M., AGBALIKA F., LAVERAN H. and DELOINCE R.** (1987). Concentration of hepatitis A virus. *Wat. Sci.*, **21**, 683-686.
- BLACKLOW N.R. and CUTOR G.** (1982). Norwalk virus : a major cause of epidemic gastroenteritis. *A.J.P.H.*, **72**, 1321-1323.
- BOOM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E. and VAN DER NOORDAA J.** (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acid. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 495-503.
- BORREGO J.J., CORNAX R., MORINIGO M.A., MARTINEZ-MANZANORES C. and ROMERO P.** (1990). Coliphage as an indicator of faecal pollution in water. Their survival and productive infectivity in natural aquatic environments. *Wat. Res.*, **24**, 111-116.
- BORREGO J.J., MORINIGO M.A., DE VONCENTE A., CORNAX R. and ROMERO P.** (1987). Coliphage as an indicator of faecal pollution in water. Its relationship with indicator and pathogenic microorganism. *Wat. Res.*, **21**, 1475-1480.
- BOSCH A., LUCENA F., DIEZ J.M., GAJARDO R., BLASI M. and JOFRE J.** (1991). Waterborne viruses associated with hepatitis outbreak. *Res. Tech.*, **3**, 80-83.
- BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. et JOFRE J.** (1986). Survey of viral pollution in Besos river (Barcelona). *J.W.P.C.F.*, **58**, 87-91.
- BOSCH A., PINTO R.M., BLANCH A.R. et JOFRE J.** (1988). Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures. *Wat. Res.*, **22**, 343-348.
- BOSCH A., TARTERA C., GAJARDO R., DIEZ J.M. and JOFRE J.** (1989). Comparative resistance of bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* to inactivation by chlorination or ultraviolet radiation. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 221-226.
- BOUTIN P., TORRE M., TOLEDE M. et MERCIER J.P.** (1984). Granulométrie des aérosols émis par des dispositifs d'aspersion d'eaux résiduaires traitées. Interprétation sanitaire. *Sci. Tech. Munic.*, **3**, 143-153.
- BOWEN G.S. et Mc CARTHY M.A.** (1983). Hepatitis A associated with a hardware store water fountain and a contaminated well in Lancaster county, Pennsylvania, 1980. *Am. J. Epidemiol.*, **117**, 695-705.
- BREINDL M.** (1971). The structure of heated polioviruses particles. *J. Gen. Virol.*, **11**, 147-156.
- CABELLI V.J.** (1983). Public health and water quality significance of viral diseases transmitted by drinking water and recreational water. *Wat. Sci. Tech.*, **15**, 1-15.
- CABELLI V.J., DUFOUR A.P., Mc CABE L.J. and LEVIN M.A.** (1982). Swimming associated gastroenteritis and water quality. *Am. J. Epidem.*, **115**, 606-616.

- CABELLI V.J., DUFOUR A.P., Mc CABE L.J. and LEVIN M.A.** (1983). A marine recreational water quality criterion consistent with indicator concepts and risk analysis. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.* **55**, 1306-1314.
- CALCI K., RIPPEY SR. and WATKINS WD.** (1993). Occurrence of male-specific bacteriophages in domestic and feral animals of Rhode Island (abstract 7). Proceedings of the Conference on Water Quality in the Western Hemisphere. 1993 May 21-24, Puerto Rico. Washington : American Society of Microbiology.
- CAMILLO M., ESTRADA E. and HAZEN T.C.** (1985). Survival and enumeration of fecal indicators bifidobacterium adolescentis and *Escherichia coli* in a tropical rain forest watershed. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 468-476.
- CANNON R.O., POLINER J.R., HIRSCHHORN R.B., RODEHEAVER D.C., SILVERMAN P.R., BROWN E.A., TALBOT G.H., STINE S.E., MONROE S.S. and DENNIS D.T.** (1991). A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice. *J. Infect. Dis.*, **164**, 860-863.
- CATO E.P. and JOHNSON J.L.** (1976). Reinstatement of species rank for *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides distagonis*, *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Bacteroides valgatus*. *Int. J. Sys. Bact.*, **26**, 230-237.
- Centers for Disease Control** (1987). Enterically transmitted non A non B hepatitis. Mexico, *Mord. Mortal. Weekly Rep.*, **36**, 597-602.
- CHAMPSAUR H.** (1985). Virus et diarrhée. In : virologie médicale, J. Maurin, Flammarion Méd. sci. (ed.) Paris.
- CHARLEI F. et FERCHAUD R.** (1994). Epidémie de gastroentérites virales liée à la consommation de palourdes en Charente-Maritime. *B.E.H.*, **37**, 169.
- CHOMCZYNSKI P., and SACCHI N.** (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159.
- CHRISTENSEN M.L.** (1989). Human viral gastroenterites. *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 51-89.
- CHUNG H. and SOBSEY M.D.** (1992). Survival of F-specific coliphages, *Bacteroides fragilis* phages, hepatitis A virus (HAV) and Poliovirus 1 in seawater and sediment. International symposium "Health related water microbiology". Washington D.C.
- CHUNG H. and SOBSEY M.D.** (1993). Comparative survival indicator viruses and enteric viruses in seawater and sediment. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 425-428.
- CLIVER D.O.** (1984). Significance of water and the environment in the transmission of virus disease. In : Enteric viruses in water, JL Melnick, Monog. *Virol.*, **15**, 30-42.
- CLIVER D.O. and HERRMANN J.E.** (1972). Proteolytic and microbial inactivation of enteroviruses. *Wat. Res.*, **6**, 797-805.
- COLLINS C.H. et KENNEDY D.A.** (1992). The microbiological hazards of municipal and clinical wastes - a review. *J. Appl. Bact.*, **73**, 1-6.
- CORDS C.E., JAMES C.G. and Mc LAREN L.C.** (1975). Alteration of capsid proteins of coxsackievirus A13 by low ionic concentrations. *J. Virol.*, **15**, 244-252.

- CORNAX R., MORINIZO M.A., BALEBONA M.C., CASTRO D. and BORREGO J.J.** (1991). Significance of several bacteriophage groups as indicator of sewage pollution in marine waters. *Wat. Res.*, **25**(6), 673-678.
- CRANCE J.M., DELOINCE R., LECHEVALLIER C., CREVAT D., LAVERAN M. and FONTANGES R.** (1983). Libération du virus de l'hépatite A dans le milieu de culture lors de sa réplication dans les cellules PLC/PRF/5. *C.R. Acad. Sci.*, **297**, 111-114.
- CRAUN G.F.** (1988). Surface water supplies and health. *J. Am. Water Works Assoc.*, **80**, 40-52.
- CRUZ J.R., CACERES P., CANO F., FLORES J., BARTLETT A. and TORUN B.** (1990). Adenovirus types 40 and 41 and rotavirus associated with diarrhea in children from Guatemala. *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 1780-1784.
- 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.
- DEBARTOLOMEIS J. and CABELLI VJ.** (1991). Evaluation of an *Escherichia coli* host strain for enumeration of F male-specific bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 1301-1305.
- DE MAN J.C.** (1977). MPN tables for more than one test. *Eur. J. Appl. Microbiol.*, **4**, 307-316.
- DENG M.Y., DAY S.P. and CLIVER D.O.** (1994). Detection of hepatitis A virus in environmental sample by antigen capture PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 1927-1933.
- DENIS F. et BRISOU J.** (1976). Contamination virale des fruits de mer : Etude portant sur l'analyse de 15000 coquillages. *Bull. Acad. Med.*, **160**, 18-22.
- DHILLON T.S., DHILLON E.K.S., CHAN H.C., LI W.K. and TSANG A.H.C.** (1976). Study on bacteriophage distribution-virulent and temperate bacteriophage content mammalian feces. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 68-74.
- DINCHER M.L.** (1992). Survie du poliovirus-1 en eau de mer. Mémoire de DEA (Chimie et Microbiologie de l'Eau). Nancy, France.
- DIVIZIA M., DE FELIPPIS P., DINAPOLI A., VENUTI A., PEREZ B. et PANA A.** (1989a). Isolation of wild type hepatitis A virus from the environment. *Wat. Res.*, **23**, 1155-1160.
- DIVIZIA M., SANTI A.L. et PANA A.** (1989b). Ultrafiltration : an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration. *J. Virol. Meth.*, **23**, 55-62.
- DIVIZIA M., MORACE G., GABRIELI R., PISANI G. and PANA A.** (1993). Application of the PCR technique to the detection of hepatitis a virus in the environment. *Wat. Sci. tech.*, **27**, 223-225.

DIZER H., TISCHER E. et LOPEZ J.M. (1982). Concentration of viruses from tapwater : results with positively charged filters which can be regenerated and used repeatedly, p. 96-100. In M. Butler, A.R. Medlen and R. Morris (ed.), *Viruses and disinfection of water and wastewater*. University of Surrey, Surrey, UnKingdom.

DU PREEZ M., KFIR R. and COUBROUGH P. (1995). Investigation of injury of coliforms after chlorination. *Wat. Sci. Tech.*, **31**, 115-118

DUBOIS E. (1995). Contamination de l'environnement littoral par des rotavirus du groupe A. Thèse Université. Rennes I, France. 153p.

DUBOIS F., THEVENAS C., CACES E., VOL S., DOCTORIARENA A., ECAULT J.L., GOUDEAU A et TICHET J. (1992). Séroépidémiologie de l'hépatite A dans six départements du centre-ouest de la France en 1991. *Bull. Epid. Hebdom.*, **49**, 231-232.

DUBROU S., KOPECKA H., LOPEZ PILAT J.M., MARECHAL J. and PREVOT J. (1991). Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in wastewater and surface water samples by gene probe assay. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 267-272.

DUTKA B.J. (1973). Coliforms are inadequate index for water quality *J.E.H.*, **26** (1), 39-46.

ENRIQUEZ C.E., ABBASZADEGAN M., PEPPER I.L., RICHARDSON K.J. and GERBA C.P. (1993). Poliovirus detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. *Wat. Res.*, **27**, 1113-1118.

ENRIQUEZ C.E. and GERBA C.P. (1995). Concentration of enteric adenoviruses 40 from tap, sea and waste water. *Wat. Res.*, **29**, 2554-2560.

ENRIQUEZ C.E., HURST C.J. and GERBA C.P. (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea and waste water. *Wat. Res.*, **29**, 2548-2553.

ESTES M.K. and COHEN J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol. Rev.*, **53**, 410-449.

ESTES M.K., GRAHAM D.Y., SMITH E.M. and GERBA C.P. (1979). Rotavirus stability and inactivation. *J. Gen. Virol.*, **49**, 403-409.

FUNDERBURG S.W. and SORBA C.A. (1985). Coliphages as indicators of enteric viruses in activated sludge. *Wat. Res.*, **19**, 547-555.

FATTAL B. and SHUVAL H.I. (1989). Epidemiological research on the relation ship between microbial quality of coastal seawater and rotavirus induced gastroenteritis among bathers on the mediterranean israeli beaches. Research project n° ICP-CEH-039-ISP-16(D). W.H.O., Athens, 1-25.

FESTY B. (1984). In "Survey of virus isolation data from environmental samples". Bitton G. et al. eds. Health effects research laboratory, U.S. Environmetnal Protection Agency, Cincinnati, OH.

FINEGOLD S.M. and SUTTER V. (1983). Normal indigenous intestinal flora in Hontges D.J. (ed) *Human intestinal microflora in health and disease* London : Academic Press.

FLEWETT T.H. and WOODE G.N. (1978). The rotaviruses. Brief review, "Arch. Virol.", **57**, 1-23.

FOLIGUET J.M., SCHWARTZBROD L. et GAUDIN O.G. (1966). La pollution virale des eaux usées de surface et d'alimentation. *Bull. Organ. Mond. Santé*, **35**, 737-749.

FUJIOKA R.S., DOW M.A. and YONEYAMA B.S. (1986). Comparative disinfection of indicator bacteria and poliovirus by chlorine dioxide. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 215-219.

FUJIOKA R.S., LOH P.C. and LAV S. (1980). Survival of human enteroviruses in the hawaiian ocean environment : evidence for virus-inactivating microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39** (6), 1105-1110.

GANTZER C. (1993). Influence de la montmorillonite sur le comportement du poliovirus-1 en eau de mer. Mémoire de DEA (Chimie et Microbiologie de l'Eau). Nancy, France.

GANTZER C., QUIGNON F. and SCHWARTZBROD L. (1994). Poliovirus 1, adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater, survival of the adsorbed virus. *Environ. technol.*, **15**, 271-278.

GARIN D., FUCHS F., CRANCE J.M., DELOINCE R., AYMARD M. and BARTOLI M. (1993). Validation of an ultrafiltration process to concentrate viruses from large volumes of water. *Environ. Tech.*, **14**, 397-400.

GERBA C.P. (1984). Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. in Appl. Microbiol.*, **30**, 133-168.

GERBA C.P. (1987). Phage as indicators of faecal pollution. In Goyal SM Gerba C.P., Bitton G. (ed) New-York : John Wiley and Sons 1987.

GERBA C.P. (1988). Viral disease transmission by seafoods. *Food Technol.*, **3**, 99-103.

GERBA C.P. and SCHAIBERGER G.E. (1975). The effect of particulates on virus survival in seawater. *J. Water Poll. Control Fed.*, **47**, 93-103.

GERBA C.P., GOYAL S.M., LABELLE R.L., CECH I. and BOGAN G.F. (1979). Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enterovirus in marine waters. *AJPH*, **69**(11), 1116-1119.

GERBA C.P., POWELSON D.K., YAHYA M.T., WILSON L.G. et AMY G.L. (1991). Fate of viruses in treated sewage effluent during soil aquifer treatment designed for wastewater. *Reclamation and reuse. Wat. Sci. Tech.*, **24**, 95-102.

GERBA C.P., ROSE J.B. and SINGH S.N. (1985). Waterborne gastroenteritis and viral hepatitis. *Chrit. Rev. Environ. Control.*, **15**, 213-236.

GILL O.N., CUBITT W.D., MC WIGGAN D.A., WATNEY B.M. and BARTLETT C.L.R. (1983). Epidemic of gastroenteritis caused by oysters contaminated with small round structured viruses. *Br. Med. J.*, **287**, 1532-1534.

GIRONES R., JOFRE J.T. and BOSCH A. (1989). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 1015-1021.

GODDARD M.R., BATES J. et BUTLER M. (1981). Recovery of indigenous enteroviruses from raw and digested sewage sludges. *Appl. Environ. Microbiol.*, **42**, 1023-1028.

GOYAL S.M. (1983). Indicators of viruses in viral pollution of the environment, ed. G. Berg, CRC press, Inc. Boca Raton, Florida

GOYAL S.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1978). Prevalence of human enteric viruses in coastal canal communities. *J. Wat. Pollut. Control. Fed.*, **50**, 2247-2256.

GRABOW W.O.K., GAUSS-MULLER V., PROZESKY O.W. and DEINHARDT (1983). Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 619-624.

GRABOW W.O.K., MIDDENDORFF I.G. and BASSON N.C. (1978). Role of lime treatment in the removal of bacteria enteric viruses and coliphages in a wastewater reclamation plant. *Appl. Environ. Microbiol.*, **35**, 663-669.

GRABOW W.O.K. and COUBROUGH P.A. (1986). Practical direct plaque assay for coliphage in 100 mL sample of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 430-433.

GRABOW W.O.K., HOLTZHAUSEN C.S. and DE VILLIERS C.J. (1993). Report on research project. research on bacteriophages as indicators of water quality 1990-1992. Pretoria : Water research commission, 147 p.

GRABOW W.O.K. (1986). Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water. *Wat. Sci. Tech.*, **18**, 159-165.

GRABOWN W.O.K., IDEMA G.K., COUBROUGH P. et BATEMAN B.W. (1989). Selection of indicators systems for human viruses in polluted seawater and shellfish. *Wat. Sci. Tech.*, **21**, 111-117.

GRAHAM D.Y., DUFOUR G.R. and ESTES M.K. (1987). Minimal infective dose of rotavirus. *Arch. Virol.*, **92**, 261-271.

GRIMMEL M., ZIBIRRE R. and KOCH G. (1983). Fluorescence spectrophotometric study of structural alterations in the capsid of polioviruses. *Arch. Virol.*, **78**, 191-201.

GROMEIER M. and WETZ K. (1990). Kinetics of poliovirus uncoating in Hela cells in a non-acidic environment. *J. Virol.*, **64**, 3590-3597.

GUNN R.A., JANOWSKI H.T., LIEB S., PRATHER E.C. and GREENBERG H.B. (1982). Norwalk virus gastroenteritis following raw oyster consumption. *Am. J. Epidemiol.*, **115**, 348-351.

GUTTMAN-BASS N., CATALANO-SHERMAN J. et HOSTOVSKY T. (1984). Efficiency of virus recovery in water : effect of inorganic and organic chemicals. *Monogr. Virol.*, **15**, 111-118.

GUTTMAN-BASS N. and CATALANO-SHERMAN J. (1985). Effects of humic materials on virus recovery from water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 1260-1264.

GUTTMAN-BASS N. and CATALANO-SHERMAN J. (1986). Humic acid interference with virus recovery by electropositive microporous filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 556-561.

HALL R.M. and SOBSEY M.D. (1993). Inactivation of hepatitis A virus and MS2 by ozone and ozone-hydrogen peroxide in buffered water. *Wat. Sci. Techn.*, **27**, 371-378.

HALLIDAY M.L., KANG L.Y., ZHOU T.K., HU M.D., PAN Z.C., FU J.Y., HUANG Y.S. et HU S.L. (1991). An epidemic of hepatitis A attributable to the ingestion of raw clams in Shanghai. China, *J. Infect. Dis.*, **164**, 852-859.

HARAKEH M. and BUTLER M.J. (1985). Factors influencing the ozone inactivation of enteric viruses in effluent. *Ozone : Sciences and Engineering. Sci. Tech.*, **6**, 235-243.

- HAVELAAR A.A. and HOGEBOOM W.M.** (1984). A method for the enumeration of male specific bacteriophage in sewage. *J. Appl. Bacteriol.*, **56**, 439-447.
- HAVELAAR A.A., FURUSE K. and HOGEBOOM W.M.** (1986). Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *J. Appl. Bacteriol.*, **60**, 255-262.
- HAVELAAR A.A., POT-HOGEBOOM W.M., KOOT W. and POT R.** (1987). F-specific bacteriophages as indicators of the disinfection efficiency of secondary effluent with ultraviolet radiation. *Ozone Sci. Engng*, **9**, 353-368.
- HAVELAAR A.H.** (1993). A bacteriophage standard for bathing waters. Final report, commission of the European Communities. B4, 3040/92/012609.
- HAVELAAR A.H., MEULEMANS C.C.E., POT-HOGEBOOM W.M. and KOSTER J.** (1990a). Inactivation of bacteriophage MS2 in wastewater effluent with monochromatic and polychromatic ultraviolet light. *Wat. Res.*, **24**, 1387-1393.
- HAVELAAR A.H., POT-HOGEBOOM W.M., FURUSE K., POT R. and HORMANN M.P.** (1990b). F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *J. Appl. Bacteriol.*, **69**, 30-37.
- HAVELAAR A.H., NIEUWSTAD Th.J., MEULEMANS C.C.E. and VAN OLPHEN M.** (1991). F-specific RNA bacteriophages as model viruses in UV disinfection of wastewater. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 347-353.
- HEDBERG C.W. and OSTERHOLM M.T.** (1993). Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clin. Microbiol. rev.*, **6**, 199-210.
- HEJKAL T.W., KESWICK B., LA BELLE R., GERBA C.P., SANCHEZ Y., DREESMAN G., HAFKIN B. et MELNICK J.L.** (1982). Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *J. Am. Water Works Assoc.*, **74**, 318-321.
- HELLER D., GILL O.N., RAYNHAM E., KIRKLAND T., ZADICK P.M. and STANWELL SMITH R.** (1986). An Outbreak of gastrointestinal illness associated with consumption of raw depurated oysters. *Br. Med. J.*, **292**, 1726-1727.
- HERNANDEZ-DELGADO E.A., MARTINEZ A., VARGAS J. and TORANZOS G.** (1993). Coliphages in tropical waters and their correlation to sewage pollution (abstract 20). Proceedings of the conference on water quality in the Western hemisphere 1993 May 21-24, Puerto Rico. Washington. American Society of microbiology.
- HOFF J.C.** (1986). Inactivation of microbial agents by chemical disinfectants . EPA/600/2/86/607. US Environmental Protection Agency-Cincinnati.OH.
- HOLMES I.H.** (1991). Reoviridae. p.186-191. In classification and nomenclature of viruses. R.I.B. Francki, CM Fauquet, D.L. Knudson and F. Brown (eds), *Arch. Virol.* **2** (supp.). Springer-Verlag Wien. New-York.
- HRUDEY S.E., HRUDREY E.J. and LOW N.J.** (1992). Health effects associated with waste treatment, disposal and reuse. *Wat. Environ. Res.*, **64**, 593-599.
- HUGUES B., ANDRE M. et CHAMPSAUR H.** (1992). Efficacité des méthodes d'adsorption-élution utilisant la poudre ou la laine de verre pour la concentration des virus dans les effluents de stations d'épuration. *Rev. Sci. Eau*, **5**, 113-123.

- HUGUES B., ANDRE M., PLANTAT J.L. and CHAMPSAUR H.** (1993). Comparison of glass wool and glass powder methods for concentration of viruses from treated waste waters. *Zbl. Hyg.*, **193**, 440-449.
- HUGUES B., PLISSIER M., ANDRE M., PAGLIARDINI A. et LAURENT D.** (1979). Evaluation de la charge virale dans les eaux d'une station d'épuration biologique au moyen de deux méthodes de concentration de virus par adsorption-élution sur poudre de verre ou sur microfiltre de verre. *Wat. Res.*, **13**, 1117-1123.
- HUNG T.** (1988). Rotavirus and adult diarrhea. *Adv. Virus Res.*, **35**, 193-218.
- HUNG T., WANG C. and FANG Z.** (1984). Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus. *Lancet*, **1**, 1139-1142.
- HUNTER P.R.** (1994). Drinking water associated disease outbreaks. *Microbiol. Europe*, **2**, 8-12.
- HURST C.J.** (1989). Fate of viruses during wastewater sludge treatment. *CRC Crit. Rev. Environ. Control*, **18**, 317-343.
- HURST C.J., BENTON W.H. and Mc CLELLAN K.A.** (1989). Thermal and water source effects upon the stability of enteroviruses in surface freshwaters. *Can. J. Microbiol.*, **35**, 474-480.
- HURST C.J., GERBA C.P. and CECH I.** (1980). Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**, 1067-1079.
- HUTCHESON R.H.** (1971). Infectious hepatitis Tennessee. *Morb. Mort. Weekly. Rep.*, **20**, 357.
- IAWPRC** (1991). Study group on health related water microbiology. Bacteriophages as model viruses in water quality control. *Wat. Res.*, **25**, 529-545.
- JANSEN R.W., SIEGL G. and LEMON S.M.** (1990). Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **87**
- JANSONS J. and BUCENS M.R.** (1986). Virus detection in water by ultrafiltration. *Water Res.*, **20**, 1603-1606.
- JAYKUS L.A., DE LEON R. and SOBSEY M.D.** (1993). Application of RT-PCR for the detection of virus in oysters. *Wat. Sci. tech.*, **27**, 49-53.
- JEHL-PIETRI C.** (1992). Détection des virus entériques dans le milieu hydrique : cas du virus de l'hépatite A dans l'environnement marin et les coquillages. Thèse Université Nancy I., 239 p.
- JIANG X., ESTES M.K. and METCALF T.G.** (1989). In situ hybridization for quantitative assay of infectious hepatitis A virus. *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 874-879.
- JIANG X., ESTES M.K., METCALF T.G. and MELNICK J.L.** (1986). Detection of hepatitis A virus in seeded estuarine samples by hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 711-717.
- JIANG X., ESTES M.K. and METCALF T.G.** (1987). Detection of hepatitis A virus by hybridization with single-stranded RNA probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2487-2495.

- JOFRE J.** (1991). Les bactériophages dans les milieux hydriques. In « Virologie des milieux hydriques » Schwartzbrod L. Tec. et doc., Lavoisier Edit., 253-276.
- JOFRE J., BLASI M., BOSCH A. and LUCENA F.** (1989). Occurrence of bacteriophages infecting "Bacteroides fragilis" and other viruses in polluted marine sediments. Wat. Sci. Tech., **21**, 15-19.
- JOFRE J., BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and TARTERA C.** (1986). Evaluation of *Bacteroides fragilis* bacteriophages as indicators of the virological quality of water. Wat. Sci. tech., **18**, 167-173.
- JORET J.C., BLOCK J.C., HATERMANN P. and RICHARDS Y.** (1982). Wastewater disinfection : Elimination of fecal bacteria and enteric viruses by ozone. Ozone Science Engineer, **4**, 91-99.
- JORET J.C., BLOCK J.C., LUCENA-GUTIERREZ F., SCHWARTZBROD L., HUGUES B. et PLISSIER N.** (1980). Virus concentration from secondary wastewater : comparative study between epoxy fiberglass and glass powder adsorbents. European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., **10**, 245-252.
- JOUSSEMET M., BOURIN P., BUISSON Y. et FABRE G.** (1991). Diminution de la prévalence des anticorps anti-VHA chez les jeunes militaires de 20 ans. Bull. Epidemiol. Hed., **28**, 115-116.
- KAI S., WANTANABE S., FURUSE K. and OSAWA A.** (1985). *Bacteroides* bacteriophages isolated from human faeces. Microbiol. Immunol., **29**, 895-899.
- KAPIKIAN A.Z. and CHANOCK R.M.** (1990). Rotaviruses, p.1353-1404. In BN-Fields, D.N. Knipe, R.M. Chanock, J.L. Melnick, B. Roizman and R.E. Shope (eds). Virology, vol 2, 2nd Raven Press New York.
- KAPLAN J.E., GOODMAN R.A., SCHONBERGER L.B., LIPPY E.C. and GARY W.** (1982). Gastroenteritis due to Norwalk virus : an outbreak associated with a municipal water system. J. Infect. Dis., **146**, 190-197.
- KATOR H. and RHODES M.** (1993). Evaluation of male-specific coliphage as indicators of fecal contamination in point and non point source impacted shellfish. growing areas. Gloucester Point, VA : Virginia Institute of Marine Science, College of William and Mary.
- KATZENELSON E.** (1978). Survival of viruses in "Indicators of viruses in water and food". Berg G., ed., Ann. Arbor Science Publ.
- KATZENELSON E., FATTAL B. and HOSTOVESKY T.** (1976). Organic flocculation : an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tapewater. Appl. Environ. Microbiol., **32**, 638-639.
- KEEFE B. and GRENN J.** (1989). Coliphage as indicator of faecal pollution at three recreational beaches on the frith of forth. Wat. Res., **23**, 2696-2701.
- KELLER G.H. and MANAK M.M.** (1989). DNA Probes. Stockton Press, New York.
- KESWICK B.H., GERBA C.P., DUPONT H.L. et ROSE J.B.** (1984). Detection of enteric viruses in treated drinking water. Appl. Environ. Microbiol., **47**, 1290-1294.
- KESWICK B.H., SATTERWHITE T.K., JOHNSON P.C., DUPONT H.L., SECOR S.L., BITSURA J.A., GARY G.W. and HOFF J.C.** (1985). Inactivation of Norwalk. Environ. Microbiol., **50**, 261-264.

- KFIR R., COUBROUGH P. and GRABOW WOK** (1991). The occurrence of male specific and somatic bacteriophages in polluted South African. *Wat. Sci. Tech.*, **24**, 251-254.
- KHURO M.S.** (1980). Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibly of another human hepatitis virus distinct from posttransfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.*, **68**, 818-824.
- KOOPMAN J.S., ECKERT E.A., GREENBERG H.B., STROHM B.C., ISAACSON R.E. and MONTO A.S.** (1982). Norwalk virus enteric illness acquired by swimming exposure. *Am. J. Epidemiol.*, **115**, 173-177.
- KOPECKA H., DUBROU S., PREVOT J., MARECHAL J. and LOPEZ-PILA J.M.** (1993). Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, Polymerase Chain Reaction and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 1213-1219.
- KOPECKA H., PREVOT J., GIRARD M., FUCHS F. et AYMARD M.** (1988). Intérêt des sondes ARNc (Ribosondes) synthétisés « in vitro » dans la détection des entérovirus par hybridation moléculaire. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.*, **139**, 217-225.
- KOTT Y.** (1966). Estimation of low number of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the most probable number method. *Appl. Microbiol.*, **14**, 141-144.
- KRUSE J., TIMMINS P.A. and WITZ J.** (1982). A neutron scattering study on the structure of compact and swollen forms of southern bean mosaic virus. *Virol.*, **119**, 42-50.
- KURTZ J.B., LEE T.W. and PICKERING D.** (1977). Astrovirus associated gastroenteritis in a children's ward. *J. Clin. Pathol.*, **30**, 948-952.
- LE CHEVALLIER M.W. and Mc FETERS G.A.** (1985). Enumerating injured coliforms in drinking water. *J. Am. Water Works Assoc.*, **77**, 81-87.
- LE CHEVALLIER M.W., CAMERON S.C. and Mc FETERS G.A.** (1983). New medium for improved recovery of coliform bacteria from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 484-492.
- LEE J.V., DAWSON S.R., WARD S., SURMAN S.B. and NEAL K.R.** (1996). Bacteriophages are a better predictor of illness rates than bacteria amongst users of a white water course fed by a lowland river. IAWQ. Health-related water microbiology. Mallorca 1996.
- LEES D.N., HENSHILWOOD K. and DORE W.J.** (1994). Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2999-3005.
- LEFLER E. and KOTT Y.** (1974). Virus retention and survival in sand, in : JF Malina, Jr et BP Sagik (eds). *Virus survival in water and wastewater systems*. Univ. of Texas. Austin, TX, USA, 84-91.
- LE GUYADER F., MENARD D., POMMEPUY M. and KOPECKA H.** (1995). Use of RT semi-nested PCR to assess viral contamination in Caribbean rivers (Martinique). *Wat. Sci. Tech.*, **31**, 391-394.
- LEMON S.M., BINN L.N. and MARCHWICKI R.H.** (1983). Radio-immunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. *J. Clin. Microbiol.*, **17**, 834-839.

- LEPARC I., FUCHS F., KOPECKA H. and AYMARD M.** (1993). Use of the polymerase chain reaction with a murine model of Picornavirus Induced Myocarditis. *J. Clin. Microbiol.*, **31**, 2890-2894.
- LEVEQUE F., CRANCE J.M., BERIL C. and SCHWARTZBROD L.** (1995). Virucidal effect of UV light on hepatitis A virus in sea water : evaluation with cell culture and RT-PCR. *Wat. Sci. Tech.*, **31**, 157-160.
- LINCO S.J. and GROHMANN G.S.** (1980). The Darwin outbreak of oyster associated viral gastroenteritis. *Med. J. Aust.*, **1**, 211-213.
- LIPPY E.C. and WALTRIP S.C.** (1984). Waterborne disease outbreaks - 1946-1980 : a thirty-five-year perspective. *J. Am. Wat. Works Ass.*, 60-67.
- LO S., BILBERT J. and HETRICK F.** (1976). Stability of human enteroviruses in estuarine and marine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 2445-249.
- LORD D.A., GRABOW W.O. et ROBERTS M.J.** (1989). Dispersion of sewage wastes in nearshore coastal waters : applicability of water quality criteria. *Wat. Sci. Tech.*, **21**(2), 77-81.
- LUCENA F., DIVIZIA M., BIZIAGOS E., CRANCE J.M. et DELOINCE R.** (1991). Extraction et concentration des virus des milieux hydriques, P.71-106. Dans *virologie des milieux hydriques*, L. Schwartzbrod (Coord.), Tec et Doc. Lavoisier, Edit. Paris.
- LUCENA F., MUNIESA M., PUIG A., ARAUJO R. and JOFRE J.** (1995). Simple concentration method for bacteriophages of *Bacteroides fragilis* in drinking water. *J. Virol. Meth.*, sous presse.
- LUCENA F., FINANCE C., JOFRE J., SANCHO J. and SCHWARTZBROD L.** (1982). Viral pollution determination of superficial waters (river water and seawater from the urban area of Barcelona (Spain)). *Wat. Res.*, **16**, 173-177.
- MA J.F., GERBA C.P. and PEPPER I.L.** (1995). Increased sensitivity of poliovirus detection in tap water concentrates by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, **55**, 295-302.
- MA J.F., NARANJO J. et GERBA C.P.** (1994a). Evaluation of Mk filters for recovery of enteroviruses from tap water. *App. Environ. Microbiol.*, **60**, 1974-1977.
- MA J.F., STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P.** (1994b). Cell culture and PCR determination of poliovirus, inactivation by disinfectants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4203-4206.
- MAHONEY F.J., FARLEY T.A., KELSO K.Y., WILSON S.A., HORAN J.M. and McFARLAND L.M** (1992). An outbreak of hepatitis A associated with swimming in a public pool. *J. Infect. Dis.*, **165**, 613-618.
- MARTINS M.T., SOARES L.A., MARQUES E. et MOLINA A.G.** (1983). Human enteric viruses isolated from influents of sewage treatment plants in Sao Paulo. *Braztech.*, **15**, 69-73.
- MARX F.E., TAYLOR M.B. and GRABOW W.O.K.** (1995). Optimization of a PCR method for the detection of astrovirus type 1 in environmental samples. *Wat. Sci. Tech.*, **31**, 359-362.

MAUL A. (1991). Aspects statistiques des méthodes de quantification en virologie in : *Virologie des milieux hydriques*, Schwartzbrod L., Tec. et doc., Lavoisier Edit., Paris, France, p 143-171.

MEDEMA G.J., VAN ASPEREN I.A. and HAVELAAR A.H. (1996). Assessment of the exposure of swimmers to microbiological contaminants in fresh waters. IAWQ. Health-related water microbiology. Mallorca 1996.

MEHNERT D.U. and STEWIEN K.E. (1993). Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in Sao Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 140-143.

METCALF T.G. (1978). Indicators of virus in shellfish. In Berg G. (ed) *Indicators of viruses in water and food*. Ann. Arbor : Ann Arbor Sciences.

MOORE N.J. and MARGOLIN A.B. (1994). Efficacy of nucleic acid probes for detection of poliovirus in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone and UV radiation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 4189-4191.

MORGADO A.F., HILDEBRANDT J.P., LOES T.M., SCHATZMAYR H.G. and CYNAMON S.E. (1982). An outbreak of hepatitis A apparently associated with use of contaminated water. *Rev. Microbiol.*, **13**, 316-324.

MORSE D.L., GUZEWICH J.J., HANRAHAN J.P., STRICOF R., SHAYEGANI M., DEIBEL R., GRABAU J.C., NOWAK N.A., HERRMAN J.E., CUKOR G. and BLACKLOW N.R. (1986). Widespread outbreaks of clam and oyster associated gastroenteritis. Role of Norwalk virus. *N. Engl. J. Med.*, **314**, 678-681.

MURPHY A.M., GROHMANN G.S. and SEXTON F.H. (1983). Infectious gastroenteritis in Norfolk Island and recovery of viruses from drinking water. *J. Hyg. Camb.*, **91**, 139-146.

NASSER A.M., TCHORCH Y. and FATTAL B. (1993). Comparative survival of *E. coli*, F+ bacteriophages, HAV and Poliovirus 1 in wastewater and groundwater. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 401-4407.

NIEUWSTAD Th. J., HAVELAAR A.H. and Van OLPHEN M. (1991). Hydraulic and microbiological characterization of reactors for ultraviolet disinfection of secondary wastewater effluent. *Wat. Res.*, **25**, 775-783.

NIU M.T., POLISH L.B., ROBERTSON B.H., KHANNA B.K., WOODRUFF B.A., SHAPIRO C.N., MILLER M.A., SMITH J.D., GEDROSE J.K., ALTER M.J. and MARGOLIS H.S. (1992). Multistate outbreak of hepatitis A associated with frozen strawberries. *J. Infect. Dis.*, **166**, 518-524.

NUIAUCET C., PONGE A., CHAMBAUD L. et RAIMONDEAU J. (1993). La surveillance et l'investigation : à propos de deux épidémies d'hépatite virale dans les départements littoraux. *Bull. Epidémiol., Hebd.*, **29**, 129-130.

O'BRIEN R.T. and NEWMAN J.S. (1977). Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **33**, 334-340.

OMS Organisation Mondiale de la Santé (1994). Directives de la qualité de l'eau de boisson. *Recommandations*, vol 1, p. 8 à 30.

OMS, Organisation Mondiale de la Santé (1986). Directives de la qualité de l'eau de boisson. *Critères d'hygiène et documentation à l'appui*, vol n°2, 3441 pages.

OSAWA S., FURUSE K. and WATANABE I., (1981). Distribution of ribonucleic acid coliphages in animals. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 164-168.

PAIN S. (1986). Are british shellfish safe to eat ? *New Sci.*, 29-33.

PANCORBO O.C., EVANSHEN B.G., CAMPBELL W.F., LAMBERT S., CURTIS S.K. and WOOLLEY T.W. (1987). Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in Fresh waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1803-1811.

PARRY O.T., WHITEHEAD J.A. and DOWLING L.T. (1981). Temperature sensitive coliphage in the environment. In Gooddard M., Butler M. (editors) *viruses and wastewater treatment* Pergamon Press. Oxford

PAYMENT P. (1996). Epidemiology of endemic gastrointestinal and respiratory diseases : Incidence fraction attributable to tap water and cost to society. *IAWQ. Health-related water microbiology. Mallorca 1996.*

PAYMENT P. et TRUDEL M. (1985a). Concentration and purification of viruses by molecular filtration and ultracentrifugation methods, chap. 34. In *Biotechnology : Applications and research* (Gheremisin off et Quелlette). Technomic Publishing Co (Basel).

PAYMENT P. et TRUDEL M. (1985b). Immunoperoxidase method with human serum globulin for broad spectrum detection of cultivable viruses : application to enumeration of cultivable viruses in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1308-1310.

PAYMENT P., TRUDEL M. and PLANTE R. (1985). Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1418-1428.

PAYMENT P., FORTIN S. et TRUDEL M. (1986). Elimination of human enteric viruses during conventionnal wastewater treatment by activated sludge. *Can. J. Microbiol.*, **32**, 922-925.

PAYMENT P., GANACHE F. and PAQUETTE G. (1988). Microbiological and virological analysis of water from two water filtration plants and their distribution systems. *Can. J. Microbiol.*, **34**, 1304-1309.

PAYMENT P., RICHARDSON L., SIENIATICKI J., DEWAR R., EDWARDES M. and FRANCO E. (1991). A randomized trial to evaluate the risk of gastrointestinal disease due to consumption of drinking water meeting current microbiological standards. *Am J. Publ. Health*, **81**, 703-708.

PAYNE S.B., GRILLI E.A. and SMITH A.J. (1984). Investigation of an outbreak of adenovirus type 3 infection in a boy's boarding scholl. *J. Hyg. Camb.*, **93**, 277-283.

PEIGUE-LAFEUILLE H. (1991). Virus associés aux diarrhées aigües. *Méd. Mal. Infect.*, **21**, 571-577.

PREVOT J., DUBROU S. and MARECHAL J. (1993). Detection of human hepatitis A virus in environmental water by an antigen-capture Polymerase Chain Reaction method. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 227-233.

PUIG M., JOFRE J., LUCENA F., ALLARD A., WADELL G. and GIRONES R. (1994). Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 2963-2970.

- QUALLS R., FLYNN M. and JOHNSON D.** (1983). The role of suspended particules in ultraviolet disinfection. *J. Water Poll. Con. Fed.*, **55**(10), 1280-1285.
- QUIGNON F.** (1995). Thèse d'Université. Université de Nancy I, mention Chimie et Microbiologie de l'Eau.
- QUIGNON F., KIENE L., LEVI Y., SARDIN M. and SCHWARTZBROD L.** (1996). Virus behaviour within a water distribution system. IAWQ. Health related water microbiology. Mallorca. 1996.
- QUIGNON F. and SCHWARTZBROD L.** (1995). Influence of salts and montmorillonite upon heat inactivation of poliovirus in sterile water. *Wat. Sci. Tech.*, **31**, 177-180.
- RAMALINGASWAMI V. and PURCELL R.H.** (1988). Waterborne non-A, non-B hepatitis. *Lancet*, **1**, 571-573.
- RAO V.C., METCALF T.G. and MELNICK J.L.** (1986). Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 484-488.
- RAO V.G., SEIDEL K.M., GOYAL S.M., METCALF T.G. and MELNICK J.L.** (1984). Isolation of enterovirus from water, suspended solids and sediments from Galveston bay : survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 404-409.
- RIBAS F., HUGUET J.M. et PERRAMON J.** (1986). Contrôle d'entérovirus dans l'approvisionnement de Barcelone par l'eau de surface du fleuve Llobregat. *Aqua*, **1**, 33-44.
- RICHARDS G.P.** (1985). Outbreaks of shellfish associated enteric illness in the United-States : requisite for development of viral guidelines. *J. Food Prot.*, **48**, 815-823.
- RICHARDSON K.J., MARGOLIN A.B. and GERBA C.P.** (1988). A novel method for liberating viral nucleic acid for assay of water samples with cDNA probes. *J. Virol Meth.*, **22**, 13-21.
- ROSE J.B., GERBA C.P., SINGH G.A., TORANZOS and KESWICK** (1986). Isolating viruses from finished water. *J. Am. Water Works Assoc.*, 56-61.
- ROSE J.B., MULLINAX R.L., SINGH S.N., YATES M.Y. and GERBA C.P.** (1987). Occurrence of rotaviruses and enteroviruses in recreational waters of Oak Creek, Arizona. *Wat. Res.*, **21**, 1375-1381.
- ROSENBLUM L.S., MIRKIN I.R., ALLEN D.T., SAFFORD S. and HADLER S.C.** (1990). A multifocal outbreak of hepatitis A traced to commercially distributed lettuce. *Am. J. Publ. Health*, **80**, 1075-1080.
- ROY D., ENGELBRECHT R.S. and CHIAN E.S.K.** (1982). Comparative inactivation of six enroviruses by ozone. *J. Am. Water Works Assoc.*, **74**, 660-664.
- 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.
- SAMBROOK J., FRITSCH E.F. and MANIATIS T.** (1989). Molecular cloning. A Laboratory manual, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York.
- SARRETTE B.A., DANGLLOT C.D. and VILAGINES R.** (1977). A new and simple method for recuperation of enterovirus from water. *Water Res.*, **11**, 355-358.

SATTAR S.A. (1981). Virus survival in receiving waters, in : viruses and wastewater treatment, M. Goddard and M. Butler (eds), Pergamon Press, New York, NY, USA.

SCHIFF G.M., STEFANOVIC G., YOUNG B. and PENNE-KAMPS J.K. (1984). Minimum human infective dose of enteric virus (Echovirus 12) in drinking water. In « Enteric virus in water ». *Monogr. Virol.*, **15**, 222-228.

SCHWAB K.J., DE LEON R. and SOBSEY M.D. (1993). Development of PCR methods for enteric virus detection in water. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 211-218.

SCHWARTZBROD J., DIXNEUF P., SCHWARTZBROD L., BROCHET J.C. et FOLIGUET J.M. (1975). Etude du comportement du virus poliomyélitique de type 1 dans différents milieux hydriques. *Rev. Epidem. Méd. Soc. et Santé Publi.*, **23**, 235-252.

SCHWARTZBROD J., MATHIEU C., THEVENOT M.T., BARADEL J.M. and SCHWARTZBROD L. (1987). Wastewater sludge : parasitological and virological contamination. *Wat. Sci. Tech.*, **19**, 33-40.

SCHWARTZBROD L. (1991). Virus et milieu hydrique in : *Virologie des milieux hydriques*, Tec. and Doc. Lavoisier (ed.) Paris, France.

SCHWARTZBROD L. et LUCENA-GUTIERREZ F. (1978). Concentration des entérovirus dans les eaux par adsorption sur poudre de verre : proposition d'un appareillage simplifié. *Microbia*, **4**, 55-58.

SCHWARTZBROD L., BENNANI A., DE LAVERGNE E. et SCHWARTZBROD J. (1983). Détection des rotavirus dans les eaux usées par immunoenzymologie : étude préliminaire. *Rev. Fr. Sciences Eau*, **2**, 145-152.

SCHWARTZBROD L., FINANCE C., AYMARD M., BRIGAUD M. and LUCENA F. (1985). Recovery of reoviruses from tapwater. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B.*, **181**, 383-389.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F. et FINANCE C. (1979). Etude quantitative de la pollution virale dans l'effluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires. *J. Fr. Hydrol.*, **10**, 7-20.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F., BOSCH A. et SCHWARTZBROD J. (1988). Microorganismes, eau de mer et sédiments : étude du site de Barcelone, *Océanis*, **14**, 51-59.

SEELEY N.D. and PRIMROSE S.B. (1980). The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J. Gen. Virol.*, **46**, 87-95.

SEKINES S., OKADA S., YAYASHI Y., ANDO T., TERAYAMA T., YABUUCHI K., MIKI T. and OHASHI M. (1989). Prevalence of small round structures virus infections in acute gastroenteritis outbreaks. *Microbiol. Immunol.*, **33**, 207-217.

SENOUCI S. et SCHWARTZBROD L. (1996). Concentration sur poudre et laine de verre de coliphages et poliovirus de l'eau. *Com. pers.*

SHAFFER P.T.B., METCALF T.G. and SPROUL O.J. (1980). Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 1115-1121.

SHIEH Y.S.C., BARIC R.S., SOBSEY M.D., TICEHURST J., MIELE T.A., DE LEON R. and WALTER R. (1991). Detection of hepatitis A virus and other enteroviruses in water by ssRNA probes. *Journal Virol. Meth.*, **31**, 119-136.

SHIELDS P.A. and FARRAH S.R. (1983). Influence of salts on electrostatic interaction between poliovirus and membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 526-531.

SHIELDS P.A. and FARRAH S.R. (1986). Concentrations of virus in beef extract by flocculation with ammonium sulfate. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 211-213.

SHIRLEY J.A., BEARDS G.M., THOULESS M.E. and FLEWETT T.H. (1981). The influence of divalent cations on the stability of human rotavirus. *Arch. Virol.*, **67**, 1-9.

SOBOTKA J. (1993). The efficiency of water treatment and disinfection by means of ultraviolet radiation. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 343-346.

SOBSEY M. (1988). Inactivation of health-related microorganisms in water by disinfection processes. *Wat. Sci. Tech.*, **3**, 179-196.

SOBSEY M., FUJI T. and SHIELDS P.A. (1988). Inactivation of hepatitis A virus and model viruses in water by free chlorine and monochlorine. In "Proceedings of the international conference for water and wastewater microbiology "International association for water pollution research and control. Pergamon Press. New York.

SOBSEY M.D. (1993). The use of molecular techniques for the detection of viruses in environmental samples. *Trends in Microbial ecology*. R. Guerrero and C. Pedros-Alio (eds). Spanish society for microbiology, 601-606.

SOBSEY M.D. and GLASS J.S. (1980). Poliovirus concentration from tap water with electropositive adsorbent filters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **40**, 201-210.

SOBSEY M.D. and HICKEY A.R. (1985). Effects of humic and fulvic acids on poliovirus concentration from water by microporous filtration. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 259-264.

SOCKETT Ph., WESR P.A. and JACOBS M. (1985). Shellfish and public health. *PHLS, Microbiol. Digest*, **2**, 29-35.

SPRINGTHORPE V.S., TOH C.L., ROBERTSON W.J. and SATTAR S.A. (1993). In situ survival of indicator bacteria, MS2 Phage and human pathogenic viruses in river water. *Wat. Sci. Tech*, **27**, 413-420.

STETLER R.E. (1984) Coliphage as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 668-670.

STETLER R.E., WALTRIP S.C. and HURST C.J. (1992). Virus removal and recovery in the drinking water treatment strain. *Wat. Res.*, **26**, 727-731.

STRAUB T.M., PEPPER I.L. and GERBA C.P. (1994). Detection of naturally occurring enterovirus and hepatitis A virus in undigested and anaerobically digested sludge using the polymerase chain reaction. *Can. J. Microbiol.*, **40**, 884-888.

TANG Y.W., WANG J.X., XU Z.Y., GUO Y.F., QUIAN W.H. and XU J.X. (1991). A serologically confirmed, case-control study, of a large outbreak of hepatitis A in China, associated with consumption of clams. *Epidemiol. Infect.*, **107**, 651-657.

- TARTERA C. and JOFRE J.** (1987). Bacteriophages active against *Bacteroides fragilis* in sewage polluted waters. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1632-1637.
- TARTERA C., JOFRE J. and LUCENA F.** (1988). Relation ship between numbers of enteroviruses and bacteriophages infecting *Bacteroides fragilis* in different environment sample. *Environ. tech. Lett.*, **9**, 407-410.
- TARTERA C., LUCENA F. and JOFRE J.** (1989). Human origin of *Bacteroides fragilis* bacteriophages present in the environment. *Appl. Env. Microbiol.*, **55**, 2696-2701.
- TAYLOR G.R.** (1982). The effects of disinfectants on picornavirus structure and infectivity in : *Proc. Intl Symp. viruses and disinfection of water and wastewater*. M. Butler, A.R. Medlin and R. Morris (eds). Univ. Surrey Press. Guil Ford. Surrey. UK, 289-297.
- TICEHURST J.R., RACANIELLO V.R., BAROUDY B.H., BALTIMORE D., PURCELL R.H. and FEINSTONE S.H.** (1983). Molecular and characterization of hepatitis A virus cDNA. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)*, **80**, 5885-5889.
- TORANZO A.E., BARJA J.L. and HETRICK F.M.** (1983). Mechanism of poliovirus inactivation by cell-free filtration of marine bacteria. *Can J. Microbiol.*, **29**, 1481-1486.
- TORANZOS G.A. and GERBA C.P.** (1989). An improved method for the concentration of rotaviruses from large volumes of water. *J. Virol. Methods*, **24**, 131-140.
- TORANZOS G.A., GERBA C.P. and HANSSEN H.** (1986). Simple field method for concentration of viruses from large volumes of water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 431-432.
- TRUDEL M. and PAYMENT P.** (1993). Ultracentrifugation, 67-81. In *Payment and Trudel. Methods and Techniques in Virology* Marcel Dekker (New-York).
- TSAI Y.L. and OLSON B.H.** (1992a). Detection of low numbers of bacterial cells in soils and sediments by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 754-757.
- TSAI Y.L. and OLSON B.H.** (1992b). Rapid method for separation of bacteria DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2292-2295.
- TSAI Y.L., SOBSEY M.D., SANGERMANO L.R. and PALMER C.J.** (1993). Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcription-polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3488-3491.
- TSAI Y.L., TRAN B., SANGERMANO L.R. and PALMER C.J.** (1994). Detection of poliovirus, hepatitis A virus and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *App. Environ. Microbiol.*, **60**, 2400-2407.
- TULCHINSKY T.H., BURLA E., HALPERIN R., BONN J. and OSTROY P.** (1993). Waterborne disease and enteric disease in Israel, 1976-92. *Isr. J. Med. Sci.*, **29**, 783-790.
- TULCHINSKY T.H., LEVINE I. and SWARTZ T.A.** (1982). Waterborne enteric disease outbreaks in Israel 1976-1980. Abstract of the International Symposium on « Enteric viruses in water », Herzlia, Israel, December 12-16.

- TYRRELL S.A., RIPPEY S.R. and WATKINS W.D.** (1995). Inactivation of bacterial and viral indicators in secondary sewage effluents using chlorine and ozone. *Wat. Res.*, **29**, 2483-2490.
- UHNOO I., OLDING-STENKVIST E. and KREUGER A.** (1986). Clinical features of acute gastroenteritis associated with rotavirus, enteric adenoviruses and bacteria. *Arch. Dis. Child*, **61**, 732-738.
- VAN DRIN J.** (1988). The single stranded RNA bacteriophages. In Fraenkel Conredt H., Wagener R. (editors). *The viruses* New-York : Plenum Publishing, 116-166.
- VANDEN BOSSCHE G., WUSTMANN U. and KRIETEMEYER S.** (1994). Ozone disinfection dynamics of enteric viruses provide evidence that infectious titer reduction is triggered by alterations to viral colloidal properties. *Microbiol. Res.*, **179**, 1-20.
- VANTELON D.** (1996). Etude de la méthodologie de concentration des phages de *Bacteroides fragilis* à partir du milieu hydrique. Mémoire de DEA (Chimie et Microbiologie de l'Eau). Nancy, France.
- VAUGHN J.M. and METCALF T.G.** (1975). Coliphage as indicators of enteric viruses in shellfish and shellfish raising estuarine waters. *Wat. Res.*, **9**, 613-616.
- VAUGHN J.M., CHEN Y.S. and THOMAS M.Z.** (1986). Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, **51**, 391-394.
- VAUGHN J.M., CHEN Y.S., LINDBURG K. and MORALES D.** (1987). Inactivation of human and simian rotaviruses by ozone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 2218-2221.
- VILAGINES P., SARRETTE B. et VILAGINES R.** (1988). Détection en continu du poliovirus dans des eaux de distribution publique. *C.R. Acad. Sci.*, **307**, 171-176
- VILAGINES P., SARRETTE B., HUSSON G. et VILAGINES R.** (1992). Définition des conditions optimales d'adsorption du poliovirus type 1 sur de la laine de verre sodo-calcique : Application à des eaux de distribution et des eaux résiduaires. *J. Fr. Hydrol.*, **23**, 101-117.
- VILAGINES Ph., SARRETTE B., HUSSON G. et VILAGINES R.** (1989). Concentration à pH neutre des virus hydriques dans des eaux de surface : Etude quantitative et qualitative. *J. Fr. Hydrol.*, **20**, 193-202.
- VILAGINES Ph., SARRETTE B., HUSSON G. et VILAGINES R.** (1993). Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Wat. Sci. Tech.*, **27**, 299-306.
- WAIT D.A. and SOBSEY M.D.** (1983). Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 379-385.
- WAIT D.A. HACKNEY C.A., CAVRICK R.J., LOVELACE G. and SOBSEY M.D.** (1983). Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Protect.*, **46**, 493-498.
- WALTER R., MACHT W., DURKOP J., HECHT R., HORNIG V. and SCHULZE P.** (1989). Virus levels in river waters. *Wat. Res.*, **23**, 133-138.
- WARD R.L.** (1978). Mechanism of poliovirus inactivation by ammonia. *J. Virol.*, **26**, 299-305.

- WARD R.L., KNOWLTON D.R. and WINSTON P.E.** (1986). Mechanism of inactivation of enteric viruses in Fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.*, **52**, 450-459.
- WATT R.D., KIRSCH E.J. and GRADY C.P.L.** (1989). Ozone consumption kinetics in filtered activated sludge effluents : a modified approach. *Water Res.*, **23**, 471-480.
- WETZ K. and KUCINSKI T.** (1991). Influence of different ionic and pH environments on structural alterations of poliovirus and their possible relation to virus uncoating. *J. Gen. Virol.*, **72**, 2541-2544.
- WETZ K., ZEICHHARDT H., WILLINGMANN P. and HABERMEHL K.O.** (1983). Dense particles and slow sedimenting particles produced by ultraviolet irradiation of poliovirus. *J. Gen. Virol.*, **64**, 1263-1275.
- WHO**, (1993). WHO guidelines for drinking water quality, Geneva, World Health Organisation 1993.
- WIEDENMANN A., FISCHER B., STRAUB U., WANG C., FLEHMIG B. and SCHOENEN D.** (1993). Disinfection of hepatitis A virus and MS2 coliphage in water by ultraviolet irradiation : comparison of UV susceptibility. *Wat. Sci. Tech.*, **27** (3-4), 335-338.
- WISWANATHAN R.** (1957). Epidemiology. *Indian J. Med. Res.*, **45**, 1-29.
- WOLFAARDT M., MOE C.L. and GRABOW W.O.K.** (1995). Detection of small round structured viruses in clinical and environmental samples by Polymerase Chain Reaction. *Wat. Sci. Tech*, **31**, 375-382.
- WONG D.C., PURCELL R.H., SREENIVASAN M.A., PRASAD S.R. and PAVRI K.M.** (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India : Evidence for a non A, non B hepatitis virus etiology. *Lancet*, **82**, 876-879.
- WRIGHT R.C.** (1989). The survival patterns of selected fecal bacteria in tropical fresh waters. *Epidem. Infect.*, **103**, 603-611.
- WYN-JONES A.P., PALLIN R., SELLWOOD J. and TOUGIANIDOU D.** (1995). Use of the polymerase chain reaction for the detection of enteroviruses in river and marine recreational waters. *Wat. Sci. tech.*, **31**, 337-344.
- YATES M.V., GERBA C.P. and KELLEY L.M.** (1985). Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 778-781.
- YATES M.V., STETZENBAC L.D., GERBA C.P. and SINCLAIR N.A.** (1990). The effect of indigenous bacteria on virus survival in ground water. *J. Environ. Sci. Health. A25*, 81-100.
- ZOLL G.J., MELCHERS W.J.G., KOPECKA H., JAMBROES G., VAN DER POEL H.J.A. and GALAMA J.M.D.** (1992). General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses : application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.*, **30**, 160-165.

Annexes

1) Milieux de culture de *Bacteroides fragilis* HSP40

a) MBB agar

La composition de ce milieu en gramme par litre est la suivante :

- Blood Agar (Oxoid)	40,0
- CaCl ₂ (Merk)	0,05
- MgSO ₄ (Merk)	0,12
- L cysteine HCl (Sigma)	0,05

Ce milieu est autoclavé à 121°C pendant 15 min. et coulé en boîte de pétri à raison de 15 mL par boîte.

b) BPRM

La composition de ce milieu en gramme par litre est la suivante :

- Base BPRM broth (Adsa Micro réf. : 2-409)	29,4 g
- CaCl ₂	0,5 g

Le milieu Base BPRM broth permet d'obtenir une concentration finale en g.L⁻¹ des composés suivants.

- Peptone de caseine	10
- Peptone de viande	10
- Extrait de levure	2
- NaCl	5
- L. cysteine	0,5
- Dextrose	1,8
- MgSO ₄	0,12

Le milieu BPRM est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 min. Après autoclavage, il est nécessaire d'ajouter pour 1 litre :

- 10 mL d'hémine 0,1 % dans NaOH 0,02 %
- 25 mL de Na₂CO₃ 1M
- Ajuster le pH à 7 avec HCl 35 %

Rq : L'hémine et le Na₂CO₃ sont stérilisés par filtration (0,22 µm).

c) BPRM soft agar

Le milieu BPRM soft agar est constitué de milieu BPRM additionné de 10g.L⁻¹ de Bacto agar. Après autoclavage, comme pour le milieu BPRM, il est nécessaire d'ajouter de l'hémine, du Na₂CO₃ et d'ajuster le pH à 7.

2) Milieux de culture d'*E. coli*

a) Modified Scholtens Broth (MSB)

La composition de ce milieu en gramme par litre est la suivante :

- Peptone de caseine	10
- Peptone de viande	12
- Extrait de levure	3
- NaCl	3
- Na ₂ CO ₃ (150 g.L ⁻¹)	0,5
- MgCl ₂ (100g dans 50mL H ₂ O)	1,8

Le milieu BPRM est ensuite autoclavé à 121°C pendant 15 min.

b) Modified Scholtens Agar (MSA)

Le milieu MSA est constitué de milieu MSB additionné de 20 g.L⁻¹ de Bacto-agar.

c) Semi-solid Modified Scholtens Agar (ssMSA)

Le milieu ssMSA est constitué de milieu MSB additionné de 10 g.L⁻¹ de Bacto-agar.

3) Programme informatique.

```

program PCR;
{Ce programme permet le calcul et la comparaison des coefficients
d'inactivation de la survie des virus dans differents milieux}

label 100;
type tableau50 = array [1..50] of integer;
type indic = 0..1;
type tableauI = array [1..50] of indic;

var i, nbmes1,nbmes2:integer;
    lambda01,lambda02,coef,coef1,coef2,coefcom,lnlambda,ecl,ec2:real;
    T1,T2:tableau50;
    R1,R2:tableauI;
    COMP,REINIT:string[3];

function FUNCT(nbmes:integer;c,lambda0:real;T:tableau50;R:tableauI):real;
{Calcule la valeur de la fonction de vraisemblance au point c}

var i:integer;
    s:real;

begin
    s:=0;
    for i:=1 to nbmes do
        begin
            if (R[i]=0) then
                begin
                    if ((T[i]-1)*ln(c) > -30) then
                        s:= s - T[i]*exp((T[i]-1)*ln(c))
                    end
                else
                    if (T[i]*ln(c) < ln(20/lambda0)) then
                        s:= s + (T[i]*exp((T[i]-1)*ln(c)))/(exp(lambda0*exp(T[i]*ln(c)))-1)
                    end;
                FUNCT:=s
            end;
        end;

function ECARTYPE(nbmes:integer;c,lambda0:real;T:tableau50;R:tableauI):real;
{Calcule l'cart-type de c}

var i:integer;
    ec:real;

begin
    ec:=0;
    for i:=1 to nbmes do
        begin
            if (R[i] = 0) then
                begin
                    if ((T[i]-2)*ln(c) > -40) then
                        ec:=ec - T[i]*(T[i]-1)*exp((T[i] - 2)*ln(c))
                    end
                else
                    if (T[i]*ln(c) < ln(30/lambda0)) then
                        ec:=ec + (exp(lambda0*exp(T[i]*ln(c)))*T[i]*exp((T[i]-2)*ln(c))*
(T[i]-1-T[i]*lambda0*exp(T[i]*ln(c))) + (exp((T[i]-2)*ln(c))*T[i]*
(1-T[i])))/sqrt(exp(lambda0*exp(T[i]*ln(c)))-1)
                    end
                end;
            end;
        end;
    end;

```

```

end;
ec:=-1/(ec*lambda0);
ec:=sqrt(ec);
ECARTYPE:=ec
end;

procedure DICH(nbmes:integer;lambda0:real;T:tableau50;R:tableauI;
var coef:real);
{calcule la solution de l'equation de vraisemblance}

label 10;
var c1,c2,ci,f1,f2:real;

begin
  c1:=0.96;      {initialisation: modifier eventuellement ces valeurs}
  c2:=0.98;
  f1:=FUNCT(nbmes,c1,lambda0,T,R);
  f2:=FUNCT(nbmes,c2,lambda0,T,R);
  if (f1*f2 > 0) then
    begin
      writeln('f1*f2>0, reinitialiser');
      REINIT:='OUI';
      goto 10
    end;
  while abs(c1-c2)>=0.00001 do
    begin
      ci:=(c1+c2)/2;
      writeln('ci=',ci:6:4,' ');
      f1:=FUNCT(nbmes,c1,lambda0,T,R);
      f2:=FUNCT(nbmes,ci,lambda0,T,R);
      if (f1*f2>0)then
        c1:=ci
      else
        c2:=ci;
      end;
      coef:=(c1 + c2)/2;
    10:
  end;

procedure DICHCOM(nbmes1,nbmes2:integer;lambda01,lambda02:real;
T1,T2:tableau50;R1,R2:tableauI; var coefcom:real);
{calcule le coefficient d'inactivation commun a deux courbes de survie}

label 20;
var c1,c2,ci,f1,f2:real;

begin
  c1:=0.96;      {initialisation: modifier eventuellement ces valeurs}
  c2:=0.98;
  f1:=lambda01*FUNCT(nbmes1,c1,lambda01,T1,R1)+lambda02*FUNCT(nbmes2,c1,
lambda02,T2,R2);
  f2:=lambda01*FUNCT(nbmes1,c2,lambda01,T1,R1)+lambda02*FUNCT(nbmes2,c2,
lambda02,T2,R2);
  if (f1*f2 > 0) then
    begin
      writeln('f1*f2 > 0, reinitialiser');
      REINIT:='OUI';
      goto 20
    end;
  while abs(c1 -c2)>=0.00001 do

```

```

begin
  ci:=(c1 + c2)/2;
  writeln('ci=',ci:6:4,' ');
  f1:=lambda01*FUNCT(nbmes1,c1,lambda01,T1,R1)+lambda02*FUNCT(nbmes2,
  c1,lambda02,T2,R2);
  f2:=lambda01*FUNCT(nbmes1,ci,lambda01,T1,R1)+lambda02*FUNCT(nbmes2,
  ci,lambda02,T2,R2);
  if (f1*f2>0) then
    c1:=ci
  else
    c2:=ci;
  end;
  coefcom:=(c1+c2)/2;
20:
end;

procedure LRT(lambda01,lambda02,coef1,coef2,coefcom:real;T1,T2:tableau50;
R1,R2:tableauI;var lnlambda:real);
{Calcule -2lnlambda pour le test du rapport de vraisemblance}

var i:integer;

begin
  lnlambda:=0;
  for i:=1 to nbmes1 do
  begin
    if (R1[i] = 0) then
    begin
      if (T1[i]*ln(coef1)>-30) then
        lnlambda:=lnlambda -lambda01*(exp(T1[i]*ln(coef1))-exp(T1[i]*ln(coefcom)))
      end
    else
    begin
      if (T1[i]*ln(coefcom)< -30 - ln(lambda01)) then
        lnlambda:= lnlambda + T1[i]*ln(coef1/coefcom)
      else
        if (T1[i]*ln(coefcom) < ln(20/lambda01)) and
          (T1[i]*ln(coef1) < ln(20/lambda01)) then
          lnlambda:=lnlambda+ln((1-exp(-lambda01*exp(T1[i]*ln(coef1))))/
          (1-exp(-lambda01*exp(T1[i]*ln(coefcom)))))
        end
      end;
    for i:=1 to nbmes2 do
    begin
      if (R2[i] = 0) then
      begin
        if (T2[i]*ln(coef2)>-30) then
          lnlambda:=lnlambda-lambda02*(exp(T2[i]*ln(coef2))-exp(T2[i]*ln(coefcom)))
        end
      else
      begin
        if (T2[i]*ln(coefcom)< -30 - ln(lambda02)) then
          lnlambda:= lnlambda + T2[i]*ln(coef2/coefcom)
        else
          if (T2[i]*ln(coefcom) < ln(20/lambda02)) and
            (T2[i]*ln(coef2) < ln(20/lambda02)) then
            lnlambda:=lnlambda+ln((1-exp(-lambda02*exp(T2[i]*ln(coef2))))/
            (1-exp(-lambda02*exp(T2[i]*ln(coefcom)))))
          end
        end;
      lnlambda:=2*lnlambda
    end;
  end;
end;

```

```

begin  {Main program}
  REINIT:='NON';
  writeln('Voulez-vous effectuer un test de comparaison ? (OUI/NON)');
  readln(COMP);
  writeln('Entrez le nombre de mesures effectuees pour');
  writeln('la 1ere courbe de survie');
  readln(nbmes1);
  for i:= 1 to nbmes1 do
    begin
      writeln('Entrez la valeur du temps correspondant');
      writeln('a la ',i:2,'eme mesure');
      readln(T1[i]);
      writeln('Entrez 1 (resp. 0) si le resultat est positif (resp. negatif)');
      readln(R1[i])
    end;
  if (COMP = 'OUI') then
    begin
      writeln('Entrez le nombre de mesures effectuees pour');
      writeln('la 2eme courbe de survie');
      readln(nbmes2);
      for i:=1 to nbmes2 do
        begin
          writeln('Entrez la valeur du temps correspondant');
          writeln('a la ',i:2,'eme mesure du 2eme essai');
          readln(T2[i]);
          writeln('Entrez 1 (resp. 0) si le resultat est positif (resp. negatif)');
          readln(R2[i])
        end
      end;
    writeln('Entrez la densite virale initiale');
    readln(lambda01);
    if (COMP = 'OUI') then
      begin
        writeln('Entrez la densite virale initiale de la 2eme serie');
        readln(lambda02)
      end;
    DICH(nbmes1, lambda01, T1, R1, coef1);
    if (REINIT='OUI') then goto 100;
    writeln('La valeur du coefficient d'inactivation est:',coef1:8:6,' ');
    ec1:=ECARTYPE(nbmes1,coef1,lambda01,T1,R1);
    writeln('La valeur de l'ecart-type est: ',ec1:8:6,' ');
    if (COMP = 'OUI') then
      begin
        DICH(nbmes2, lambda02, T2, R2, coef2);
        if (REINIT='OUI') then goto 100;
        writeln('La valeur du 2eme coef. d'inactivation est:',coef2:8:6,' ');
        ec2:=ECARTYPE(nbmes2,coef2,lambda02,T2,R2);
        writeln('La valeur de l'ecart-type est: ',ec2:8:6,' ');
        DICHCOM(nbmes1,nbmes2,lambda01,lambda02,T1,T2,R1,R2,coefcom);
        writeln('La valeur du coefficient commun aux deux series');
        writeln('est: ',coefcom:8:5,' ');
        LRT(lambda01,lambda02,coef1,coef2,coefcom,T1,T2,R1,R2,lnlambda);
        writeln('La valeur de -2lnlambda est: ',lnlambda:8:6,' ');
      end;
    100:
  end.

```

Glossaire

cox B3 : coxackievirus B3

VHA : virus de l'hépatite A

ECP : effet cytopathogène

RT : rétro-transcription

PCR : polymerase chain reaction, amplification par polymérisation en chaîne

dNTP : désoxynucléotides triphosphates

dATP : désoxyadénosine triphosphate

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

UFP : unités formant plages

NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathogènes

NPPUG : nombre le plus probable d'unités génomiques

Taq : *Thermophilus aquaticus*

UV : ultra-violet

RNases : ribonucléases

MES : matières en suspension

COT : carbone organique total

DBO₅ : demande biochimique en oxygène après 5 jours

DCO : demande chimique en oxygène

DEPC : diethyl pyrocarbonate

BET : bromure d'éthidium

Publications et Communications

Publications

- **Gantzer C., Quignon F. and Schwartzbrod L.** (1994). Poliovirus 1 adsorption onto and desorption from montmorillonite in seawater. Survival of the adsorbed virus. *Environmental Technology*. **15**, 271-278.
- **Gantzer C., Levi Y. and Schwartzbrod L.** (1996). Heat effect on coxsackievirus B3 genome in water. *Zentralblatt für Hygiene. (sous presse)*.
- **Gantzer C., Senouci S., Maul A., Levi Y. and Schwartzbrod L.** Evaluation of concentration methods for the detection of enterovirus in wastewater using RT-PCR. *Journal of Virological Methods. (Acceptée en octobre 1996, à paraître)*.
- **Gantzer C., Dubois E., Crance J-M., Billaudel S., Kopecka H., Schwartzbrod L., Pommepuy M. et Le Guyader F.** Devenir des virus entériques en mer. Influence des paramètres environnementaux. *Oceanologica Acta. (Publication soumise en septembre 1996)*.
- **Gantzer C., Maul A., Levi Y. and Schwartzbrod L.** Fate of the genome and infectious particules of coxsackie B3 virus in phosphate buffer saline. *Water Research. (Publication soumise en mars 1996)*.
- **Gantzer C., Levi Y. and Schwartzbrod L.** Survival of coxsackievirus B3 and its genome in sterile PBS. *Water Science and Technology. (Publication soumise en octobre 1996)*.
- **Senouci S., Maul A., Gantzer C. and Schwartzbrod L.** Comparison of two adsorption-elution techniques for the concentration of virus from wastewater. *Water Science and Technology. (Publication soumise en octobre 1996)*.
- **Vincent R., Gantzer C., Amstutz S. and Schwartzbrod L.** Survival of poliovirus in sterile seawater at 25°C with montmorillonite. *Water Science and Technology. (Publication soumise en octobre 1996)*.

Communications

- **Quignon F., Gantzer C. et Schwartzbrod L.** Adsorption des virus sur sites non spécifiques.
Séminaire Adhésion-Agrégation des micro-organismes aux surfaces, Nancy, mars 1994 (communication orale).
- **Gantzer C., Quignon F., Thomas F. et Schwartzbrod L.** Survie du poliovirus 1 adsorbé sur de la montmorillonite en eau de mer. Etude des phénomènes d'adsorption-désorption.
3ème réunion européenne : Adhésion des micro-organismes aux surfaces, Chateney-Malabry, juin 1994 (communication orale).

- **Gantzer C., Senouci S., Beril C. et Schwartzbrod L.** Détection des entérovirus par RT semi-nested PCR et culture cellulaire après concentration sur laine et poudre de verre. Application aux eaux usées épurées.
4ème congrès de la société française de microbiologie, Tours, mai 1995, (communication orale).
- **Schwartzbrod L. and Gantzer C.** Man, water and enteric viruses.
The sixth international conference of the Israel Society for Ecology and Environmental Quality Sciences, Jerusalem, juin 1996. (communication orale).
- **Garin D, Biziago E., Crance J.M., Gantzer C., Levêque F., Deloince R. and Schwartzbrod L.** Survival of infectious hepatitis A virus in mineral water and seawater.
International symposium on enterically-transmitted hepatitis viruses, Val de Grâce, octobre 1995, (communication affichée).
- **Gantzer C., Levi Y. and Schwartzbrod L.** Comparison of three coxackievirus B detection methods : inoculation to new born mice, cell culture and RT-PCR.
IXème colloque international de Pont à Mousson, octobre 1996 (communication affichée).
- **Senouci S., Maul A., Gantzer C. and Schwartzbrod L.** Virus recovery from wastewater after concentration using glass powder and glass wool.
IXème colloque international de Pont à Mousson, octobre 1996 (communication affichée).



Nom, Prénom : G A N T Z E R Christophe

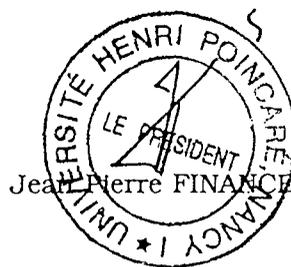
Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 24 DÉC 1996 UHP 140

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1



Résumé

Au début des années 1990, quelques voix se sont élevées dans la communauté scientifique, en particulier parmi les spécialistes de biologie moléculaire préconisant l'utilisation de la PCR pour le diagnostic virologique du milieu hydrique. Certains postulaient que la détection du génome viral dans une eau, une boue ou un coquillage pouvait apporter la preuve que ce milieu était contaminé par le virus infectieux correspondant. D'autres affirmaient au contraire qu'une « PCR positive » ne pouvait en aucun cas indiquer la présence de virus infectieux, tout au plus pouvait-elle servir de témoin de contamination virale.

La présence de génome viral est-elle le témoin d'une présence de virus infectieux ou simplement un témoin d'une contamination virale plus ou moins ancienne ?

L'objectif de ce travail est d'apporter des éléments de réponses à cette interrogation et dans ce cadre, nous avons considéré qu'il était fondamental de comparer le comportement du génome et du virus infectieux dans le milieu hydrique. En effet, pour que la présence de génome puisse témoigner de celle de virus infectieux, il semble nécessaire que la capacité de survie de ces 2 entités soit identique.

La première partie réalisée en milieu hydrique artificiellement contaminé par du coxsackievirus B3 et du bactériophage de *Bacteroides fragilis* montre que :

- une incubation à forte température ($> 55^{\circ}\text{C}$) se traduit par l'inactivation rapide du virus infectieux, alors que le génome reste présent jusqu'à des températures de 95°C ;

- en milieu PBS à 25°C , la survie du génome est deux fois supérieure à celle du virus infectieux et du phage de *Bacteroides fragilis*. La présence de Na-montmorillonite augmente la persistance du génome d'un facteur 2, alors qu'elle n'augmente celle du virus infectieux que de quelques jours ;

- en eau d'adduction (chlore résiduel $0,08 \text{ mg.L}^{-1}$), la persistance du génome est là encore supérieure d'un facteur 2 à celle du virus infectieux, mais est comparable à celle du phage de *Bacteroides fragilis*. Cependant contrairement au phage, le génome et le virus infectieux sont sensibles aux faibles doses de chlore résiduel ;

- en eau de forage, la persistance du génome est équivalente à celle du virus infectieux, alors que le phage survit 2 fois plus longtemps.

En milieu PBS et en eau d'adduction, le génome ne constitue qu'un indicateur de contamination virale au même titre que le phage de *Bacteroides fragilis*. Cependant, il semble qu'en eau de forage la détection de génome peut témoigner de la présence de virus infectieux.

La deuxième partie consiste à rechercher le génome d'entérovirus, les phages de *Bacteroides fragilis* et les coliphages somatiques comparativement aux entérovirus infectieux dans des eaux usées traitées de qualité différente.

Les résultats montrent que :

- la détection d'entérovirus infectieux, de génome d'entérovirus et de phage de *Bacteroides fragilis* doit s'effectuer après concentration des eaux usées traitées ;

- la densité en coliphage somatique est suffisante pour l'analyse directe des eaux.

- la détection de génome entéroviral ne constitue qu'un indicateur de contamination virale ;

- les phages de *Bacteroides fragilis* semblent constituer le meilleur indicateur de présence d'entérovirus contrairement aux coliphages qui ne sont que des indicateurs d'efficacité de traitement. Le génome entéroviral qui présente une fréquence de détection analogue à celle des phages des *Bacteroides fragilis* semble lui aussi constituer un bon indicateur de contamination entérovirale.

MOTS-CLES : Eau ; entérovirus ; phage de *Bacteroides fragilis* ; RT-PCR ; survie.