



HAL
open science

Apport de la biologie moléculaire pour une approche analytique et sanitaire de la contamination virale de l'eau d'alimentation dans le département de l'Isère

Hervé Soule

► **To cite this version:**

Hervé Soule. Apport de la biologie moléculaire pour une approche analytique et sanitaire de la contamination virale de l'eau d'alimentation dans le département de l'Isère. Sciences pharmaceutiques. 1996. dumas-01798409

HAL Id: dumas-01798409

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01798409v1>

Submitted on 23 May 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

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 n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

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 au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.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/juridique/droit-auteur>

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



D 115 017871 6

Université Joseph FOURIER
Grenoble I - Sciences Technologie Médecine
UFR de PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

Année 1996

Mémoire n° 7007

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE
PHARMACIE SPECIALISEE**

Présenté et soutenu publiquement

le 14 Mars 1996, par

Hervé SOULE

[Données à caractère personnel]

*Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :*

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE POUR UNE
APPROCHE ANALYTIQUE ET SANITAIRE DE LA
CONTAMINATION VIRALE DE L'EAU D'ALIMENTATION DANS
LE DEPARTEMENT DE L'ISERE**

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur J. CALOP
Professeur de Pharmacie Clinique - Grenoble

MEMBRES

Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN
Professeur de Virologie - Grenoble
Monsieur le Professeur B. JOLY
Professeur de Bactériologie-Virologie - Clermont-Ferrand
Madame le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER
Docteur en Médecine - Grenoble
Madame le Docteur M. C. ALBERTO-GONDOUIN
Docteur en Pharmacie - Grenoble
Monsieur J. L. POTELON
Ingénieur sanitaire - Grenoble



Université Joseph FOURIER
Grenoble I - Sciences Technologie Médecine
UFR de PHARMACIE
Domaine de la Merci - La Tronche

Année 1996

Mémoire n°

**MEMOIRE DU DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE
PHARMACIE SPECIALISEE**

Présenté et soutenu publiquement

le 14 Mars 1996, par

Hervé SOULE

[Données à caractère personnel]

*Conformément aux dispositions de l'Arrêté
du 4 Octobre 1988 tient lieu de :*

**THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE
DOCTEUR EN PHARMACIE**

**APPORT DE LA BIOLOGIE MOLECULAIRE POUR UNE
APPROCHE ANALYTIQUE ET SANITAIRE DE LA
CONTAMINATION VIRALE DE L'EAU D'ALIMENTATION DANS
LE DEPARTEMENT DE L'ISERE**

JURY

PRESIDENT

Monsieur le Professeur J. CALOP
Professeur de Pharmacie Clinique - Grenoble

MEMBRES

Monsieur le Professeur J. M. SEIGNEURIN
Professeur de Virologie - Grenoble
Monsieur le Professeur B. JOLY
Professeur de Bactériologie-Virologie - Clermont-Ferrand
Madame le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER
Docteur en Médecine - Grenoble
Madame le Docteur M. C. ALBERTO-GONDOUIN
Docteur en Pharmacie - Grenoble
Monsieur J. L. POTELON
Ingénieur sanitaire - Grenoble



A toute ma famille que j'apprécie tant,

A mes amis,

A la mémoire de mes grands parents

A Monsieur le Professeur Jean CALOP,
PRESIDENT DU JURY

Votre grande taille et votre charisme impressionnent.

Ils sont à la hauteur de votre dynamisme et de votre rigueur qui ont marqué mes semestres d'internat passés dans votre service, et forgé en moi une grande admiration pour votre personne.

Vous me faites l'honneur d'accepter d'être le Président de ce jury.

Veillez trouver ici l'expression de mon profond respect et de toute ma gratitude.

A Monsieur le Professeur Jean Marie SEIGNEURIN,

qui m'a permis de réaliser ce travail au sein de son laboratoire.

Je vous suis très reconnaissant pour la confiance que vous m'avez accordé dans la réalisation de cette étude et pour votre enthousiasme tout au long de nos travaux.

Qu'il me permette d'exprimer ici le témoignage de ma profonde gratitude et de ma grande admiration.

A Monsieur le Professeur Bernard Joly,

*Mes années passées à la faculté de pharmacie de Clermont-Ferrand
resteront une période très agréable, durant laquelle j'ai pu apprécier la qualité de vos
enseignements.*

Votre présence dans ce jury me touche beaucoup et m'honore.

Veillez trouver ici l'expression de mon grand respect.

A Madame le Docteur Bénédicte GRATACAP-CAVALLIER,

qui a suivi et dirigé ce travail.

*Sa gentillesse et sa compétence n'ont d'égales que son charme
et son professionnalisme.*

Travailler avec elle a été pour moi un grand plaisir.

*Je voudrais que tu trouves ici, Bénédicte, l'expression de mes
remerciements les plus sincères.*

A Madame le Docteur Marie-Christine Alberto-Gondouin,

Une grande gentillesse et une imperturbable bonne humeur vous caractérisent.

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail, et vous témoigne ici l'expression de ma profonde gratitude.

A Monsieur Jean Luc POTELON,

*Vos fonctions font de vous un acteur essentiel de la protection
sanitaire des ressources hydriques et des populations.*

*Vous avez su me conseiller avec justesse et modération pour l'analyse de
ces travaux.*

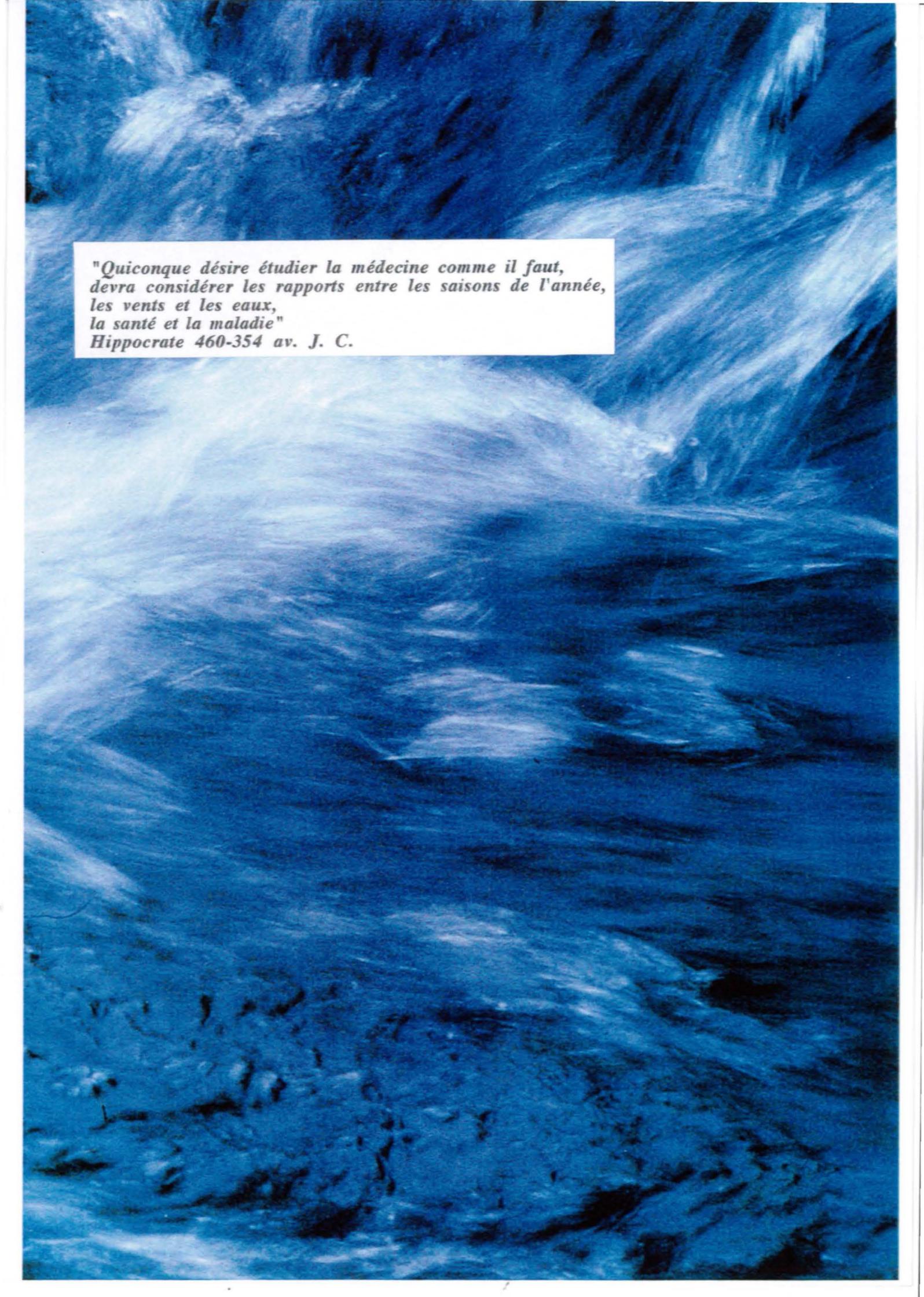
*Je vous remercie d'avoir accepté de participer à ce jury aussi
chaleureusement.*

Un grand merci à Odile GENOULAZ pour son immense aide dans la réalisation de cette étude.

En souhaitant qu'elle trouve dans ce mémoire l'échos de ses coups de nerf et de sa philosophie.

*Mes remerciements à
Monsieur Liu Jing-Xing (Université Médicale de Shanghai - République Populaire de Chine),
aux techniciennes du laboratoire hospitalier de virologie, secteur de la culture,
ainsi qu'à Babeth, Patricia, et Karen qui ont toutes, à un moment ou à un autre, été mouillées dans cette étude aquatique !*

*Enfin, je tiens à adresser mes remerciements
à Madame le Docteur P.Chevallier, Mesdames Bouvier et Grimault, ainsi qu'à tous les préleveurs (Laboratoire Régional d'Analyses des Eaux de Grenoble),
à Monsieur le Docteur P.François (Centre Hospitalier Universitaire de Grenoble),
à Madame le Docteur B.Le Bot et à Monsieur le Docteur Decoux (Centre Hospitalier de Voiron),
à Messieurs les Docteurs G.Pierre et Colombani (Centre Hospitalier de Romans),
et à Monsieur Belleville (DDASS Isère),
qui ont tous trempé dans ce travail.*



*"Quiconque désire étudier la médecine comme il faut,
devra considérer les rapports entre les saisons de l'année,
les vents et les eaux,
la santé et la maladie"
Hippocrate 460-354 av. J. C.*

Introduction

INTRODUCTION

En dépit des traitements de potabilisation de l'eau destinée à la consommation humaine et des règles sanitaires en vigueur, la contamination microbiologique de l'eau n'est pas exceptionnelle. La détection de bactéries d'origine fécale dans certains prélèvements le confirme, bien que les répercussions sur la santé humaine ou animale passent généralement inaperçues.

En ce qui concerne les virus du milieu hydrique, le problème est double : leur mise en évidence est très délicate et non normalisée à ce jour, et leur impact sanitaire est quasiment inconnu en dehors de tout contexte épidémique.

Ces faiblesses, tant techniques qu'épidémiologiques, sont à l'origine du vide législatif qui entoure la qualité virologique de l'eau destinée à la consommation humaine. Actuellement, il existe une exigence réglementaire uniquement pour les entérovirus, qui doivent être absents. Mais leur recherche est rarement pratiquée, et, si la technique de mise en évidence préconisée est l'isolement sur culture cellulaire, il règne un flou inacceptable autour du volume à analyser et de la technique de concentration à adopter.

Au cours de ces dix dernières années, le développement des techniques de biologie moléculaire a mis entre les mains des scientifiques des outils très sensibles. Ces prouesses technologiques ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude des virus dans l'environnement, et plus particulièrement dans l'eau.

Une synthèse bibliographique va tout d'abord permettre de préciser le risque viral d'origine hydrique, et de le resituer dans le contexte de la pathologie infectieuse à transmission hydrique. Puis, nous présenterons les différentes méthodologies pour la détection des virus dans l'eau.

Notre expérimentation rapporte et commente les résultats d'une étude réalisée au laboratoire de virologie médicale moléculaire du Professeur SEIGNEURIN, avec la participation du laboratoire régional d'analyse des eaux de Grenoble dirigé par Madame le Docteur Chevallier, et des services de pédiatrie et laboratoires d'analyses médicales des centres hospitaliers de Grenoble, Voiron et Romans. Ce travail devait nous permettre la validation d'une méthode d'analyse mise au point en laboratoire, et une approche des conséquences de la contamination virologique de l'eau d'alimentation sur la santé humaine.

Partie Bibliographique

CHAPITRE 1

RISQUE VIRAL D'ORIGINE HYDRIQUE

1. LES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE ET LEUR POUVOIR PATHOGENE

Les virus abondent dans le milieu aquatique, aussi bien dans les eaux douces que marines. Les virus du milieu hydrique qui présentent un intérêt direct en santé humaine sont ceux qui sont excrétés dans les selles d'individus infectés.

Plus de 130 virus pathogènes sont éliminés dans les féces humaines (110). Ces virus, appelés virus entériques, ne possèdent généralement pas d'enveloppe, et sont très résistants dans l'environnement. Le plus souvent, la capsid e a une symétrie icosaédrique et l'acide nucléique est un ARN monobrin. Leur taille varie de 20 nm pour les plus petits à 120 nm pour les plus gros.

Ces virus appartiennent à plusieurs familles et genres.

1. 1. ENTEROVIRUS

Ces petits virus appartiennent à la famille des picornaviridae et mesurent de 20 à 30 nm. Leur transmission est directe ou indirecte par l'eau ou les aliments souillés. Ils sont largement présents dans les eaux usées.

Ils sont responsables d'infections inapparentes en général, surtout pendant l'enfance. Les manifestations pathologiques sont peu spécifiques et très variées (101) (Tableau 1).

La plupart de ces virus sont cultivables : poliovirus types 1, 2 et 3, coxsackievirus B1 à B6, certains coxsackievirus de type A, échovirus et entérovirus 68 à 71.

1. 2. VIRUS DES HEPATITES

Les virus des hépatites A (VHA) et E (VHE) mesurent 27 nm de diamètre. Leur transmission est soit directe à partir des fèces contaminées, soit indirecte par l'eau ou les coquillages.

Le VHA a longtemps été assimilé à un entérovirus, l'entérovirus 72.

Quant au VHE, il est particulièrement grave chez la femme enceinte, puisque l'évolution est fatale dans 20% des cas.

1. 3. VIRUS DES GASTRO-ENTERITES

De nombreux virus entériques provoquent des gastro-entérites. Ces virus sont le plus souvent non cultivables ou "fastidieux" : rotavirus, adénovirus 40 et 41, virus de Norwalk, calicivirus, astrovirus, "petits virus" structurés ou non. Tous ces virus non cultivables ont été découverts grâce à la microscopie électronique qui nécessite une grande quantité de virus intacts ($>10^5$ ou 10^6 /ml). Quelques selles peuvent contenir plusieurs virus potentiellement pathogènes, agissant en synergie (95). Il existe également de très nombreux porteurs asymptomatiques.

1. 3. 1. Rotavirus

Ils appartiennent à la famille des réoviridae. Ils possèdent un ARN bicaténaire composé de 11 segments et une double capsid (interne et externe). Leur taille est comprise entre 70 et 80 nm.

Les rotavirus représentent la cause la plus fréquente de diarrhée chez l'enfant et le nourrisson (58, 95). Ils sont responsables de 30 à 50% des diarrhées infantiles. Le pic de fréquence des diarrhées à rotavirus survient avant l'âge de 2 ans (58), et 61% des infections sont des réinfections. 80% de la population a des anticorps à partir de l'âge de 3 ans (95).

Une diarrhée accompagnée de vomissements et de fièvre, survient de façon aiguë après une incubation de 24 à 48 heures. La guérison nécessite 5 à 6 jours. Mais l'infection est souvent inapparente : chez 40% des enfants contaminés et chez presque tous les adultes.

La classification actuelle comprend le groupe A et les groupes B et C chez l'homme. D'autres groupes sont décrits chez l'animal. La plupart des rotavirus humains appartiennent au groupe A. C'est la caractérisation antigénique de la protéine VP7 de capsid externe qui permet de définir différents sérotypes. Ainsi, le groupe A comprend plusieurs sérotypes, les types 1 à 4 étant les plus fréquents chez l'homme. Les rotavirus des groupes B et C se rencontrent essentiellement en Chine. Le rotavirus sévit de façon endémique le plus souvent en hiver et au début du printemps dans les pays tempérés, en période sèche dans les pays tropicaux (95). Sa transmission est fécale-orale, le plus souvent par manuportage (15, 37).

1. 3. 2. Réovirus

Virus appartenant également à la famille des réoviridae, ils possèdent un ARN bicaténaire. Les réovirus ont été isolés des tractus respiratoire et digestif, et leurs manifestations pathologiques sont donc diverses.

1. 3. 3. Petits virus ronds (small round viruses)

Il s'agit des calicivirus, du virus de Norwalk et apparentés, des astrovirus et des parvovirus-like.

1. 3. 3. 1. Virus de Norwalk

Petit virus mesurant 26 à 32 nm, il est responsable de diarrhées aiguës touchant les enfants et les adultes.

Associés à la diarrhée, le tableau clinique est marqué par une asthénie, une fièvre, des nausées et des vomissements importants, survenant après une incubation de 48 heures. Ce virus a souvent été associé à des épidémies à transmission hydrique (consommation de fruits de mer en particulier) (16, 20, 57).

Leur concentration dans les selles est faible (95), d'où la grande difficulté pour les détecter dans l'environnement.

1. 3. 3. 2. Calicivirus

Ces virus en forme d'étoile à 6 branches, de taille comprise entre 30 et 38 nm, sont associés à des épidémies de diarrhées et vomissements, cliniquement et épidémiologiquement proches de celles provoquées par le virus de Norwalk (95).

1. 3. 3. 3. Astrovirus

En forme d'étoile également, leur taille est un peu plus petite que celle des calicivirus et voisine de 28 nm. Ces virus ont été trouvés aussi bien chez des enfants diarrhéiques que chez des enfants bien portants. Ils sont responsables de 5% des diarrhées aiguës, et sévissent à l'état endémique.

1. 3. 3. 4. Parvovirus-like

Ces virus ont été trouvés associés à d'authentiques épidémies après absorption de fruits de mer

contaminés. Ce sont des virus à ADN monocaténaire, de diamètre compris entre 20 et 25 nm.

1. 3. 4. Coronavirus

Contrairement à la majorité des virus présentés ici, ces virus sont enveloppés et ont une capsid tubulaire. Ils ont une forme de couronne de diamètre voisin de 120 nm.

1. 3. 5. Coronavirus-like virus

Ces virus appartiennent à la famille des toroviridae. Ils provoquent des gastro-entérites chez le nouveau-né et les "grippes intestinales" de l'adulte.

1. 4. ADENOVIRUS

Virus de la famille des adénoviridae, ils possèdent un ADN bicaténaire et mesurent de 70 à 80 nm. On en distingue deux groupes : les adénovirus humains cultivables qui appartiennent aux groupes A, B, C, D, E et qui sont responsables d'infections respiratoires et de conjonctivites, et dont certains sérotypes possèdent également un pouvoir oncogène, et les adénovirus humains non cultivables qui appartiennent au groupe F (sérotypes 40 et 41). Ces derniers sont impliqués dans 5 à 12% des diarrhées aiguës du nourrisson âgé de moins de deux ans (95). Une fièvre, des vomissements et une diarrhée surviennent après une incubation qui dure 8 à 10 jours. Les manifestations cliniques peuvent persister 6 à 8 jours. Les adénovirus sont excrétés dans les selles à raison de 10^{11} virus par gramme, mais leur présence dans les selles ne signifie pas forcément diarrhée (95). Tout comme les rotavirus et les astrovirus, les adénovirus 40 et 41 sévissent plutôt sur le mode endémique.

1. 5. TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX VIRUS ENTERIQUES ET DE LEURS MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES

Virus	Nombre de sérotypes	Pathologie
Entérovirus		
Poliovirus	3	Paralyse, poliomyélite, méningite, fièvre
Coxsackievirus A	24	Herpangine, infection respiratoire, méningite, fièvre
Coxsackievirus B	6	Myocardite, manifestation cardio-vasculaire chez le nourrisson, éruption cutanée, fièvre, méningite, infection respiratoire, pleurodynie
Echovirus	34	Méningite, infection respiratoire, éruption cutanée, diarrhée, fièvre
Entérovirus 68 à 71	4	Méningite, encéphalite, infection respiratoire, conjonctivite aiguë hémorragique, fièvre
Virus des hépatites A et E	2	Hépatite infectieuse (ictère, asthénie, anorexie, nausées, vomissements, fièvre)
Rotavirus	4	Vomissements, diarrhée
Réovirus	3	Mal connue
Calicivirus	2	Vomissements, diarrhée
Virus de Norwalk	1	Vomissements et diarrhées épidémiques
Astrovirus	5	Vomissements, diarrhée
Parvovirus-like	2	Infection entérique
Coronavirus	1	Vomissements, diarrhée, entérocolite
Coronavirus-like	1	Diarrhée, "grippe intestinale"
Adénovirus	47	Pharyngite, conjonctivite, infection respiratoire, vomissements, diarrhée

Tableau 1: Virus entériques humains (d'après 59).

1. 6. LES BACTERIOPHAGES

Ces virus, de 20 à 2000 nm, non pathogènes pour l'homme, infectent les bactéries à l'intérieur desquelles ils se multiplient de la même façon que les virus animaux. Partout où il y a une flore

bactérienne, on trouve des bactériophages autochtones, spécifiques de ces bactéries, ainsi que d'autres bactériophages de transit. Il y en a dans le tube digestif des vertébrés, par exemple les bactériophages de *Bacteroides fragilis*, les bactériophages d'*Escherichia coli* ou coliphages, dans l'eau, par exemple des bactériophages de *Pseudomonas aeruginosa*. Les bactériophages, en particulier les coliphages F spécifiques, peuvent se multiplier dans l'eau en présence des bactéries hôtes. Les bactériophages de *Bacteroides fragilis*, par contre, ne peuvent pas se multiplier dans le milieu hydrique.

Les coliphages détectés dans l'eau n'ont pas uniquement pour origine une contamination fécale humaine, car ils proviennent également des animaux ou des entérobactéries. Les phages à ARN F spécifiques présentent un avantage, car ils ne se multiplient pas dans le tube digestif des animaux. Mais ce sont les bactériophages de *Bacteroides fragilis* les plus intéressants à rechercher, car ils sont spécifiques du tube digestif humain (110).

Les bactériophages représentent une alternative intéressante à l'analyse de la contamination virale du milieu hydrique. En effet, présents dans l'eau en plus grande quantité que les virus animaux, ils sont facilement et rapidement détectables, à faible coût (56, 127), et une analyse quantitative est possible. Ils résistent plusieurs jours dans l'eau, toujours plus longtemps que les bactéries, et signalent une contamination ancienne ou intermittente (110).

Ce sont également de bons indicateurs de l'efficacité des traitements de désinfection, car leur sensibilité est proche de celle des entérovirus (2), mais moindre que celle des bactéries. Par exemple, une concentration en chlore de 3 à 5 mg/l, provoque juste un abaissement de 0,5 log d'un inoculum de F RNA phages, alors qu'à cette concentration, 99,99% d'un inoculum d'*Escherichia coli* sont neutralisés (63).

2. SURVIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT

Les grandes quantités de virus entériques rejetées dans l'environnement ne peuvent que diminuer, car en l'absence de système cellulaire permissif, toute multiplication virale est impossible.

Toutefois la vitesse de perte d'infectivité est variable suivant les virus, et est influencée par de nombreux facteurs, dont les caractéristiques virales elles-mêmes, les paramètres naturels d'ordre physique, chimique ou biologique, ou les traitements spécifiquement appliqués pour éliminer les particules virales.

2. 1. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES FAVORISANT LA SURVIE DES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT

2. 1. 1. L'absence d'enveloppe virale

Chez certains virus, la nucléocapside (constituée de l'acide nucléique viral et de la capsidie protéique) est enfermée dans une enveloppe, le peplos, de nature lipoprotéique, et d'origine cellulaire (membrane cytoplasmique ou nucléaire), portant dans certains cas des spicules codées par le génome viral. Ces virus sont les virus enveloppés par opposition aux virus nus qui n'ont pas d'enveloppe.

Parmi les virus entériques non enveloppés, nous pouvons citer les entérovirus (poliovirus, coxsackievirus, échovirus), le virus de l'hépatite A, les rotavirus, les réovirus, le virus de Norwalk, les calicivirus, les astrovirus et les adénovirus.

L'absence d'enveloppe virale est directement associée à une plus grande résistance des virus dans l'environnement.

2. 1. 2. L'agrégation et l'adsorption

Dans l'environnement, et en particulier dans le milieu hydrique, les virus sont très rarement à l'état libre et presque toujours adsorbés sur des matières organiques ou minérales, ou sous forme d'agrégats (129).

Au moment de leur excrétion, les rotavirus, tout comme les poliovirus, sont sous forme d'agrégats et sont associés à des débris cellulaires, ce qui favorise leur survie (6, 129). Des travaux ont permis de montrer que la présence de matières fécales pouvait améliorer la survie des adénovirus et des poliovirus sur des surfaces non poreuses, alors que cela n'affectait pas la résistance des rotavirus ou du VHA (1). Bien qu'il ne s'agisse pas d'un virus entérique, il a été montré une perte d'infectiosité de 3 logarithmes décimaux pour le virus de l'immunodéficiência humaine acquise (VIH), en 8 heures, à 25°C, dans l'eau du robinet déchlorée. Après addition de serum humain dans l'eau, la perte d'infectiosité du VIH était beaucoup moins rapide, vraisemblablement par agrégation des virions sur les matières organiques (83). Les anticorps qui recouvrent la surface des rotavirus au moment de leur excrétion représentent aussi un facteur favorable de survie (6).

Ces mécanismes d'adsorption sur supports organiques ou minéraux ou d'agrégation augmentent la résistance des virus entériques dans l'environnement, en les protégeant des facteurs inactivants, tels que les traitements de désinfection. Ceci est plus particulièrement sensible pour les virus situés au centre de l'agrégat.

2. 2. FACTEURS NATURELS AFFECTANT LA SURVIE

2. 2. 1. Facteurs physiques

2. 2. 1. 1. Température

La température est un paramètre important pour la survie des virus. A +4°C, la persistance des rotavirus, poliovirus, adénovirus et du virus de l'hépatite A, sur des surfaces contaminées, est plus grande qu'à 20°C (1).

Dans le cas d'une suspension de poliovirus 1 de titre 10^5 NPPUC/l (nombre le plus probable d'unités formant colonie par litre), la survie est de 296 jours à une température comprise entre 18 et 23°C. Si cette température est abaissée à +4°C, un délai de 10 à 15 ans est théoriquement nécessaire pour ne plus déceler d'infectivité (107).

Pour le virus de l'hépatite A, un abaissement du titre viral de 0,68 logarithme décimal est observé en un an à +4°C, alors qu'après 360 jours à température ambiante, on ne détecte plus de particules virales (9).

L'infectiosité des rotavirus et des réovirus présents dans des boues d'épuration a été montrée après 30 jours à 26°C : à +8°C, 400 jours plus tard, ces virus étaient encore infectieux (6).

Toutefois, la température a peu d'effet sur la survie des bactériophages dans l'environnement (1).

2. 2. 1. 2. Humidité atmosphérique

Le rôle de l'humidité atmosphérique relative (RH) sur la survie des rotavirus varie suivant les auteurs. Ansari (6) rapporte des effets bénéfiques d'une faible (20%) ou moyenne (50%) RH, par fixation des rotavirus sur des gouttelettes. Ainsi, à 20°C, avec 50% de RH, 80% des rotavirus sont encore infectieux après 24 heures dans un aérosol, ou après 10 jours sur un support en plastique ou en verre. Pour Xavier Abad (1), la résistance des rotavirus sur une surface poreuse est maximale à une haute (80 à 95%) RH. Le niveau d'humidité atmosphérique, tout comme la température, affecte peu la survie des bactériophages (1).

2. 2. 1. 3. Lumière

Les longueurs d'onde inférieures à 370 nm inactivent la majorité des virus entériques. L'effet de la lumière diminue en présence de matières organiques, car les virus se fixent sur les particules en suspension, qui sédimentent, et mettent ainsi les virions à l'abri de l'action des rayons ultra-violets (110).

2. 2. 2. Facteurs chimiques

2. 2. 2. 1. Effet du pH

Les pH alcalins, l'ammoniaque, détruisent les acides nucléiques. La dégradation des poliovirus peut être obtenue en amenant le pH de la suspension virale à 9 (84). La résistance des virus sera donc meilleure à pH acide, sauf dans le cas des calicivirus et des rotavirus (110).

2. 2. 2. 2. Effet des ions

Les ions di et trivalents (aluminium, calcium, cuivre, argent) protègent les virus en formant des agrégats (129). Toutefois, les ions métalliques peuvent aussi inactiver les virus en se liant aux électrons sur les protéines ou sur les acides nucléiques. Une concentration en chlore deux fois moins élevée est nécessaire pour obtenir une chute de 4 logarithmes décimaux du titre d'une suspension de poliovirus en présence de cuivre et d'argent (2).

2. 2. 2. 3. Effet de la salinité

L'inactivation virale augmente en milieu salin par rapport à ce qui est observé dans l'eau distillée. Ce phénomène pourrait s'expliquer par la très bonne dispersion virale en milieu salin phosphaté (PBS), ce qui a pour effet de désagréger les particules virales et de les rendre plus sensibles aux facteurs inactivants (129).

2. 2. 3. Facteurs biologiques

Une action antivirale des algues chlorella, de certaines bactéries (*Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Moraxella*) présentes dans l'eau de mer sur les poliovirus et les rotavirus a été décrite (110). Les rotavirus seraient plus fréquemment détectés dans l'eau en hiver ou au printemps, car en été l'augmentation de l'activité métabolique des microorganismes aquatiques serait responsable d'une dégradation plus rapide des particules virales (6).

2. 3. INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE DESINFECTION SUR L'ELIMINATION DES VIRUS

Le premier traitement appliqué aux eaux usées est la sédimentation primaire. Elle consiste à éliminer les virus par fixation sur des particules solides avec formation de boues d'épuration. Cette

opération peut être suivie de l'action de boues activées et d'une décantation secondaire. A l'issue de ces 3 étapes, 69% des virus entériques sont éliminés (109). Dans le cas des rotavirus, la fixation sur les floculats de boue activée est peu efficace (6).

Avant leur utilisation, les eaux destinées à l'alimentation humaine sont généralement traitées. L'efficacité du traitement appliqué dépend des paramètres de la désinfection et du procédé choisi.

2. 3. 1. Les paramètres de la désinfection

L'action de l'agent de désinfection est influencée par le pH. Pour une désinfection utilisant un produit chloré, l'effet est maximal à pH bas, par formation d'hydroxyde de chlore. Avec l'ozone, c'est un pH neutre qui permettra d'obtenir une désinfection optimale (110).

La température influence le résultat de la désinfection : plus elle sera élevée, plus la désinfection sera efficace.

La présence de matières organiques, qui se traduit par une turbidité élevée, a pour conséquence une diminution de l'efficacité de la désinfection, par protection des virus adsorbés sur les particules en suspension et par réaction des matières organiques avec les désinfectants, d'où une diminution de la concentration efficace du produit (110).

D'une façon générale, tout ce qui contribuera à la formation d'agrégats de particules virales, limitera l'efficacité du traitement appliqué à l'eau.

2. 3. 2. Procédés de traitement des eaux destinées à l'alimentation humaine

2. 3. 2. 1. Procédés utilisant des produits chlorés

L'efficacité des traitements utilisant le chlore varie suivant les auteurs.

Pour Abad (2), dans le cas du rotavirus, un abaissement logarithmique du titre viral de 2 log est obtenu en 30 min avec une concentration en chlore libre de 1 mg/l, alors que Vaughn obtient une diminution de 3 log, en 30 sec avec une concentration en chlore libre 10 fois plus faible (121).

Pour le VHA, un abaissement de 2 log a été obtenu avec une concentration en chlore libre de 1 mg/l, deux fois plus rapidement (15 min) que pour le rotavirus (2). Alors que pour Grabow (49), 150 sec et 0,4 mg/l de chlore libre suffisent pour obtenir une diminution de 4 log pour le VHA.

Adénovirus et poliovirus sont beaucoup plus sensibles à l'action du chlore libre, puisque pour le premier une diminution de 2 log est obtenue en 1 min, et pour le second une chute de 3 log est atteinte avec une concentration en chlore libre de 0,5 mg/l en 1 min (2).

Moore (84) met l'accent sur le fait que le chlore libre ou le dioxyde de chlore permettent une perte d'infectiosité d'une suspension de poliovirus en 10 min à pH 6 et 7, et en 2 min à pH 9. Toutefois,

après une heure de contact avec le produit chloré, et quel que soit le pH, les acides nucléiques du poliovirus sont encore détectables.

Une faible efficacité du chlore sur le virus de Norwalk a été rapportée (66).

L'action des chloramines serait largement inférieure à celle du chlore libre, notamment sur les rotavirus et sur le VHA, alors que l'action du dioxyde de chlore est bien supérieure à celle du chlore, par réaction de ce puissant agent sur les protéines capsidales.

2. 3. 2. 2. Autres procédés de traitement des eaux

L'ozone peut être utilisé dans le traitement de potabilisation des eaux. Il s'agit d'un oxydant puissant, qui attaque les composés organiques sur les liaisons insaturées carbone/carbone, en conduisant à la formation d'acides carboxyliques, de cétones et d'aldéhydes. L'efficacité diminue en présence de matières en suspension. L'ozone à 1% permet une perte d'infectiosité en 10 min pour le poliovirus (84).

Le traitement aux rayons ultra-violetts est également tributaire de la turbidité de la suspension ou de la présence de matières organiques dissoutes. L'effet désinfectant des rayons ultra-violetts résulte d'un transfert d'énergie aux molécules virales. Il varie avec la durée de l'exposition, l'intensité de l'exposition et la distance entre la source et la cible exposée. Pour le poliovirus, 60 min sont nécessaires (84).

Comme dans le cas du traitement avec le chlore, les acides nucléiques de poliovirus sont encore détectés après un traitement à l'ozone ou aux rayons ultra-violetts pendant plus d'une heure, alors que les virus ne sont plus infectieux (84).

Les virus entériques sont très résistants dans le milieu hydrique. Les entérovirus, par exemple, persistent plus longtemps dans l'eau que le VIH (83).

Parmi les virus entériques, certains, tels que les rotavirus ou le VHA, survivent plus longtemps, même dans des conditions plus hostiles, que les entérovirus. Ils sont notamment plus résistants aux traitements habituels de chloration des eaux destinées à l'alimentation humaine (6).

Des acides nucléiques peuvent persister et être détectés dans des eaux qui ont subi un traitement efficace de désinfection, c'est-à-dire dans lesquelles on ne décèle pas de particules virales infectieuses (84).

3. LE CYCLE DE CONTAMINATION VIRALE DU MILIEU HYDRIQUE

3. 1. SOURCES DE CONTAMINATION DU MILIEU HYDRIQUE

Les virus entériques sont généralement excrétés en très grande quantité dans les selles des individus contaminés, malades ou porteurs sains. On retrouve jusqu'à 10^{11} particules virales par gramme de selles dans le cas des rotavirus (110) et des adénovirus (95). Le virus de Norwalk est éliminé en quantité moins importante. Suivant les virus, l'excrétion fécale dure plus ou moins longtemps, et se situe de façon variable par rapport à l'apparition des signes cliniques : 15 jours avant l'ictère pour le VHA, 24 h après l'infection pour le poliovirus.

Les virus rejetés dans les selles se retrouvent ainsi dans les eaux usées d'égouts qui sont acheminées jusqu'aux stations d'épuration ou rejetées sans traitement dans l'environnement. Plus le niveau d'hygiène est faible et plus la proportion d'enfants est grande dans une communauté, plus la quantité de virus retrouvés dans les eaux usées est importante (110). La gestion des eaux usées est généralement tributaire des caractéristiques économiques et démographiques des populations.

L'homme est donc le contaminateur primaire de l'eau. L'eau peut aussi être souillée par des virus d'origine animale, souvent sans risque pour l'homme.

L'homme est également le récepteur secondaire des agents pathogènes qui contaminent l'eau. En effet, si la transmission des virus entériques est en général fécale-orale selon un cycle court mettant souvent en cause une mauvaise hygiène élémentaire, la transmission par l'eau, selon un cycle long, n'est pas à exclure.

3. 2. SOURCES DE CONTAMINATION POUR L'HOMME

Les virus entériques peuvent être isolés à différents stades du cycle de l'eau, des eaux usées jusqu'à l'eau de boisson. SEKLA (111) détecte des virus entériques dans 61,8% des échantillons d'eau usée testés, dans 20% des échantillons d'effluents de stations d'épuration, dans 3% des échantillons d'eau de surface et dans 6,75% des échantillons d'eau de boisson. Dans les eaux de surface, les virus sont plutôt présents au niveau des sédiments (74), du fait de leur décantation après adsorption sur des matières en suspension et après agrégation.

De nombreuses études ont porté sur la détection, parfois la quantification, des virus entériques dans les eaux usées brutes. Jusqu'à 240 000 pfu/l d'entérovirus sont retrouvées à Barranquitas (Porto-Rico) (26), mais aussi des rotavirus (108), des poliovirus (94, 118, 120). Des entérovirus sont également isolés dans les boues résultant des traitements physico-chimiques des eaux usées (69, 113) et dans les effluents des stations d'épuration rejetés dans l'environnement (26, 56, 94). Les boues et les eaux épurées sont susceptibles d'être utilisées pour l'épandage (115) et l'irrigation des cultures maraîchères. Consommés crus et insuffisamment lavés, ces produits peuvent devenir sources de contaminations virales.

Les eaux épurées sont rejetées dans les eaux superficielles fluviales, lacustres ou marines. Des virus entériques pathogènes pour l'homme ont fréquemment été retrouvés dans les eaux de rivières ou de fleuves, qu'il s'agisse d'entérovirus (46, 69, 98, 120, 122, 123), d'adénovirus (98, 122) ou de réovirus (122), dans les lacs (69) et dans les eaux portuaires (18, 118). Ces virus peuvent être contractés par l'homme à l'occasion de la consommation d'eau, d'activités récréatives (87), ou par ingestion de coquillages élevés dans ces eaux contaminées (20, 27, 48, 74).

Le risque lié aux eaux de loisirs concerne aussi la baignade en piscine (36) ou la fréquentation des jacuzzis (36).

Les eaux superficielles peuvent être utilisées pour produire de l'eau destinée à la consommation humaine, généralement après un traitement de potabilisation. Cependant des virus entériques ont été isolés à plusieurs reprises dans l'eau d'alimentation ou dans de la glace alimentaire, en particulier après qu'une anomalie soit apparue sur les canalisations ou au niveau de la station de traitement (16, 17, 64, 65, 85, 111, 116).

L'eau potable provient le plus souvent de nappes phréatiques profondes bien protégées. Toutefois, cette eau, pas toujours traitée, ou parfois insuffisamment traitée, peut être contaminée par des bactéries et/ou des virus (3). Ceci est particulièrement vrai après des épisodes de pluies très abondantes dans des régions dont les caractéristiques géologiques sont propices à une infiltration rapide des eaux (les terrains karstiques par exemple).

CHAPITRE 2

PATHOLOGIE INFECTIEUSE D'ORIGINE HYDRIQUE

Les maladies d'origine hydrique sont des infections provoquées par des bactéries, des virus, des parasites ou des algues. De nos jours, ces infections sont le plus souvent des diarrhées, définies cliniquement comme des émissions de selles trop fréquentes et trop abondantes (33). On parle aussi d'intoxinations, pour faire référence aux troubles qui surviennent à la suite de l'ingestion de toxines préformées dans l'eau.

Une épidémie hydrique est un incident dans lequel 2 ou plusieurs personnes développent la même maladie après avoir bu de l'eau destinée à la consommation, et pour lequel des évidences épidémiologiques mettent en cause l'eau comme origine de la maladie (54).

L'individu réceptif est caractérisé par son statut immunitaire et son âge. Il ne sera pas systématiquement infecté ou malade après consommation d'eau contaminée. Il faut en effet qu'il reçoive la dose minimale infectieuse (DMI), dose très mal connue et variables pour les différents agents infectieux du milieu hydrique.

1. INFECTIONS NON VIRALES D'ORIGINE HYDRIQUE

1. 1. BACTERIES

De nombreux agents bactériens peuvent se transmettre par l'eau au cours de ses diverses utilisations (boisson, aérosol, loisir, hygiène, soins, préparation des aliments). Les réservoirs des germes qui contaminent l'eau sont les individus ou les animaux malades, à différents stades de la maladie, ou les porteurs asymptomatiques. Dans les infections bactériennes, les germes colonisent un foyer et fabriquent des toxines. L'action se manifeste de 12 heures à 21 jours plus tard.

Les infections hydriques bactériennes les plus fréquentes sont des diarrhées (55). Les germes impliqués sont avant tout *Escherichia coli*, *Campylobacter*, souvent isolé dans les gastro-entérites des jeunes enfants, et aussi les salmonelles, les shigelles (31, 96) et *Yersinia* (44, 54).

Vibrio cholerae est de nos jours plus rare et la dernière épidémie hydrique de choléra européenne date de 1974 au Portugal (55).

Les infections bactériennes d'origine hydrique peuvent également être pulmonaires, comme la légionellose contractée par l'intermédiaire des systèmes d'air conditionné ou des douches d'eau chaude, maladie particulièrement redoutée chez les immunodéprimés.

Enfin, les infections cutanéomuqueuses transmises par l'eau, infections à staphylocoques ou à *Pseudomonas*, sont fréquentes.

1. 2. PARASITES

Les infections à protozoaires classiquement transmises par l'eau sont la giardiase et la cryptosporidiose. Des diarrhées épidémiques à *Giardia*, transmises par des eaux désinfectées uniquement par chloration, ont été souvent décrites aux USA (54), et une contamination endémique de l'eau par les kystes de *Giardia* est très probable. Ces kystes sont très résistants à la plupart des procédés chimiques de désinfection, notamment au chlore.

Les oocystes de *Cryptosporidium* sont associés aux maladies diarrhéiques dans toutes les parties du monde. Ces infections sont souvent décrites chez les immunodéprimés.

Le mécanisme de ces diarrhées parasitaires est mal connu, et les symptômes persistent généralement longtemps.

D'autres parasitoses transmises par l'eau, dues à des trématodes, des cestodes, des nématodes, ainsi que les amibiases, sévissent dans certains pays uniquement.

1. 3. TOXINES

On distingue des cyanotoxines et des endotoxines. Au cours des intoxications, l'effet se manifeste en quelques heures.

Les cyanotoxines sont des neurotoxines ou des hépatotoxines. Les premières, fabriquées par les Cyanophycées (*Aphanizomenon* par exemple), sont responsables de paralysies déjà observées chez les animaux. Des empoisonnements chez l'homme n'ont jamais été mentionnés. Les hépatotoxines, fabriquées par des cyanobactéries comme *Anaebaena*, provoquent des hémorragies intrahépatiques chez les animaux. Leur rôle dans le cancer du foie a été évoqué.

Les endotoxines, provenant des bactéries à gram négatif, ont un rôle mal connu, en particulier après ingestion. Elles pourraient être à l'origine de gastro-entérites (55). Elles représentent un danger surtout au cours de la dialyse péritonéale si elles sont présentes dans l'eau destinée à la préparation des solutés de dialyse.

Au cours du temps, on observe une évolution épidémique des infections transmises par l'eau. Les grandes épidémies de choléra ont laissé la place aux shigelloses et salmonelloses, elles-mêmes supplantées par les hépatites virales. Actuellement ce sont les giardiases et les gastro-

entérites à *Campylobacter* et à virus qui prédominent. En effet, l'ensemble gastro-entérites indéterminées-giardiasis représente plus de 70% des épidémies aux USA. Il est vraisemblable de penser que ces gastro-entérites indéterminées sont en réalité d'origine virale (55, 23). On assiste donc à une émergence des gastro-entérites virales et des giardiasis aux USA, et à une régression des gastro-entérites bactériennes. Il en est sans doute de même en France, où toutefois le problème des giardiasis est moins préoccupant.

2. PATHOLOGIES VIRALES ET EAU D'ALIMENTATION

L'impact du milieu hydrique dans la survenue des maladies virales dans la population est mal connu et certainement sous-estimé (38, 57). Plus de la moitié des épidémies transmises par l'eau sont d'origine indéterminée (44, 54), alors qu'un pourcentage très faible est d'origine virale. En raison des difficultés analytiques et épidémiologiques du milieu hydrique, on peut penser que beaucoup d'épidémies hydriques d'étiologie non connue, sont provoquées par des virus (23).

Les épidémies virales transmises par l'eau d'alimentation rapportées dans la littérature sont généralement accidentelles. Elles ont souvent des causes techniques telles que l'absence, l'interruption ou l'insuffisance du traitement de désinfection (71, 85), ou un incident dans les circuits de distribution (38), comme l'interconnection eaux usées/eaux potables (85, 116), ou le siphonnage d'eaux sales en retour vers les eaux potables. Elles peuvent aussi faire suite à des conditions pluvieuses diluviennes à l'origine d'une contamination des eaux souterraines (16, 57). Par contre, la contamination "endémique" de l'eau destinée à la consommation humaine, et la morbidité qui lui est associée, sont à notre connaissance, non évaluées à ce jour.

2. 1. EPIDEMIES VIRALES D'ORIGINE HYDRIQUE ACCIDENTELLES

2. 1. 1. Epidémies d'hépatites

Le virus de l'hépatite A a été isolé de l'eau de boisson et a été reconnu comme responsable de plusieurs épidémies (5), dont la grande épidémie de New Delhi en 1955/56 qui a touché 25000 personnes (38, 110). Des épidémies provoquées par le virus de l'hépatite E ont également été décrites en Asie, Afrique, Amérique Centrale (51) et en Indonésie (25).

Ces épidémies sont toujours associées à la contamination de l'eau d'alimentation par des matières fécales d'origine humaine ou animale, situation plus fréquemment rencontrée dans les pays à bas niveau d'hygiène.

2. 1. 2. Epidémies de gastro-entérites virales

Il s'agit de la pathologie virale à transmission hydrique la plus fréquente, et sans doute très

largement sous-estimée par rapport aux gastro-entérites d'origine bactérienne. De très nombreux virus entériques peuvent être responsables de symptômes diarrhéiques, dont les entérovirus, les rotavirus, les adénovirus, les réovirus, le virus de Norwalk et les autres petits virus ronds. Aux USA, les rotavirus sont à l'origine d'un tiers des hospitalisations pour diarrhées chez les jeunes enfants de moins de 5 ans (88), soit environ 66000 hospitalisations et 50 à 90 décès par an (6).

Deux épidémies importantes survenues en Chine en 1983, consécutives à la contamination de l'eau par des matières fécales, sont d'ailleurs à l'origine de la découverte d'un nouveau groupe de rotavirus, le groupe C, de profil électrophorétique différent des autres rotavirus connus (116). Les rotavirus de groupe C provoquent des gastro-entérites plutôt chez les adultes (116). Des épidémies à rotavirus sont aussi décrites aux USA, au Brésil, en Suède, après contamination accidentelle de l'eau par des matières fécales (6) : ces épidémies frappent généralement un grand nombre d'individus, par exemple 1751 personnes dans une épidémie au Colorado (54).

Le virus de Norwalk, très difficile à mettre en évidence, a été observé à plusieurs reprises en microscopie électronique dans les selles de dizaines de personnes aux USA après consommation d'eau souillée ou de glace alimentaire rafraîchissante (16, 71, 85). Dans ces épidémies, la maladie était chaque fois associée très fortement à la consommation d'eau, et l'incidence des diarrhées augmentait de façon parallèle à l'augmentation de la consommation d'eau (71, 85). Fréquemment aussi, la contamination par le virus de Norwalk est la conséquence de la consommation de bi-valves crus, élevés dans des eaux contaminées, même en dehors de la présence de tout autre marqueur bactériologique (20, 27).

2. 1. 3. Epidémies dues aux entérovirus

Les poliomyélites sont désormais rares (38), et, en Europe, aucun cas de poliomyélite n'a pu être rapporté à une transmission hydrique ces dernières années. Dans les pays développés, les cas rapportés sont généralement consécutifs à la vaccination (88). Cliver (23) signale 80 cas de méningites aseptiques d'origine hydrique provoquées par un virus Echo 4. Des épidémies de gastro-entérites après contamination d'une nappe d'eau souterraine par les échovirus ou par les coxsackievirus ont également été décrites (104).

2. 2. MORBIDITE LIEE A LA CONTAMINATION VIRALE "ENDEMIQUE" DE L'EAU D'ALIMENTATION

2. 2. 1. Fondements

Malgré les nombreux efforts mis en oeuvre, certains réseaux d'alimentation en eau délivrent aux consommateurs de l'eau régulièrement contaminée par des bactéries indicatrices de

contamination fécale. La consommation d'eau non conforme aux exigences microbiologiques réglementaires est liée à un risque de maladies gastro-entériques 2 fois trop élevé (35). Cette morbidité observée a souvent une étiologie bactérienne, mais aussi certainement virale.

L'hypothèse d'une contamination virale "endémique" de l'eau d'alimentation, non prouvée à ce jour, et responsable d'une morbidité qui s'exprimerait à "bas bruit", repose sur quatre postulats (38) :

- les virus entériques rejetés en très grande quantité dans les selles, sont très présents dans les eaux usées et peuvent se retrouver en faible concentration dans l'eau d'alimentation.
- les doses infectieuses virales sont généralement très faibles, environ 100 particules virales.
- l'eau peut être à l'origine de la contamination de cas sporadiques, et la propagation des pathologies virales se fait ensuite par contact entre individus (51, 116).
- les virus entériques entraînent rarement des manifestations cliniques et les porteurs sains sont très nombreux.

2. 2. 2. Doses infectieuses

Contrairement aux bactéries, un petit nombre de particules virales est suffisant pour contaminer un individu. En effet, les virus se multiplient à l'intérieur des cellules, ce qui les rend moins accessibles aux défenses immunitaires, et une grande quantité de virions est produite à chaque cycle répliatif (38). Par conséquent, des doses minimales infectieuses de 1 unités formant plaque (pfu) pour le rotavirus (124), 17 pfu pour l'échovirus (106), quelques dizaines de particules virales pour le virus Norwalk (27), suffisent pour provoquer l'infection.

2. 2. 3. Portage asymptomatique

La contamination par les virus entériques conduit rarement à des manifestations cliniques, et les porteurs sains sont très fréquents (86). On les estime à 9 pour 10 dans le cas d'une contamination par le VHA, à 99 pour 100, s'il s'agit du poliovirus et 999 pour 1000 avec les coxsackievirus et les echovirus (38). Le portage asymptomatique est souvent fonction de l'âge : dans le cas du VHA, les malades sont souvent les adultes, alors que dans le cas du rotavirus, ce sont les jeunes enfants qui présentent des manifestations cliniques (44).

2. 2. 4. Arguments épidémiologiques

Sekla (111) détecte des poliovirus types 1, 2 et 3 dans 5 échantillons d'eau de boisson sur 74 testés, sans qu'une morbidité anormalement élevée soit rapportée à Manitoba (Canada), ville où sont effectués les prélèvements. Gerba et Haas (42) estiment dans une étude statistique, qu'une personne qui boit toute sa vie, tous les jours, 1 litre d'eau contenant une particule virale dans 1000 litres, a un risque de maladie de $4,2 \cdot 10^{-1}$ et un risque de mortalité de $3 \cdot 10^{-3}$ avec le VHA,

et de $7,6.10^{-3}$ et $6,6.10^{-6}$ respectivement avec les virus poliomyélitiques. La question est aussi de savoir si l'éradication des virus du milieu hydrique, entraînerait une diminution significative des maladies qu'ils provoquent, car bien souvent l'eau n'est pas la seule voie de transmission de ces virus (38).

Par ailleurs, la mesure de la prévalence de la sérologie VHA chez les appelés du contingent, indique que l'odd ratio est de 1,56 ($p < 0,04$) s'il y a consommation d'eau du robinet (70). De plus, la consommation d'eau bouillie est directement liée à une diminution de l'incidence des hépatites à transmission hydrique (25, 51) ou des diarrhées à rotavirus (10). Enfin, bien que ces résultats concernent l'usage récréatif et non alimentaire de l'eau, chez des plongeurs (40) et des véli-planchistes (87), les sérologies pour différents entérovirus et astrovirus se sont révélées significativement plus élevées que chez des témoins non exposés.

L'estimation et les déclarations d'épidémies hydriques sont très mauvaises, d'une façon générale, et dans le cas des épidémies virales, le problème est certainement le plus aigu.

Aux USA, les déclarations fonctionnent un peu mieux qu'ailleurs, sans doute en raison des intérêts financiers, par exemple les subventions pour améliorer l'assainissement, qui en découlent systématiquement (54).

Le hiatus entre les évidences épidémiologiques et l'observation ou l'isolement de l'agent viral infectieux dans l'eau explique aussi la difficulté pour évaluer le rôle joué par l'eau dans les infections virales.

3. LE CADRE DE PROTECTION SANITAIRE : LES NORMES MICROBIOLOGIQUES DE L'EAU DESTINÉE A LA CONSOMMATION HUMAINE

Par rapport à la santé de l'homme, l'eau peut intervenir au moins sous deux aspects :

- elle est indispensable à la vie, elle est nécessaire ou utile à de nombreuses activités;
- mais l'eau peut être à l'origine de différentes maladies liées à sa composition chimique ou à son état microbiologique.

On entend par "eaux destinées à la consommation humaine", "les eaux distribuées par réseau ou par citerne, les eaux conditionnées autres que minérales naturelles, les eaux utilisées dans les entreprises alimentaires à des fins de fabrication, de traitement, de conservation ou de mise sur le marché de produits ou substances destinés à être consommés par l'homme et qui peuvent affecter la salubrité de la denrée alimentaire finale et la glace alimentaire d'origine hydrique" (directive n°80-778/CEE du 15/07/1980 du Conseil des Communautés Européennes) (4, 28).

Pour protéger la santé publique contre les risques hydriques, des règles ont été élaborées par les hygiénistes depuis plus d'un siècle. Ces règles sanitaires ont été introduites dans un cadre administratif et réglementaire afin d'imposer leur respect et d'éviter ainsi la répétition d'incidents.

Le décret n°89-3 du 3 janvier 1989 modifié redéfinit ces règles et indique les normes de qualité applicables (24).

3. 1. LE CONTEXTE REGLEMENTAIRE APPLICABLE AUX EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE

3. 1. 1. Règles sanitaires (97, 117)

La maîtrise des risques microbiologiques d'origine hydrique résulte d'une démarche qualité tripartite qui repose sur des obligations de moyens, des obligations de procédures et des obligations de résultats.

On distingue donc des règles techniques, des règles administratives et des règles de vérification. Ces règles sanitaires figurent dans le décret n°89-3 du 3 janvier 1989 modifié.

Les premières précisent notamment les périmètres de protection à respecter autour des captages, les procédés de traitement utilisables, les conditions de conception des réservoirs ou des canalisations, la qualité des eaux superficielles destinées à la production d'eau alimentaire.

Les secondes se présentent sous forme de procédures d'autorisations du captage, du traitement, de procédures de déclaration du tracé principal du réseau public ou de procédures pour l'obtention de dérogation aux critères de qualité dans des conditions très particulières.

Les règles de vérification s'adressent au distributeur d'eau qui doit assurer une surveillance de la qualité de l'eau distribuée. Les échantillons sont prélevés par la Direction Départementale des Affaires Sanitaires et Sociales, qui peut faire appel à un laboratoire agréé pour remplir cette mission. Les déterminations analytiques sont généralement prises en charge par ce même laboratoire qui a l'agrément du Ministère chargé de la Santé.

3. 1. 2. Normes de qualité (97)

Ces normes résultent de la directive n°80-778/CEE du 15 juillet 1980 du Conseil des Communautés Européennes et de recommandations publiées en 1986 par l'Organisation Mondiale de la Santé (90).

La directive distingue des concentrations maximales admissibles (C.M.A.) et des nombres guides (N.G.). Les valeurs à fixer doivent être inférieures ou égales aux C.M.A., et ces valeurs sont fixées en s'inspirant des N.G.

Les normes de qualité françaises sont fixées par le décret n°89-3 modifié. Une annexe du décret définit le programme réglementaire d'analyse des échantillons d'eau. Quant aux méthodes d'analyses, elles figurent dans un arrêté du 20 février 1990.

Les résultats des analyses effectuées dans le cadre du programme réglementaire sont considérés comme des documents administratifs au sens de la loi n°78-753 du 17 juillet 1978. Ils sont

publics et doivent être communiqués par le maire ou la DDASS à toute personne qui en fait la demande.

Dans la réglementation française, différentes valeurs ont été indiquées pour une série de paramètres.

Les valeurs liées directement au risque sanitaire, établies à partir de la connaissance d'une relation dose-effets, donnent une quantité admissible pour un individu et pour une période de temps. La part apportée par l'eau est évaluée en pourcentage, et une concentration limite par unité de volume est alors fixée en faisant une hypothèse de consommation quotidienne, par exemple deux litres.

Les valeurs applicables à des paramètres témoins de contamination concernent par exemple les germes pathogènes. Dans un objectif de prévention, il est procédé au suivi de paramètres qui indiquent la présence possible de l'élément dangereux. Ainsi, l'identification de coliformes fécaux dans une eau traduit le fait qu'elle a été contaminée par des eaux pouvant contenir des matières fécales, mais ne signifie pas systématiquement qu'il y a danger. Toutefois, si les eaux usées avec lesquelles l'eau d'alimentation est en contact renferment à un moment donné des germes pathogènes, l'eau d'alimentation sera polluée et pourra alors présenter un risque sanitaire pour la santé du consommateur.

Sont également établies des valeurs correspondant à des niveaux d'acceptabilité, des valeurs technologiques, des valeurs de protection du patrimoine, des valeurs de gestion, des valeurs correspondant aux niveaux jusqu'alors habituellement rencontrés, des valeurs correspondant aux seuils de détection analytique, des valeurs intervenant dans une procédure administrative.

3. 1. 3. Le suivi de la qualité

La qualité de l'eau peut varier au point de captage (conséquence de l'hydrogéologie, de la météorologie, d'une pollution), selon le dispositif de traitement, ou dans le réseau de distribution.

Pour éviter et détecter ces variations, une surveillance et un contrôle sont mis en place tout au long de la chaîne de distribution.

La surveillance porte sur l'entretien et le maintien du bon fonctionnement des systèmes de production et de distribution.

L'organisation du contrôle est définie par le décret n°89-3 modifié qui fixe :

- * les paramètres à rechercher et les normes correspondantes
- * les analyses types en fonction de
 - l'origine de l'eau : superficielle ou souterraine
 - le lieu de prélèvement : ressource, production ou distribution
 - le degré d'information recherché.

Trois niveaux d'analyses microbiologiques sont donc établis :

Microorganisme recherché	Analyse B1 (ressource)	Analyse B2 (distribution)	Analyse B3 (production)
Coliformes thermotolérants	X	X	X
Streptocoques fécaux	X	X	X
Bactéries aérobies à 22°C et 37°C		X	X
Coliformes totaux			X
Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices			X

* la fréquence des analyses en fonction des débits journaliers maximum produits, de l'existence ou non d'un système de traitement et de la population desservie.

3. 1. 4. Attitude en cas de dépassement des normes (117)

Face à la non conformité d'une analyse, les instances sanitaires et le distributeur de l'eau doivent collaborer pour :

- 1 - identifier le problème
- 2 - choisir un scénario
- 3 - élaborer des solutions
- 4 - mettre en oeuvre la solution.

L'identification du problème suppose des vérifications analytiques complémentaires, des enquêtes de terrains à la ressource ou sur le réseau, la comparaison avec les résultats antérieurs et une documentation sur le risque encouru par la population.

Le scénario qui est choisi doit avoir pour objectif une mortalité nulle et une morbidité la plus faible possible, tout en assurant une alimentation en eau en priorité pour la boisson, l'alimentation et les soins, et en évitant que les mesures prises ne créent un risque pour la santé supérieur à celui résultant de la contamination de l'eau.

Les solutions élaborées sont une interruption de la distribution ou la poursuite sans consommation et avec mise en oeuvre de dispositifs de substitution, ou la poursuite de

distribution avec ou sans restriction d'usages (31). Parallèlement à l'application de ces solutions, les consommateurs doivent être informés.

Un contrôle d'efficacité sera toujours associé à la mise en oeuvre de la solution adoptée.

3. 2. MICROORGANISMES INDICATEURS USUELS

3. 2. 1. Principe

Il est théoriquement, techniquement et financièrement impossible de contrôler dans l'eau de boisson tous les microorganismes pathogènes susceptibles d'engendrer des infections d'origine hydrique.

Les germes pathogènes retrouvés dans l'eau sont en pratique toujours d'origine fécale. Or, il existe également des germes intestinaux, en principe non pathogènes, présents dans les déjections de l'homme et des animaux à sang chaud.

En conséquence, on cherche à identifier ces microorganismes non pathogènes qui sont plus faciles, plus rapides et plus économiques à mettre en évidence. Ces microorganismes sont les indicateurs ou germes tests. Leur détection permet de conclure à une pollution d'origine fécale. Dans ce cas, l'eau est considérée comme non potable et déclarée non conforme. La suspicion d'une contamination par des germes pathogènes doit donner lieu à une recherche plus approfondie.

3. 2. 2. Caractéristiques des indicateurs

Les germes-tests sont naturellement absents ou peu nombreux dans le milieu extérieur, où ils sont réputés plus résistants que les pathogènes eux-mêmes. Les deux indicateurs les plus spécifiques de la contamination fécale sont *Escherichia coli* et les streptocoques fécaux, ces derniers étant le meilleur témoin (19).

Ils doivent avoir le même comportement dans le milieu naturel que les germes pathogènes. Leur résistance aux traitements physico-chimiques doit être proche de celle rencontrée chez les germes pathogènes.

3. 2. 3. Pertinence des germes tests

Divers travaux épidémiologiques menés ces dernières années ont confirmé que les germes tests constituent un indice d'une pollution microbienne de l'eau induisant une augmentation des pathologies gastro-intestinales. En particulier, il a été estimé que le risque de développer une pathologie gastro-intestinale est environ 2 fois plus grand lors de la consommation d'une eau régulièrement non conforme, par rapport à la consommation d'une eau de bonne qualité (19).

Par ailleurs, il a été montré que le risque sanitaire est proportionnel au nombre de germes tests dénombrés, et que des pathologies intestinales peuvent être attribuées à l'eau dès la présence d'un germe pour 100 ml.

Au contraire, l'absence de germes indicateurs ne signifie pas obligatoirement que l'eau est exempte de microorganismes pathogènes. On peut seulement conclure que l'échantillon prélevé n'est pas pollué par des matières fécales et de ce fait que l'eau ne présente pas de risque microbiologique particulier pour la santé humaine.

3. 2. 4. Limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine (24)

	Valeur Limite	Valeur Référence
<u>Germes tests</u>		
* Coliformes totaux	0 dans 100 ml, dans 95% des analyses	
* Coliformes thermotolérants	0 dans 100 ml	
* Streptocoques fécaux	0 dans 100 ml	
* Spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices	1 dans 20 ml	
* Germes totaux		<i>eaux non traitées :</i> à 37°C : < 10 / ml à 22°C : < 100 / ml <i>eaux traitées :</i> à 37°C : < 2 / ml à 22°C : < 20 / ml
<u>Microorganismes pathogènes</u>		
* Salmonelles	0 dans 5 l	
* Staphylocoques pathogènes	0 dans 100 ml	
* Bactériophages fécaux	0 dans 50 ml	
* Entérovirus	0 dans 10 l	
<u>Autres organismes pathogènes</u>		
absence d'algues (algues bleues), parasites (amibes, giardia, helminthes)		

Tableau 2 - Limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine

L'échantillon est, à priori, considéré comme satisfaisant, sous réserve du respect des autres règles, lorsque les résultats de son analyse sont inférieurs ou égaux aux normes, sauf dans le cas où l'étude de l'évolution chronologique des résultats montre une augmentation subite des valeurs ou une dégradation lente mais régulière de la qualité.

Pour les coliformes totaux, la conformité s'évalue par rapport à un percentile et non sur un échantillon instantané : 95% des analyses doivent révéler l'absence de ce germe.

Des valeurs limites, VL, (norme qui ne doit pas être dépassée) et des valeurs de référence, VR, (leur dépassement impose la mise en oeuvre d'investigations complémentaires) sont établies pour les germes tests et des microorganismes pathogènes.

3. 2. 5. Limites des indicateurs microbiologiques

Une des difficultés de l'évaluation de la qualité de l'eau est liée au fait que les contrôles ne portent que sur des échantillons ponctuels réalisés à des instants et en des sites précis. Il est donc extrêmement délicat d'extrapoler les résultats obtenus lors d'une analyse à l'ensemble d'un réseau pour la période couvrant l'intervalle entre deux prélèvements. Cette constatation justifie l'existence des autres règles sanitaires applicables aux eaux destinées à la consommation humaine.

Pour améliorer au maximum l'information issue d'une analyse, il faudra choisir des lieux et des moments de prélèvements les plus judicieux possibles, voire augmenter la fréquence des prélèvements.

Il semble en effet plus intéressant de multiplier les prélèvements aux endroits où l'eau est généralement de bonne qualité, pour confirmer ou infirmer cette caractéristique, plutôt que sur des réseaux où l'eau est de mauvaise qualité en général, et où trois prélèvements annuels peuvent suffire à le montrer (130). Il faut également privilégier les prélèvements en bonne période par rapport à ceux en mauvaise période (pluvieuse) (130), car un mauvais résultat est alors plus porteur de sens quant au non respect d'une règle sanitaire. Enfin, le rythme fréquemment observé de 3 prélèvements annuels pour les petites localités s'avère tout-à-fait inadapté pour apprécier la qualité microbiologique de l'eau (34) : un minimum de 1 prélèvement mensuel est souhaitable (130).

Enfin, les microorganismes indicateurs usuels ne se comportent pas toujours de manière identique aux germes pathogènes. En effet, virus et parasites, beaucoup plus résistants, peuvent survivre même dans le cas d'un traitement apparemment adéquat, c'est-à-dire ayant entraîné l'élimination des germes indicateurs (87). Par ailleurs, concernant le pouvoir de rétention du sol, certains germes pathogènes peuvent parfois pénétrer l'aquifère alors que les microorganismes indicateurs sont retenus.

CHAPITRE 3

DETECTION DES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE

1. ECHANTILLONNAGE

1. 1. HETEROGENEITE VIRALE DES MILIEUX HYDRIQUES : DIFFICULTE D'ECHANTILLONNAGE

Nous avons déjà évoqué la tendance à l'agrégation virale dans l'environnement (129), résultant d'une part de la multiplication intracellulaire des virus conduisant à la libération d'agrégats stables lors de la lyse cellulaire, et d'autre part du fait que les virus sont des colloïdes de charge négative dans les eaux naturelles, d'où une forte adsorption sur les argiles, les sables ou les particules métalliques. Ceci explique la grande variabilité des résultats des analyses et la mauvaise sensibilité des méthodes de détection. Lorsque l'on étudie les eaux de surface, il faut donc privilégier la recherche des virus sur les matières en suspension ou dans les sédiments.

Généralement, le volume d'eau prélevé et analysé est une portion extrêmement faible du volume total du milieu hydrique étudié. On appelle inférence statistique, l'approche de la contamination du milieu hydrique à partir de résultats d'échantillons qui en proviennent (110). Les valeurs obtenues expérimentalement ne sont que des estimations des concentrations virales réelles, qui sont des grandeurs inaccessibles. Aussi l'obtention d'un résultat nul ne permet en rien de conclure à l'absence totale de virus dans l'eau analysée.

De plus, il apparaît clairement que le modèle de Poisson, c'est-à-dire une répartition au hasard des virus dans le milieu étudié, qui traduit une homogénéité parfaite du milieu, correspond à des conditions d'échantillonnage idéales. Malheureusement, les titres viraux mesurés ne sont pratiquement jamais conformes à ce modèle privilégié. Par conséquent, pour un nombre donné, non nul, de virus présents dans le milieu à analyser, le risque de ne pas les mettre en évidence diminue lorsque la taille de l'échantillon augmente (c'est-à-dire lorsque le nombre de prélèvements effectués augmente), et leur détection est rendue d'autant plus difficile que le milieu est plus hétérogène (110).

1. 2. ORGANISATION D'UNE PROCEDURE D'ECHANTILLONNAGE

Cette démarche consiste à déterminer le moment, le lieu et la taille de l'échantillon. Il existe actuellement une certaine souplesse dans l'analyse virologique de l'eau du fait de l'absence de contraintes réglementaires. Toutefois, le prix élevé d'une recherche de virus dans le milieu hydrique, se traduit par une faiblesse dans la taille des échantillons prélevés et dans l'interprétation statistique des résultats obtenus.

La réalisation du prélèvement hydrique nécessite un certain nombre de précautions :

- éviter la contamination de l'échantillon (par le préleveur ou le manipulateur),
- éviter l'inactivation des virus pendant le transport (qui se fait à +4°C, après addition de thiosulfate de sodium pour neutraliser le chlore résiduel si nécessaire),
- stériliser la totalité du matériel de prélèvement,
- réaliser l'analyse rapidement après le prélèvement qui ne doit pas être stocké ; éventuellement le congeler si le volume le permet.
- prétraiter les parois du flacon de prélèvement si nécessaire.

Les prélèvements sont effectués en des points régulièrement disposés dans l'espace et dans le temps, et la taille de l'échantillon est fonction du degré d'hétérogénéité du milieu et du risque d'erreurs d'interprétation de première et de deuxième espèces que l'on s'autorise. Mais, la connaissance de l'hétérogénéité du milieu ne peut être obtenue qu'au fur et à mesure de l'accumulation de nouvelles données (110).

2. CONCENTRATION DES VIRUS DE L'EAU

Dans les eaux usées urbaines ou les eaux de rivières, la concentration virale peut être suffisamment élevée pour permettre une détection directe sans étape de concentration préalable. Dans les eaux épurées et les eaux de consommation, la concentration des virus est généralement très faible, et il devient très difficile de les détecter directement, même avec les méthodes virologiques les plus sensibles. Aussi, le préalable indispensable à la mise en évidence des virus dans l'eau est une concentration.

Le but de la concentration est d'obtenir sous un très faible volume tous les virus présents dans l'échantillon à analyser ; les systèmes de révélation des virus nécessitent en effet des échantillons de l'ordre du millilitre ou du microlitre.

Il n'existe pas de méthode universelle et de nombreux procédés ont déjà été proposés. On peut les regrouper en 7 grandes catégories :

- ultracentrifugation
- méthodes d'électrophorèse et d'électro-osmose
- méthodes de séparation en deux phases
- méthodes d'adsorption passive
- méthodes d'ultrafiltration

- méthodes d'adsorption-élution
- méthodes d'adsorption sur des floccs

2. 1. ULTRACENTRIFUGATION

Ce procédé consiste à accélérer le processus naturel de sédimentation des particules virales, en appliquant à la suspension virale une force centrifuge ainsi qu'un mouvement rotatif à grande vitesse dans une centrifugeuse refroidie. Les virus sont isolés dans un culot, difficilement visible lorsque l'on concentre des échantillons faiblement contaminés. Ce procédé permet uniquement de traiter des échantillons de petit volume, et sera plutôt utilisé pour réaliser une deuxième concentration (98, 108). Les virus peuvent être altérés du fait des chocs avec les particules en suspension et avec les parois du tube de centrifugation. La performance d'une détection ultérieure par culture peut être affectée par cette dégradation. Il est donc souhaitable d'amortir la sédimentation des virus.

2. 2. METHODES D'ELECTROPHORESE ET D'ELECTRO-OSMOSE

L'échantillon à concentrer est séparé d'une solution de polyélectrolytes de haut poids moléculaire par une membrane de dialyse. En appliquant un champ électrique, les virus s'adsorbent sur la membrane. On les relargue ensuite dans un volume réduit par inversion du courant. C'est une méthode simple, mais longue (36, 87).

2. 3. METHODES DE SEPARATION EN DEUX PHASES

Une solution aqueuse de polyéthylèneglycol (PEG) est ajoutée à l'échantillon à concentrer. Après agitation et décantation, il se forme 2 phases. Les virus sont dans la phase inférieure, sur le PEG, et à l'interphase. C'est une méthode valable uniquement pour les faibles volumes et le rendement est mauvais (74, 87, 92, 113).

2. 4. METHODES D'ADSORPTION PASSIVE

Des bandes de coton ou de gaze hydrophiles sont immergées dans des courants ou dans des eaux stagnantes (33, 111). Les virus s'adsorbent sur ces supports et sont relargués par expression ou par action d'éluants. C'est une méthode peu efficace, non quantitative, mais très simple et plus performante que la méthode par séparation des phases (33).

2. 5. METHODES D'ULTRAFILTRATION

Le liquide à traiter est amené 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 (8, 29, 39). La plupart des molécules de taille supérieure au pmnl sont arrêtées, ainsi qu'une faible partie des molécules de taille inférieure, tandis que solvants, sels, acides aminés, sucres passent à travers la membrane et constituent l'ultrafiltrat. Le débit de filtration est élevé, et dans le cas de l'ultrafiltration tangentielle (29), le colmatage est rare car le flux de liquide est tangentiel à la membrane. Le flux n'arrive donc pas perpendiculairement au filtre, mais le balaie tangentiellement, et de ce fait, les molécules ou virus présents sur le filtre sont entraînés et rejetés dans le flux.

Cette technique ne nécessite pas de prétraitement de l'échantillon. Toutefois un prétraitement des membranes à l'extrait de boeuf en solution à 3% peut être recommandé pour éviter l'adsorption des virus, notamment dans le cas des entérovirus (8, 29). A l'issue de l'ultrafiltration, une élution des virus adsorbés sur la membrane peut être réalisée avec une solution d'extrait de boeuf (39).

L'ultrafiltration est applicable à tous les volumes, tous les virus, tous les types d'eau, avec un bon rendement et sans variation de pH puisqu'une élution n'est pas requise. C'est un procédé reproductible, nécessitant peu de main d'oeuvre, mais long lorsqu'il faut traiter une eau chargée, et onéreux. Un soin particulier doit être apporté à la décontamination des membranes d'ultrafiltration, lorsque celles-ci sont réutilisables. Ce traitement peut faire appel à différents désinfectants : NaOCl à 0,1% pendant 10 min (8), NaOH 0,1N (29, 39) ou des associations d'acides et de bases fortes. Des récupérations variant de 55% à 83% ont été atteintes pour les entérovirus (8, 29, 39), et même jusqu'à 100% pour le virus de l'hépatite A (29).

Des systèmes à usage unique pour ultrafiltration sont désormais disponibles : ils peuvent être utilisés pour concentrer des petits volumes, en deuxième étape de concentration (118, 119).

2. 6. METHODES D'ADSORPTION-ELUTION

2. 6. 1. Principe

Les virus sont adsorbés sur un filtre ou sur des particules solides après un prétraitement de l'eau (acidification, addition de sels d'Al ou de Mg), ou du support d'adsorption. Le relargage des virus se fait dans un deuxième temps par passage d'un éluant tel qu'une solution d'extrait de boeuf et un tampon glycine à un pH compris entre 9 et 11. Parmi les supports, la poudre de verre, les membranes ou les cartouches filtrantes sont les plus utilisées.

2. 6. 2. Adsorption-élution sur poudre de verre

SARETTE (104) concentre ainsi les entérovirus sur de la poudre de verre concassée chargée négativement, après acidification de l'échantillon étudié avec HCl 1N. Cette technique est adaptée à la concentration de grands volumes, mais n'est pas applicable sur le terrain. Elle est valable pour tous types d'eau, mais plus adaptée aux entérovirus qu'à certains virus supportant mal l'acidification de l'échantillon. Certains auteurs l'utilisent aussi pour concentrer les rotavirus (17, 18, 108) ou les adénovirus (98). Le volume final est généralement supérieur à 30 ml, d'où une deuxième concentration souvent nécessaire (98).

BOSH (14) utilise la poudre de verre chargée positivement, ce qui évite l'acidification préalable de l'eau.

2. 6. 3. Adsorption-élution sur filtres ou cartouches

Des filtres ou des cartouches chargées positivement ou négativement en esters de cellulose, époxy-fibres de verre ou cellulose à charge modifiée peuvent aussi être utilisés (64, 77). Les filtres sont rapidement colmatés, alors que l'on a un volume mort important avec les cartouches.

Avec les filtres électronégatifs, une acidification préalable est nécessaire, et donc les rotavirus et les bactériophages sont altérés alors que les entérovirus résistent bien (110). C'est une méthode de terrain et de laboratoire, adaptées aux grands et petits volumes et à tous les types d'eau. Le colmatage est toutefois fréquent avec les eaux chargées, et une deuxième concentration est souvent nécessaire. C'est un procédé très onéreux du fait du surcoût occasionné par l'acidification des échantillons (77).

Avec les filtres chargés positivement, une acidification n'est pas prérequis et la technique est donc valable pour tous les virus (114), notamment poliovirus, adénovirus, réovirus, rotavirus et parvovirus (114). Les filtres électropositifs sont particulièrement chers (77). L'association d'une filtration sur filtre électropositif et d'une élution à l'extrait de boeuf à 3% à pH9,5, permet une récupération de 76% pour le poliovirus 1, de 31% pour les coliphages et de 23% pour les rotavirus (77).

2. 6. 4. Adsorption-élution sur laine de verre

La laine de verre peut également être utilisée, sans prétraitement de l'échantillon, pour concentrer des volumes de 100 à 1000 l. Une deuxième concentration par flocculation est souvent nécessaire. VILAGINES (122) récupère le poliovirus 1 à 70% avec cette technique, et obtient des résultats similaires pour d'autres entérovirus et le rotavirus. Avec cette technique, il isole 3 fois plus de virus (adénovirus, entérovirus, réovirus) dans des eaux de

rivières, qu'avec une concentration sur poudre de verre. Ce procédé est donc tout-à-fait adapté au travail de terrain, sans sélection des virus acido-résistants.

2. 7. CONCENTRATION PAR FLOCCULATION

C'est une technique utilisée le plus souvent pour concentrer un volume encore trop important, issu d'une concentration primaire (77, 78, 111, 122). On peut utiliser l'extrait de boeuf et la caséine (77), ou le lait écrémé en poudre à pH acide pour former des flocculats dans lesquels les virus sont emprisonnés. Le flocculat est ensuite isolé, puis dissous avec une solution à pH neutre. La formation d'un flocculat peut également être obtenue sans acidification, avec le sulfate d'ammonium (69), après addition d'extrait de boeuf à l'échantillon à traiter, à pH neutre. Cette technique est particulièrement recommandée pour l'isolement des bactériophages altérés par un pH acide (110).

Méthode	Méthode de		adaptée aux volumes		type d'eaux	valable pour tous les virus	colmatage	prix	pré-traitement de l'eau	durée
	terrain	labo.	petit	grand						
ultra centrifugation		X	X		tous	oui		bas	non	long
électrophorèse/électro-osmose		X	X		tous	oui		bas	non	long
séparation en 2 phases		X	X		tous	oui		bas	non	long
gaze	X			X	chargé	oui		bas	non	long
ultrafiltration	X			X	tous	oui	+/-	élevé	non	varie
absorption-élution		X		X	tous	non	+/-	élevé	souvent	varie
floculation		X	X		tous	non		bas	parfois	varie

Tableau 3 - Comparaison des différentes méthodes de concentration de l'échantillon hydrique

Une bonne méthode de concentration doit être simple, rapide, sensible, valable pour tous les virus, peu chère. Elle doit avoir un bon rendement, un taux de concentration élevé et devra produire un concentrat compatible avec les techniques de détection virale. Actuellement, l'ultrafiltration et les méthodes d'adsorption-élution sont les plus prometteuses (59, 110).

3. MISE EN EVIDENCE DES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE

Soit directement sur une partie aliquote du prélèvement lorsque l'on a une eau fortement contaminée, soit sur le concentrat, une recherche du ou des virus présents sera entreprise en mettant en oeuvre des techniques "classiques" de virologie ou des méthodes récentes de biologie moléculaire.

Quatre types de méthodes peuvent être utilisées :

- microscopie électronique (ME)
- inoculation sur cultures cellulaires
- techniques immunologiques
- méthodes de biologie moléculaire (hybridation moléculaire, PCR).

3. 1. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (ME)

Les échantillons sont observés après coloration négative avec des métaux opaques aux électrons. La ME directe détecte les virions intacts. Sa limite de sensibilité est 10^6 particules virales (59). L'immunoélectromicroscopie (IEM) permet de gagner une puissance en sensibilité, car l'addition d'anticorps spécifiques des virus recherchés, suivie de leur agrégation, permet de détecter 10^5 particules virales. Ces techniques ne sont pas adaptées à l'environnement, en particulier à l'eau d'alimentation, car les échantillons sont généralement trop pauvres en virus, et l'interférence avec les bactériophages est importante.

SCHWARTZBROD (108) obtient toujours un résultat négatif en ME pour la recherche de rotavirus sur des eaux usées brutes et épurées, alors que l'immunoenzymologie donne des résultats positifs sur les eaux usées brutes. Dans le cas du virus de Norwalk, l'IEM est peu sensible (57).

3. 2. CULTURE

L'échantillon est inoculé sur un tapis cellulaire in vitro. En présence d'unités infectieuses, il y a apparition d'un effet cytopathogène, et les modifications caractéristiques des cellules sont visibles au microscope inversé. Des cultures de mélange de cellules peuvent être utilisées au lieu d'un seul type cellulaire, afin d'augmenter la sensibilité de la technique et d'élargir le spectre de détection.

La sensibilité de la culture, bien que moins bonne que celle des techniques récentes d'amplification et d'hybridation moléculaire, permet à KOPECKA (69) de détecter des entérovirus dans 100% d'échantillons de boue, alors que la RT-PCR ne détecte que 60% de positifs. Ces résultats négatifs en RT-PCR sont souvent la conséquence d'inhibiteurs.

Par contre FUCHS (36) n'obtient jamais de résultat positif en culture en recherchant des entérovirus dans les eaux de rivières ou de piscines à cause d'un effet toxique du concentrat pour les cellules. Alors que l'hybridation moléculaire détecte des entérovirus dans certains prélèvements.

L'infection des cellules par le virus recherché peut également être détectée par une réaction immunologique : immuno-fluorescence (59), immuno-enzymologie (enzyme linked immunosorbent assay ou ELISA) ou même plus rarement immuno-radiologie (radio-immuno focalisation assay ou RIFA) (75, 92). Ces techniques présentent un intérêt pour les virus qui se multiplient dans les cellules sans provoquer d'effet cytopathogène (rotavirus par exemple), ou pour les virus dont la multiplication intracellulaire n'est décelable qu'après un long délai (virus de l'hépatite A par exemple).

3. 3. IMMUNOESSAIS

Il s'agit là de détecter l'antigène viral et non plus le virus infectieux.

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 en test ELISA. Avec cette technique, SCHWARTZBROD (108) obtient une sensibilité de $3 \cdot 10^6$ particules virales par litre d'eau pour la détection du rotavirus dans un échantillon d'eau préalablement concentré en 2 étapes. Cette technique bien que peu sensible et peu adaptée aux eaux d'alimentation, donne des résultats positifs bien plus souvent que la ME (108).

L'enzyme peut être remplacée par un radio-isotope dans le cas de la radio-immunologie.

3. 4. TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLECULAIRE

3. 4. 1. Sans amplification

Le principe de ces techniques consiste à faire réagir les acides nucléiques viraux monobrin, extraits de l'échantillon contaminé, avec une sonde complémentaire portant un radio-isotope (sonde chaude) ou un ligand (sonde froide). Il s'établit alors des liaisons hydrogènes spécifiques entre nucléotides complémentaires. Les acides nucléiques à détecter peuvent être en solution, sur une membrane de nitrocellulose (blot hybridation) ou dans des cellules en culture (hybridation in situ).

En dot blot hybridation avec une ribo-sonde marquée à la digoxigénine, FUCHS (36) détecte 2 à 5 pg (environ 10^4 DICT50) du génome d'entérovirus après concentration d'échantillons de

20 litres et extraction de l'ARN. En utilisant une sonde marquée à la radioactivité, KOPECKA (69) obtient une sensibilité peu différente (10^4 à 10^7 DICT50), mais variable selon le type d'entérovirus. L'utilisation d'une sonde froide (digoxigénine) donne donc des résultats très similaires de ceux obtenus en utilisant la radioactivité, et beaucoup plus rapidement (36). HURST (59) détecte 40 fois plus d'adénovirus dans des échantillons hydriques grâce à la technique d'hybridation in situ, par rapport aux techniques de culture ou d'immunofluorescence sur cellules infectées.

3. 4. 2. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La sensibilité des techniques d'hybridation moléculaire peut être considérablement augmentée en recopiant au préalable les acides nucléiques viraux par une réaction d'amplification en chaîne, catalysée par une ADN polymérase (Polymerase Chain Reaction ou PCR). Classiquement, une PCR de 20 à 40 cycles permet d'obtenir un million de copies à partir d'un brin d'ADN originel (91).

Ce procédé nécessite tout d'abord la dénaturation des acides nucléiques double-brin, c'est-à-dire la séparation des 2 brins. La fixation des amorces se fait alors de façon spécifique dans des conditions de température bien définies. Elle est suivie de l'élongation des amorces afin de recopier l'information génomique. Cette opération est répétée n fois, d'où la formation de 2^n copies du génome. Une étape préalable à la PCR peut être nécessaire pour certains virus : il s'agit de la transformation de l'ARN en ADN ou reverse transcription (RT).

Le produit d'amplification est ensuite révélé par migration dans un gel d'agarose et/ou par hybridation avec une sonde chaude ou froide.

En couplant une PCR et une hybridation avec une sonde marquée à la digoxigénine, FUCHS (36) obtient une sensibilité de 50 fg pour la détection d'ARN d'entérovirus. Lorsque KOPECKA (69) utilise une sonde marquée au ^{32}P , cette sensibilité descend à 1 fg, soit 200 copies (technique de concentration des virus différente entre les 2 auteurs, mais même technique d'extraction). Pour le rotavirus, la sensibilité de la RT-PCR est voisine de 100 fg (126) : elle est 1000 fois supérieure à celle de l'immunoenzymologie.

La PCR est une technique ultra-sensible, tout-à-fait adaptée pour la détection des virus dans l'environnement, notamment pour les virus non cultivables sur tapis cellulaire. Entérovirus, rotavirus, ou virus de l'hépatite A ont ainsi pu être détectés dans les eaux usées brutes ou épurées, ou dans les eaux d'alimentation (3, 46, 62, 125, 128). Toutefois cette méthode se heurte à 2 handicaps majeurs. Il s'agit d'une part de l'effet d'inhibiteurs, comme l'acide humique, qui exercent vraisemblablement leur action sur les enzymes reverse transcriptase et ADN polymérase. D'autre part, cette technique permet de mettre en évidence uniquement des acides nucléiques, sans apporter de preuve sur la présence d'un virus infectieux susceptible de provoquer une infection.

Type d'essai	Quantitatif	Sensibilité	Mesure l'infectiosité	Délai de résultat	Coût
<i>Microscopie électronique</i>	non	faible	non	court	élevé
<i>Culture</i>	oui	intermédiaire	oui	long	faible
<i>Immuno essai</i>	semi	faible	non	court	faible
<i>Hybridation moléculaire</i>	semi	intermédiaire	non	court	élevé
<i>PCR</i>	semi	forte	non	intermédiaire (automatisation possible)	élevé

Tableau 4 - **Tableau comparatif des différentes méthodes de mise en évidence des virus dans les échantillons hydriques.**

4. LES INHIBITEURS DE LA DETECTION DES VIRUS

Un résultat négatif de recherche de virus dans le milieu hydrique ne signifie pas avec certitude l'absence de virus, mais peut être la conséquence d'un mauvais échantillonnage comme nous l'avons vu, ou de l'effet d'inhibiteurs. La nature de ces inhibiteurs est à ce jour mal définie, et il pourrait s'agir de polysaccharides, d'ions métalliques comme l'aluminium ou le cuivre (113), de produits de dégradation d'origine bactérienne, ou plus vraisemblablement de substances humiques dont les acides fulvique et humique (3, 53).

L'impact de ces inhibiteurs est mal connu, et pour certains auteurs ils empêchent l'adsorption des virus sur les filtres lors de l'étape de concentration (52, 53), alors que pour d'autres, ils agiraient plutôt au moment de la mise en évidence des virus. En effet, les inhibiteurs, une fois concentrés, pourraient avoir un effet toxique sur les cultures cellulaires (5, 29, 36), ou bloquer l'action des enzymes utilisées dans les réactions d'amplification (50, 113).

Une purification de l'échantillon hydrique ou du concentrat est souvent souhaitable. Elle peut faire appel à différents procédés : un passage sur résines de types Séphadex ou Chelex (3, 78, 115), l'utilisation de produits chimiques comme la guanidine et l'isothiocyanate, seuls (73), ou associés à de la silice (11), l'usage d'hydroxyapatite (103), de fibres de cellulose (CF11) (125, 126), ou encore de billes immunomagnétiques qui piègent les virus et les soustraient à l'effet des inhibiteurs (50, 82, 86).

Partie Expérimentale

INTRODUCTION

La fréquence et les risques de la contamination virale de l'eau destinée à la consommation humaine sont très mal connus. Leur évaluation nécessite un outil analytique performant. Les techniques ultra-sensibles de biologie moléculaire ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude sanitaire du milieu hydrique, et la bonne compréhension de l'épidémiologie des affections virales transmises par l'eau.

Le premier objectif de notre étude était de mettre au point et de valider une méthodologie pour la concentration et la révélation des principaux virus du milieu hydrique, afin de détecter une contamination virale des eaux d'alimentation.

Nous avons ciblé nos investigations sur deux catégories de virus du milieu hydrique : les entérovirus et les rotavirus, choisis pour les raisons suivantes.

Les entérovirus constituent une large famille de virus pouvant provoquer un spectre varié de pathologies peu spécifiques. Ils font partie des micro-organismes retenus par les autorités sanitaires dans le cadre du contrôle de l'eau. Ces virus peuvent être isolés et quantifiés sur des cultures cellulaires.

Les rotavirus sont pathogènes pour les hommes et les animaux. Fréquemment impliqués dans les gastro-entérites aiguës infantiles, ils sont rejetés en grande quantité dans les selles, et généralement difficiles à isoler sur culture cellulaire. Leur présence dans l'eau polluée est fréquente et les traitements usuels de potabilisation de l'eau peu efficaces pour les éliminer.

De plus, entérovirus et rotavirus sont des virus à ARN, non enveloppés, et de ce fait particulièrement résistants dans l'environnement.

Le deuxième objectif était d'étudier l'impact sanitaire lié à la présence de rotavirus dans l'eau d'alimentation au moyen d'une étude prospective de type cas-témoins et de la technique du séquençage nucléotidique.

Après des essais préliminaires avec des échantillons d'eau expérimentalement contaminés, deux séries de prélèvements ont été effectuées en 1993 et 1994 dans le département de l'Isère.

La première, plutôt ciblée sur les entérovirus, a été conduite en période estivale, sur des eaux présentant fréquemment une mauvaise qualité bactériologique et considérées a priori comme "doûteuses".

La deuxième étude, réalisée en hiver, était axée sur les rotavirus. Nous avons voulu approcher le rôle potentiel de l'eau d'alimentation dans l'apparition des cas sporadiques ou épidémiques de

gastro-entérites aiguës infantiles à rotavirus conduisant à une hospitalisation. Dans cette optique, nous avons mis en place un réseau de surveillance des cas et analysé des échantillons d'eau prélevés à proximité du domicile des cas.

CHAPITRE 1

ETUDE PRELIMINAIRE

Concentration et mise en évidence des virus dans l'eau expérimentalement contaminée

1. ECHANTILLONS ET METHODES

1. 1. DEFINITIONS

DICT₅₀

C'est la dilution virale nécessaire pour que 50% des cultures cellulaires inoculées soient infectées. Cette unité ne donne pas d'informations sur le nombre d'unités infectieuses dans l'échantillon (99).

pmnl

C'est une valeur caractérisant une membrane d'ultrafiltration qui s'exprime en dalton. Les molécules, ou virus, de poids moléculaires supérieurs au pmnl du filtre sont retenus à sa surface ou remis en circulation.

1. 2. ECHANTILLONS D'EAU

Dans cette première partie de notre travail, deux types d'échantillons étaient utilisés :

- * des échantillons d'eau contaminés au laboratoire avec un seul virus :
poliovirus ou rotavirus
- * des échantillons d'eau contaminés au laboratoire avec un mélange de virus :
poliovirus, rotavirus et virus de l'hépatite A (VHA).

Des témoins négatifs (eau déminéralisée stérile) étaient aussi analysés.

Des bouteilles de verre étaient remplies avec 2 l d'eau déminéralisée, puis stérilisées à l'autoclave pendant 20 min à 121°C. L'eau était contaminée avec 2 ml de la suspension virale juste avant chaque expérimentation.

Vingt quatre échantillons étaient contaminés avec le poliovirus souche SABIN type 1. Huit dilutions de la suspension virale (10^6 , 10^3 , 10^2 , 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} DICT₅₀/l) étaient analysées et 3 essais étaient réalisés pour chaque dilution.

Dans le cas du rotavirus, 16 échantillons étaient contaminés avec la souche bovine RFC67. Des dilutions de 10^5 DICT₅₀/l à 10^{-2} DICT₅₀/l (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2}) étaient testées et deux essais étaient effectués pour chaque dilution.

Dans un deuxième temps, 3 échantillons étaient contaminés simultanément avec les souches de poliovirus et de rotavirus précédemment citées, et avec la souche CF53 du VHA. Les titres viraux de chacun des 3 contaminants du mélange étaient :

Virus	Mélange 1	Mélange 2	Mélange 3
poliovirus 1	10DICT ₅₀ /l	1 DICT ₅₀ /l	1 DICT ₅₀ /l
rotavirus	10^3 DICT ₅₀ /l	10^2 DICT ₅₀ /l	1 DICT ₅₀ /l
VHA	10^2 DICT ₅₀ /l	10 DICT ₅₀ /l	1 DICT ₅₀ /l

Vingt témoins négatifs étaient analysés au cours de l'étude.

1. 3. CONCENTRATION DES ECHANTILLONS

Nous avons réalisé une ultrafiltration tangentielle avec le système Minitan® (Millipore), suivie d'une deuxième étape de concentration qui était soit une ultracentrifugation, soit une seconde ultrafiltration avec le concentrateur Centriprep® (Amicon). Pour l'ultrafiltration, des ultrafiltres en polysulfone de poids moléculaire nominal limite (pmnl) égal à 10^5 daltons ont été sélectionnés.

1. 3. 1. Première concentration : ultrafiltration tangentielle (Minitan®)

L'échantillon de 2 l, préalablement agité vigoureusement, était amené grâce à une pompe péristaltique sur les 4 membranes empilées (de surface de filtration de 60 cm² chacune) d'une cellule Minitan en acier inoxydable. Les membranes n'étaient pas prétraitées au cours des essais. Les paramètres de la filtration étaient un débit d'alimentation de 8 l/min et une pression de 1 bar.

Le flacon échantillon à traiter était placé dans la glace durant l'opération. Après environ 20 min, tout le volume était concentré et le volume mort voisin de 15 ml, correspondant au rétentat, était recueilli dans le flacon échantillon (schéma 1), tandis que l'ultrafiltrat était rejeté.

Les membranes réutilisables étaient décontaminées en faisant circuler pendant 30 min une solution d'1 l d'acide nitrique 0,1N, en rinçant avec de l'eau distillée stérile, puis en faisant passer en circuit fermé pendant 30 min 1 l d'une solution d'hydroxyde de sodium 0,1N. Un rinçage abondant avec de l'eau distillée stérile était effectué en fin de décontamination et avant chaque série de manipulations pour éliminer toute trace de soude. Les membranes étaient conservées à +4°C dans la soude 0,1N entre 2 séries d'essais.

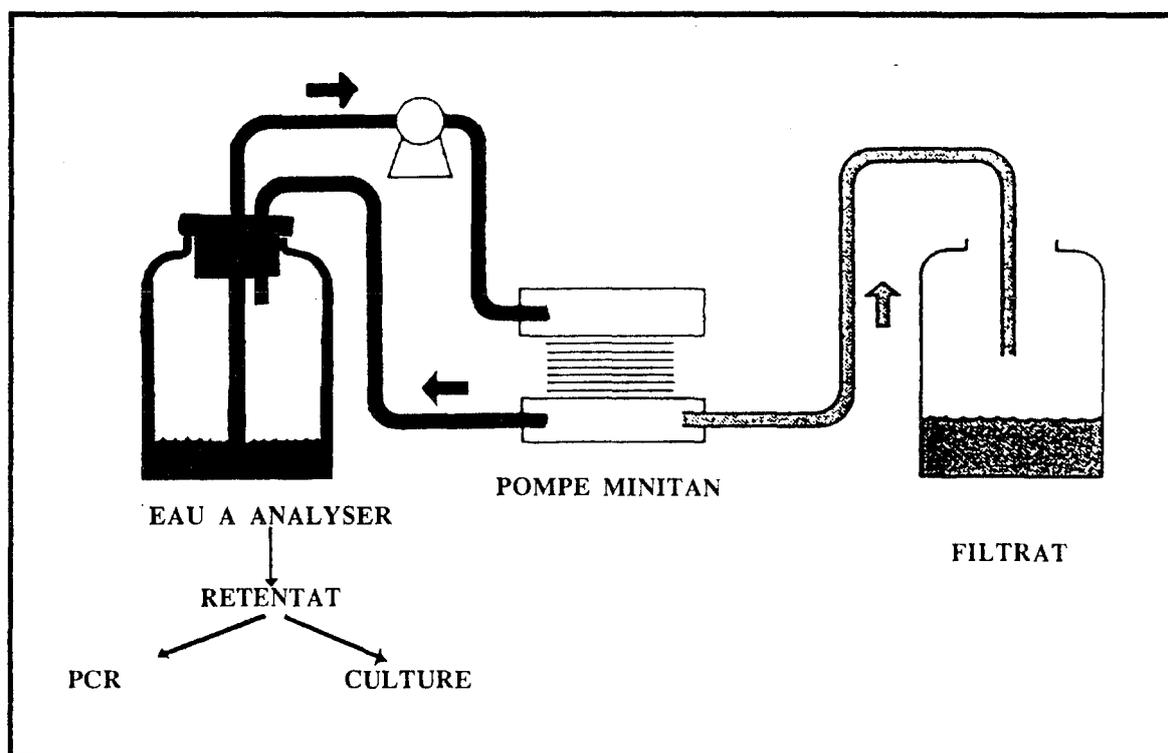


Schéma 1 - Principe du fonctionnement de l'appareil Minitan® (Millipore)

Pour les essais réalisés soit avec le poliovirus, soit avec le rotavirus, il n'y avait pas de décontamination des membranes entre deux concentrations, puisque l'on travaillait de la plus faible à la plus forte concentration virale.

En ce qui concerne les échantillons pluri-contaminés, les concentrations étaient réalisées trois jours différents et les membranes étaient décontaminées après chaque manipulation. Dans chacun des 3 essais, avant le passage de l'échantillon d'eau contaminée, 2 l d'eau déminéralisée stérile étaient concentrés afin de jouer le rôle de témoin négatif.

Chaque rétentat était divisé en deux parties égales : l'une, R1, était destinée à la culture cellulaire et l'autre, R2, était concentrée à nouveau, afin d'obtenir un volume encore plus petit, adapté à la technique d'amplification du génome par réaction de polymérisation en chaîne (PCR).

1. 3. 2. Deuxième concentration

1. 3. 2. 1. Ultracentrifugation

Dans le cas des échantillons expérimentalement contaminés avec des dilutions séquentielles d'un seul type viral, l'ultracentrifugation était choisie comme deuxième procédé de concentration.

Afin de protéger les virus durant l'ultracentrifugation, une solution de sucrose à 30% dans du tampon PBS stérile (3 ml) était disposée dans les tubes à centrifuger, puis la fraction R2 du rétentat était déposée délicatement à la surface.

Après 4 h d'ultracentrifugation à 75 000 g, à +4°C, le culot était récupéré avec une quantité minimale de tampon à base de guanidinium (environ 300 µl).

1. 3. 2. 2. Ultrafiltration (Centriprep®)

Pour les échantillons contaminés avec le mélange des 3 virus, nous avons testé un système à usage unique pour ultrafiltration, préalablement stérilisé à l'oxyde d'éthylène et prétraité avec une solution d'extrait de boeuf à 3% (filtrée sur une membrane 0,22 µm-Nalgène) juste avant utilisation, afin de limiter le phénomène d'adsorption, notamment dans le cas des entérovirus.

Avec le concentrateur Centriprep®, le rétentat issu de la première étape de concentration était concentré en 30 min, afin d'obtenir un volume final voisin de 500 µl.

1. 4. MISE EN EVIDENCE DES VIRUS SUR CULTURE CELLULAIRE

Des essais de culture étaient réalisés afin de détecter les virus dans les rétentats. Une lignée cellulaire établie d'origine simienne (cellules MA 104) et une lignée de cellules diploïdes dérivant d'embryons humains (cellules MRC 5) étaient utilisées : ces cellules étaient cultivées sur des plaques en plastique à 6 puits (Falcon).

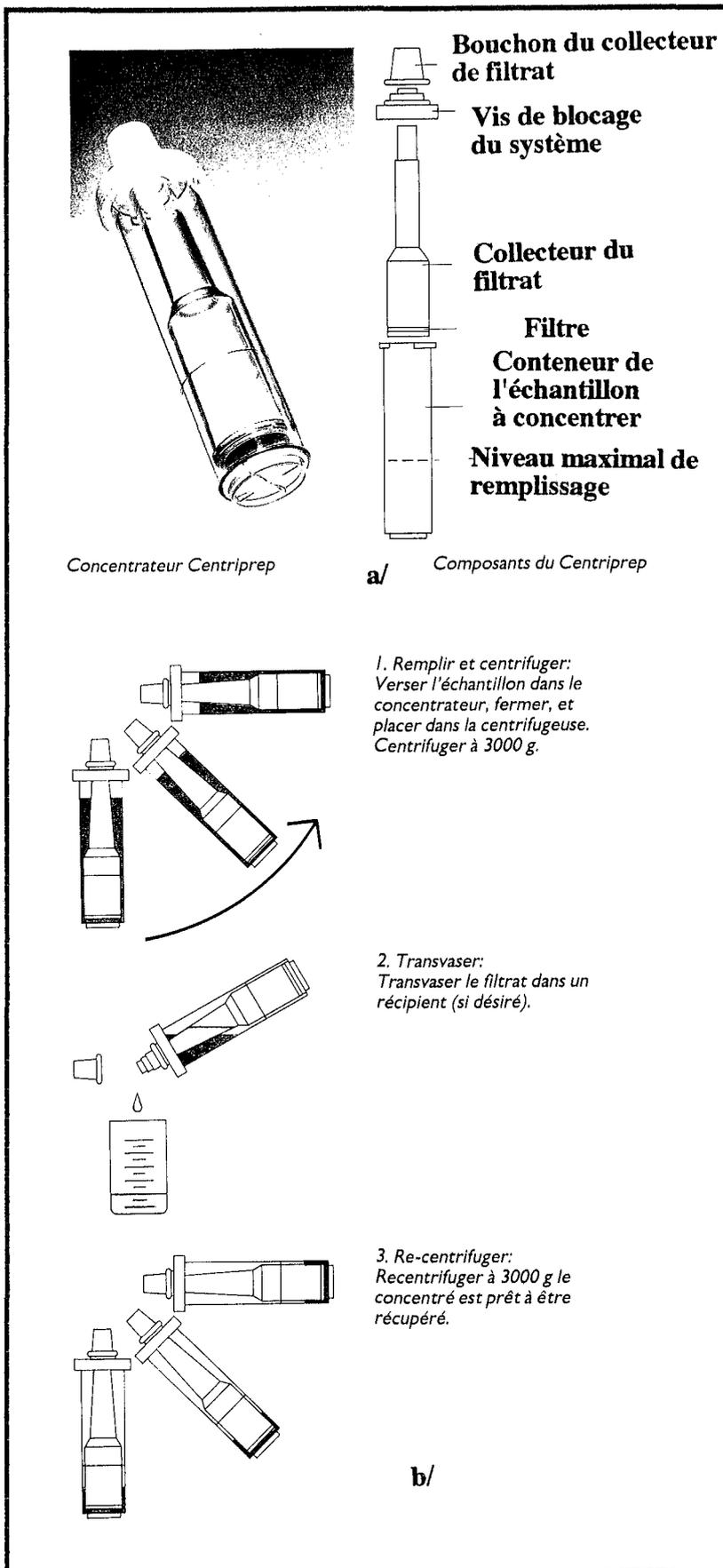
La sensibilité de la culture, après concentration avec le Minitan®, a été déterminée dans les manipulations réalisées avec un seul type de virus par échantillon d'eau (poliovirus d'une part, rotavirus d'autre part).

Un mélange d'antibiotiques et de tampon PBS étaient ajoutés à la partie R1 du rétentat.

Afin de mettre en évidence le poliovirus 1, les cellules MRC 5 étaient inoculées avec la fraction R1, et dans le cas du rotavirus, les essais de culture étaient réalisés sur cellules MA 104. Les cellules étaient incubées à 37°C, dans une atmosphère enrichie avec 5% de CO₂.

Les cellules étaient observées quotidiennement. L'essai de culture était considéré positif lorsque l'observation au microscope inversé révélait un effet cytopathogène, confirmé par une subculture.

La culture n'a pas été effectuée avec les rétentats collectés après concentration des échantillons contaminés avec le mélange des 3 virus.



**Schéma 2 -
 Concentrateur
 Centriprep® (Amicon)**

- a) Composants
- b) Principe d'utilisation

1. 5. DETECTION DES GENOMES VIRAUX PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)

Cette opération comprend 4 étapes distinctes :

1/ l'extraction : c'est la destruction de la capsid e et la libération des ARN viraux.

2/ la reverse transcription (RT) : l'ARN n'étant pas directement amplifiable, elle permet de le transformer en ADN complémentaire (cDNA).

3/ la PCR proprement dite, ou amplification des cDNA par réaction enzymatique de polymérisation en chaîne.

4/ la révélation et la caractérisation des génomes amplifiés.

1. 5. 1. Extraction des acides nucléiques

Cinq méthodes différentes étaient testées afin de déterminer celle qui est la plus adaptée aux trois virus.

1. 5. 1. 1. Méthode I : Extraction isothiocyanate de guanidinium/phénol/chloroforme (21)

L'ARN viral est extrait du concentrat secondaire, R2, par une méthode rapide utilisant l'isothiocyanate de guanidinium, le phénol et le chloroforme.

300 µl de tampon guanidinium 2X sont ajoutés à 300 µl de concentrat, suivi par l'addition de 800 µl de phénol saturé en eau et de 200 µl de chloroforme dans des tubes Eppendorf stériles de 2 ml. La solution est agitée vigoureusement et laissée dans la glace pendant 15 min. Puis les deux phases sont séparées par centrifugation à 4 000 rpm pendant 15 min. La phase supérieure est transférée dans un autre tube Eppendorf stérile contenant 3 µl de glycogène (Boehringer/Solution stock à 20 mg/ml). L'ARN précipité par deux volumes d'éthanol absolu glacial (-20°C) est maintenu à -20°C 24 à 48 h. L'ARN est isolé par centrifugation à 12 000 rpm pendant 20 min à +4°C ; le culot est lavé avec de l'éthanol 70%, centrifugé, puis repris dans 50 µl d'eau traitée au diéthylpyrocarbonate (H₂O DEPC).

1. 5. 1. 2. Méthode II : Extraction avec la protéinase K (68)

100 µl du concentrat R2 sont mis en contact avec la protéinase K (100 µg/ml) pendant 1 h à 37°C, puis chauffé à 56°C pendant 1 h.

1. 5. 1. 3. Méthode III : Traitement avec un tampon de lyse

10 µl d'un tampon de lyse 10X à base de triton, 5 µl de DTT (Dithiothreitol 50mM) et 20 Unités de RNAsine humaine placentaire (Boehringer) sont ajoutés à 90 µl de concentrat R2. La

solution est agitée vigoureusement et placée dans la glace pendant 10 min.

1. 5. 1. 4. Méthode IV : Traitement par un simple chauffage (100)

Juste avant la RT-PCR, 10 µl de concentrat R2 sont chauffés à 65°C pendant 30 min dans un bain-marie, dans des tubes Eppendorf de 0,5 ml.

1. 5. 1. 5. Méthode V : Extraction type méthode I couplée à une purification sur le CF11 cellulose

Cette méthode (126) était testée uniquement pour l'ARN de rotavirus, dont la RT-PCR est généralement plus performante après purification, notamment sur poudre de fibres de cellulose. La phase aqueuse résultant de l'extraction phénol/chloroforme (méthode I) est mélangée dans un tube Eppendorf avec de l'alcool absolu telle que la concentration finale de l'éthanol soit 15%. A cette phase aqueuse sont ajoutés 30 mg de CF11 cellulose (Sigma). Les tubes sont agités vigoureusement pendant 10 sec, puis laissés sur un agitateur rotatif pendant 90 min à +4°C.

L'échantillon est ensuite centrifugé pendant 1 min et le surnageant éliminé. Le culot est lavé 3 fois avec un tampon contenant de l'éthanol à 15%. Un quatrième lavage est réalisé dans une solution tampon sans éthanol pour éluer l'ARN du CF11. Après 5 min de centrifugation, le surnageant est récupéré et l'ARN est précipité avec de l'éthanol absolu glacial en présence de 3 µl de glycoène. Le précipité est maintenu à -20°C pendant 24 à 48 h. Ultérieurement, le culot est isolé par centrifugation et repris dans un volume minimal d'H₂O DEPC.

NB - Une sixième méthode, non développée ici, était testée pour l'extraction de l'ARN du VHA. Cette méthode par capture antigénique utilise un anticorps monoclonal anti-HAV (62, 82) (voir référence technique 2).

1. 5. 2. Reverse transcription (RT)

10 µl de l'extrait d'ARN sont chauffés pendant 3 min à 95°C ou à 98°C selon que l'on cherche à détecter le poliovirus ou le VHA, et 5 min à 97°C dans le cas du rotavirus. Cette étape permet de dénaturer le double brin d'ARN. Les ARN sont ensuite refroidis dans la glace.

10 µl d'ARN dénaturé sont ensuite ajoutés à 10 µl du cocktail de RT : désoxynucléotides triphosphate (10mM chacun), l'amorce anti-sens (10 pmol), un inhibiteur de ribonucléase (20 unités - Boehringer), le tampon de l'enzyme reverse transcriptase (4 µl d'un mélange 5X), une solution Hepes/HCl 0,1M pH6,9 (1 µl), dithiothreitol 100mM (2 µl) et l'enzyme reverse transcriptase (RT - 200 unités - Gibco-BRL).

La transcription de l'ARN en cDNA s'effectue en 90 min à 37°C. Après cette étape, un plateau à

95°C pendant 4 min stoppe l'action de la RT.

1. 5. 3. Amplification par polymérase chain reaction (PCR)

1. 5. 3. 1. Amorces

* *Entérovirus*

Nous avons utilisé les amorces consensuelles rapportées dans la littérature (101). Ces amorces sont situées dans la région 5' non codante du génome viral.

L'amorce 2 est comprise entre la base 450 et la base 476, et l'amorce 1 entre les bases 584 et 603. La longueur du fragment amplifié est donc 154 paires de bases (bases 450 à 603).

Amorce 2 : 5' - CCTCCGGCCCCTGAATGCGGCTAAT - 3'

Amorce 1 : 5' - ATTGTCACCATAAGCAGCCA - 3'

* *Rotavirus*

Nous avons choisi d'amplifier une partie du génome située sur le segment 9, codant pour la protéine VP7 de la capsid externe, commune à tous les rotavirus du groupe A, les plus fréquemment impliqués dans les contaminations humaines. Les amorces Beg 9, située entre les bases 1 et 28, et End 9, située entre les bases 1036 et 1062 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 1062 paires de bases (47).

Beg 9 : 5' - GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG - 3'

End 9 : 5' - GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG - 3'

* *VHA*

Les amorces choisies sont situées dans la région du génome du VHA codant pour les protéines de capsid VP3-VP1. Ces séquences situées dans une région variable sont bien conservées dans différentes souches.

L'amorce B et l'amorce A sont complémentaires des parties du génome comprises respectivement entre les bases 2167 à 2192 (région C terminale de VP3) et 2390 à 2414 (région VP1). Le fragment amplifié a donc une longueur de 248 paires de bases (bases 2167 à 2414).

Amorce B : 5' - GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG - 3'

Amorce A : 5' - GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG - 3'

1. 5. 3. 2. Technique

10 µl de chaque cDNA (entérovirus - rotavirus - VHA) sont ajoutés à 40 µl d'un cocktail pour PCR constitué du tampon de la Taq Polymérase, des désoxynucléotides triphosphate (200µM de chaque), des amorces sens et anti-sens (40 pmol de chaque) et de Taq Polymérase (Perkin Elmer Cetus - 1,25 unité). Une couche d'huile minérale est posée en surface, puis les tubes Eppendorfs sont disposés dans le thermal DNA cycler (Perkin Elmer Cetus). Les programmes de PCR sont les suivants selon que l'on cherche à détecter les entérovirus, le rotavirus ou le VHA.(Tableau 1)

PCR						
Type de virus	nombre de cycle	dénaturation	fixation des amorces	extension des amorces	extension finale	stop réaction
entérovirus	35	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 8 min	+4°C
rotavirus	35	94°C 1 min	50°C 2 min	72°C 2 min	72°C 8 min	+4°C
VHA	40	94°C 1 min	55°C 1 min	72°C 1 min	72°C 8 min	+4°C

Tableau 1 - Programmes de la PCR pour entérovirus, rotavirus et VHA.

1. 5. 4. Révélation et caractérisation du produit de la PCR

1. 5. 4. 1. Révélation : électrophorèse et Southern blot

20 µl de produit amplifié (mélangé à 3 µl de bromophénol), sont déposés sur un gel d'agarose à 2% et soumis 2 h à une électrophorèse (80 mV) dans du tampon TBE. A la fin de l'électrophorèse, la coloration du gel par le bromure d'éthidium et l'observation sous rayons ultra-violet permettent de visualiser l'ADN amplifié.

Les fragments d'ADN présents sur le gel sont transférés par capillarité sur membrane de nylon selon la technique du southern en milieu alcalin (NaOH 0,4M) pendant un minimum de 4 h pour les petits fragments, et pendant 24 h pour les longs fragments. Après transfert, la membrane est neutralisée dans du SSC2X pendant quelques sec. La membrane séchée est ensuite conservée à +4°C jusqu'à l'hybridation.

1. 5. 4. 2. Caractérisation : hybridation avec une sonde chaude marquée au ^{32}P

L'analyse des échantillons amplifiés est faite par hybridation avec des sondes internes spécifiques marquées au phosphore 32 (^{32}P).

entérovirus	5' - ATGAAACCCACAGGCACAAAG - 3' (548 à 568)
rotavirus	5' - GATCCTGTTGGCCATCC - 3' (376 à 392)
VHA	5' - TCAACAACAGTTTCTACAGA - 3' (2232 à 2251)

** Préparation de la sonde*

La solution de réaction pour le marquage de la sonde est constituée de :

•sonde entérovirus, rotavirus ou VHA	10 μl (10 pmol)
•Tampon PNK 10X	2 μl
•Polynucléotide kinase	1 μl
•H ₂ O	6 μl
•(^{32}P)ATP (10 mCi/ml)	1 μl

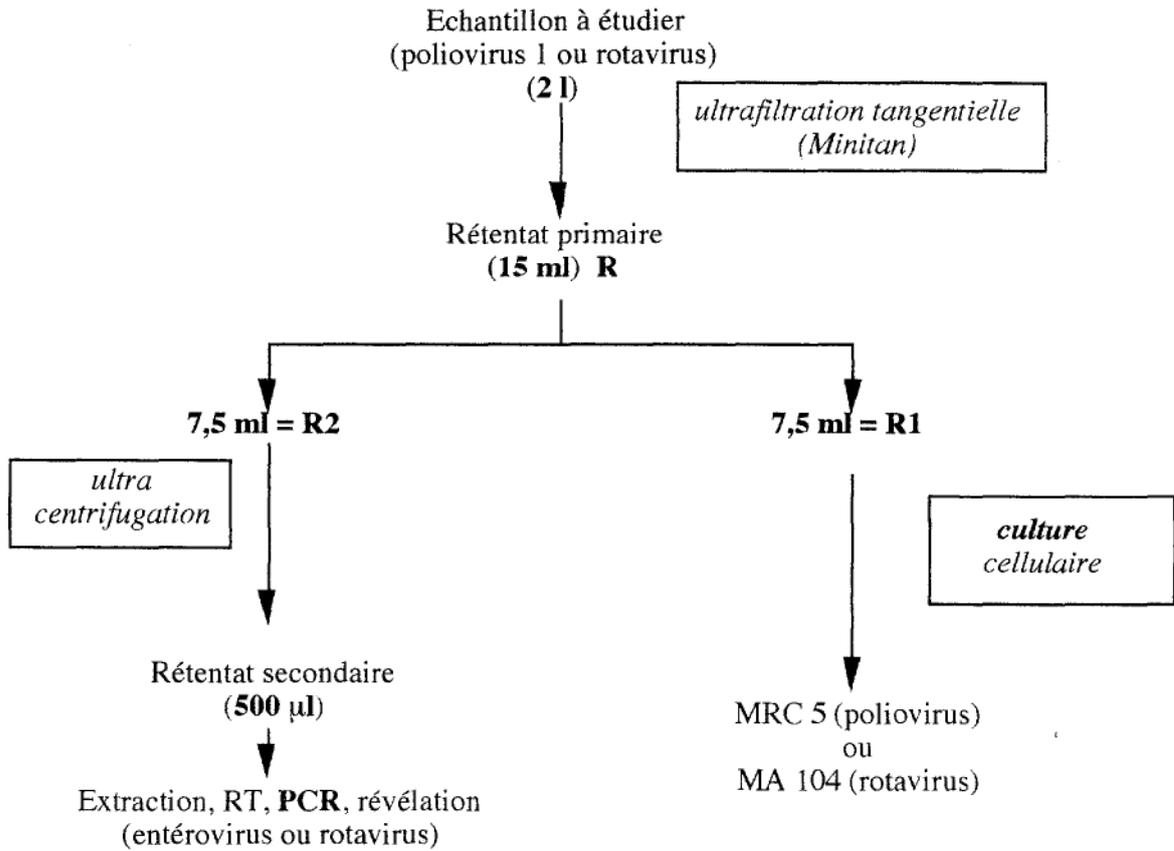
Cette solution est incubée à 37°C pendant 30 min. L'activité de la kinase est arrêtée en chauffant 1 min à 100°C. La sonde est purifiée sur colonne de gel Séphadex G-25.

** Hybridation*

Pour l'hybridation, la membrane de nylon est placée dans 15 ml de tampon de préhybridation (préchauffé à 40°C) et incubée au moins 1 h à 40°C sous agitation rotative. La sonde marquée est ajoutée au milieu. L'hybridation dure 2 h à 40°C. Trois lavages sont ensuite réalisés pendant 10 min, le premier en SSC 2X, le second en SSC 2X-SDS 1% et le troisième en SSC 0,2X-SDS 0,1%. La membrane séchée est mise en autoradiographie dans une cassette à -80°C et révélée après 4 h ou une nuit d'exposition.

Tout prélèvement positif donnera un spot bien visible sur le film après révélation.

a/ Mode d'analyse des échantillons monocontaminés



b/ Mode d'analyse des échantillons polycontaminés

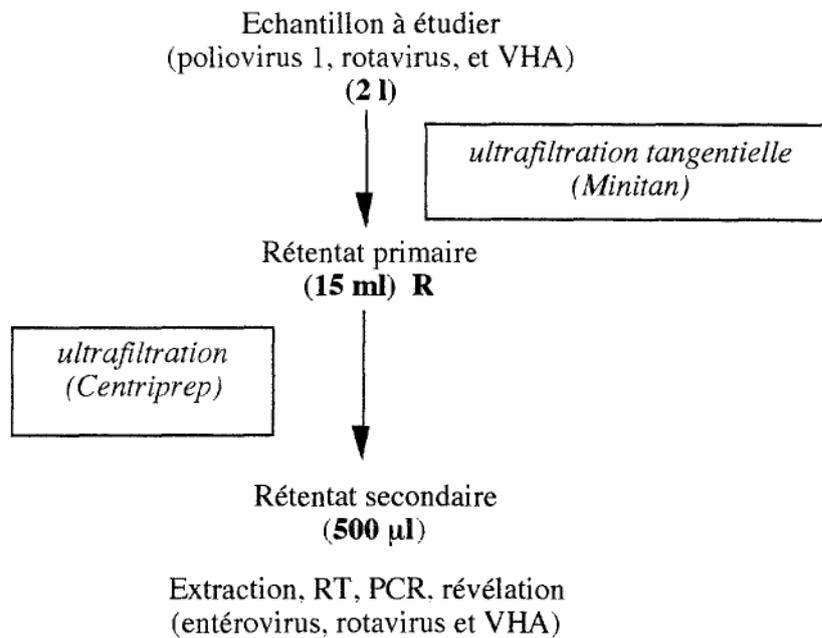


Schéma 3 - Traitement des échantillons expérimentalement contaminés

2. RESULTATS

2. 1. ECHANTILLONS D'EAU MONOCONTAMINES

2. 1. 1. Culture cellulaire

La moitié R1 de chaque rétentat primaire était inoculée sur culture cellulaire.

Dans le cas du poliovirus 1, l'échantillon d'eau doit contenir un minimum de 1 à 100 DICT₅₀/l pour que l'on observe un effet cytopathogène après concentration (tableau 2). Pour le rotavirus, il faut 1 DICT₅₀/l (tableau 3).

2. 1. 2. PCR

L'autre moitié R2 de chaque rétentat était ultracentrifugée. Nous avons choisi l'ultracentrifugation comme deuxième procédé de concentration dans ces travaux préliminaires, car cette technique, en dépit de sa lourdeur, fait office de référence pour la concentration virale. L'ARN était extrait à partir du culot selon la méthode I, puis amplifié par RT-PCR selon les protocoles décrits dans la rubrique méthodes.

Cette technique a permis de détecter l'ARN du poliovirus 1 dans les rétentats obtenus après les 2 étapes de concentration de 2 l d'eau contaminés avec 10⁻³ DICT₅₀ (Tableau 2) (Photo 1a). La PCR n'a pas donné un aussi bon résultat dans le cas du rotavirus, et après les deux étapes de concentration, sa sensibilité s'est révélée identique à celle de la culture (1 DICT₅₀/l) (Tableau 3).

Dans le cas du VHA, des essais de concentration n'ont pas été réalisés, et l'ARN était extrait à partir de dilutions du virus. La RT-PCR était conduite selon la procédure précisée précédemment. L'extraction par capture antigénique améliore la sensibilité, et la limite de détection virale a été fixée à 10⁻² DICT₅₀.ml⁻¹. Il semblerait que cette technique d'extraction améliore la sensibilité, notamment en éliminant les inhibiteurs de RT-PCR. (Photo 1b)

		Titre du poliovirus 1 dans l'échantillon d'eau avant concentration (DICT50/l)								
		10 ⁶	10 ³	10 ²	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	0
Essai 1	<i>culture</i>	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	<i>PCR</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Essai 2	<i>culture</i>	NE	NE	+	+/-	-	-	-	-	-
	<i>PCR</i>	NE	NE	+	+	+	+	+	+	-
Essai 3	<i>culture</i>	NE	NE	+	+	+	-	-	-	-
	<i>PCR</i>	NE	NE	NE	+	+	+	+	+	-

Tableau 2 - Observation (+) d'un effet cytopathogène sur cellules MRC 5 ou détection (+) de l'ARN amplifié du poliovirus.

NE signifie "non effectué"

		Titre du rotavirus dans l'échantillon d'eau avant concentration (DICT50/l)								
		10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	10 ⁻¹	10 ⁻²	0
Essai 1	<i>culture</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	<i>PCR</i>	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Essai 2	<i>culture</i>	NE	NE	NE	NE	+	+	-	-	-
	<i>PCR</i>	NE	NE	NE	NE	+	+	-	-	-

Tableau 3 - Observation (+) d'un effet cytopathogène sur cellules MA 104 ou détection (+) de l'ARN amplifié du rotavirus.

NE signifie "non effectué"

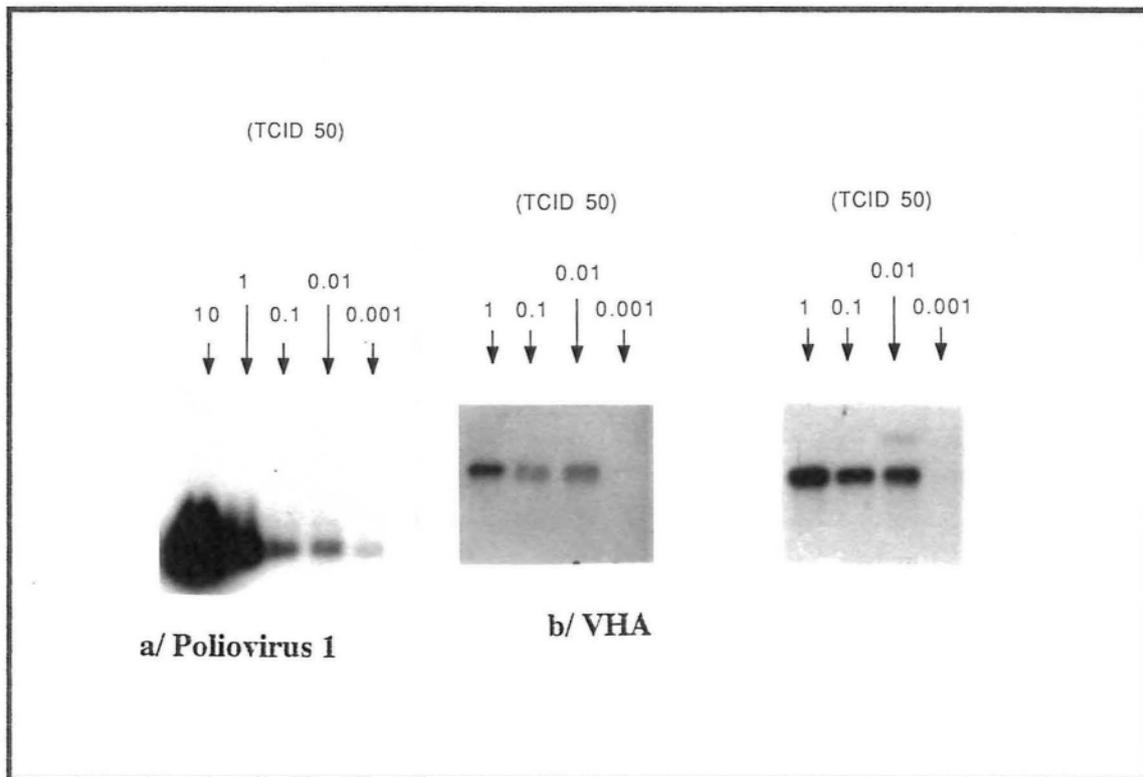


Photo 1 - a/ RT-PCR après concentration d'échantillons de 2 l d'eau contaminés avec des dilutions séquentielles de poliovirus 1 10 à 0,001 DICT50/l ; extraction méthode I
 b) RT-PCR à partir de dilutions séquentielles de VHA 1 à 0,001 DICT50/l ;
gauche :extraction méthode I/*droite* :extraction capture antigénique

2. 2. ECHANTILLONS D'EAU POLYCONTAMINES

Une deuxième série d'essais a été réalisée avec un mélange de 3 virus dans l'échantillon d'eau. Seule une détection par PCR était effectuée.

La totalité du concentrat primaire était reconcentrée, et au lieu d'avoir recours à l'ultracentrifugation, nous avons utilisé des concentrateurs unitaires à usage unique prétraités (Centriprep®).

Les 3 virus ont été détectés dans les 3 essais, pour toutes les dilutions testées, c'est-à-dire jusqu'à 1 DICT50/l pour chaque virus.

Les différentes techniques d'extraction des acides nucléiques étaient appliquées au concentrat secondaire. Pour le poliovirus 1, les meilleurs résultats étaient obtenus avec une extraction avec la protéinase K (photo 2a). Pour le VHA, c'est la capture antigénique qui était la plus performante (photo 2b). Et dans le cas du rotavirus, c'est l'extraction guanidinium isothiocyanate/phénol/chloroforme qui s'est révélée être la meilleure méthode (photo 2c).

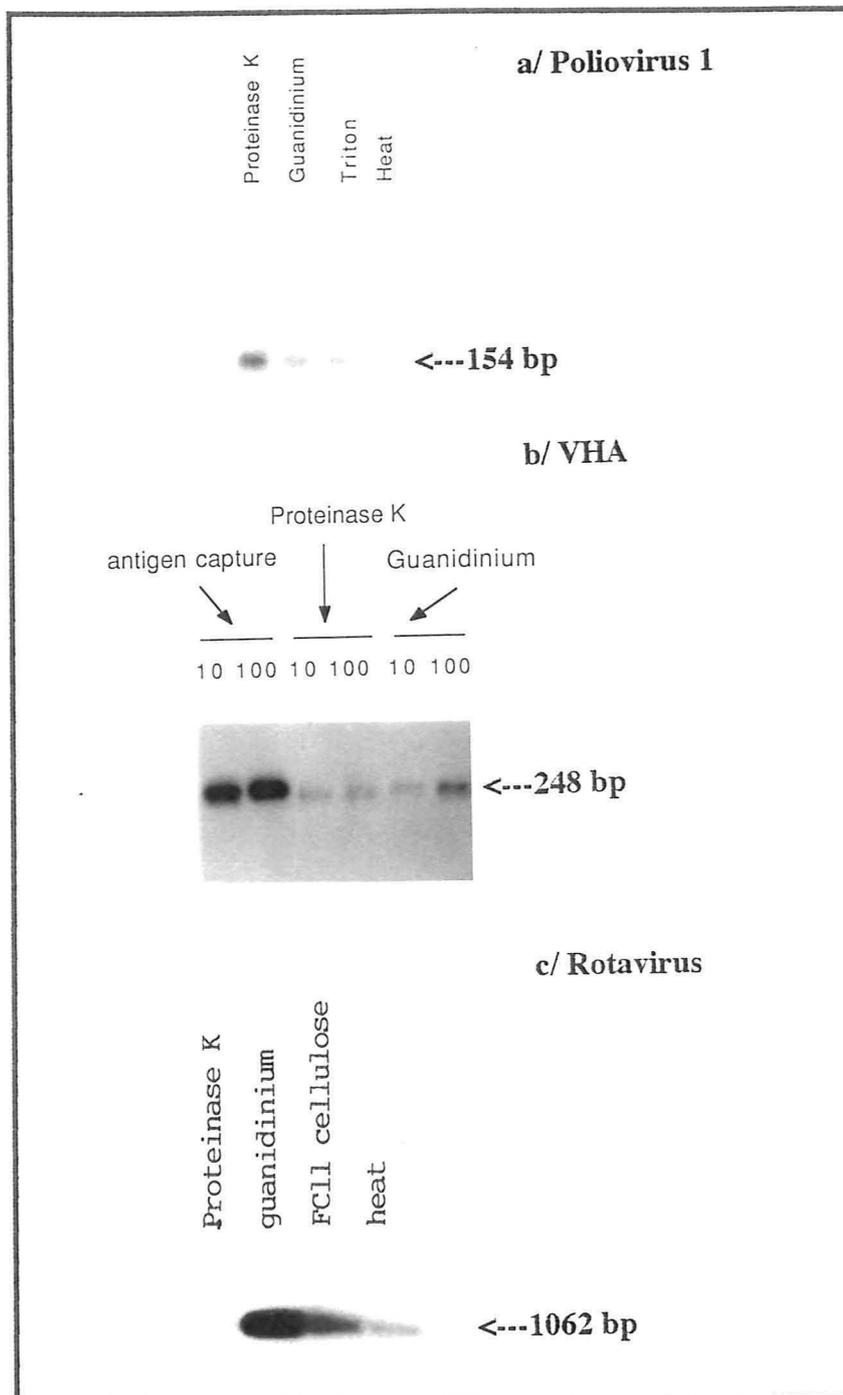


Photo 2 - Comparaison de différentes méthodes d'extraction des acides nucléiques viraux après concentration de 2 l d'eau contaminés avec
 a) 10 DICT50/l de poliovirus 1
 b) 10 ou 100 DICT50/l de VHA
 c) 1000 DICT50/l de rotavirus
 Guanidinium = méthode I Protéinase K = méthode II
 Triton = méthode III Heat = méthode IV
 FC11 cellulose = méthode V antigen capture = capture antigénique

3. CONCLUSIONS

L'ultrafiltration tangentielle avec l'appareil Minitan® a été choisie dans cette étude pour son aptitude à traiter des volumes importants, pour la faible perte de virus liée à des raisons d'ordre mécanique ou chimique puisque aucun traitement préalable de l'eau ni éluant ne sont nécessaires, pour la rapidité de concentration et l'excellent rapport de concentration obtenu. Bien qu'il s'agisse d'une technique onéreuse et contraignante en ce qui concerne les traitements de décontamination des membranes, nous utiliserons ce procédé dans la suite de nos travaux pour une première étape de concentration des échantillons hydriques.

Le système Centriprep®, adapté aux petits volumes, présentent les mêmes avantages. Cet appareil à usage unique nous a donné entière satisfaction pour concentrer simultanément poliovirus, rotavirus et VHA, présents dans l'échantillon d'eau en faible quantité. Nous aurons donc recours ultérieurement à ce concentrateur, d'utilisation beaucoup moins lourde que l'ultracentrifugation, comme deuxième procédé de concentration.

L'extraction des acides nucléiques selon la technique de référence utilisant le phénol et le chloroforme en présence d'un tampon de lyse à base de guanidinium s'est révélée efficace et suffisamment sensible pour les 3 virus étudié. C'est donc cette technique qui sera mise en application dans la deuxième partie de nos travaux.

Pour ses nombreux avantages qui seront discutés plus loin, notamment en terme de sensibilité et de rapidité des résultats, la détection des virus concentrés se fera presque exclusivement par amplification du génome viral selon les protocoles de PCR décrits précédemment.

CHAPITRE 2

ETUDE APPLIQUEE

Approche de la contamination virale des eaux d'alimentation en région dauphinoise et de son impact sanitaire

Deux enquêtes parallèles ont été menées :

1°- Une analyse de la qualité virologique et bactériologique des eaux de réseaux publics de plusieurs communes iséroises, à travers deux séries de prélèvements (printemps et hiver).

2°- Une enquête cas-témoins pour tester le facteur de risque "eau" dans la survenue des gastro-entérites aiguës infantiles à rotavirus. Elle a été réalisée dans la population desservie par les réseaux d'eau concernés par la deuxième série de prélèvements (hiver). La similitude entre les rotavirus isolés dans les selles des enfants malades et dans les prélèvements d'eau a aussi été analysée par séquençage nucléotidique.

1. ECHANTILLONS ET METHODES

1. 1. ANALYSE DES PRELEVEMENTS D'EAU

1. 1. 1. Echantillons d'eau

1. 1. 1. 1. Taille de l'échantillon

2 l d'eau froide de réseaux publics étaient recueillis dans des flacons en verre stériles contenant 2 ml de thiosulfate de sodium à la concentration de 1,6 g/l préalablement stérilisé, afin de neutraliser le chlore résiduel (normes AFNOR NF T 90-413 à 420) (7). Le type de traitement de potabilisation et l'importance des précipitations au cours des jours précédant le prélèvement étaient mentionnés sur une fiche jointe au prélèvement.

Un volume de 2 l a été choisi pour des raisons de facilité dans le transport et le stockage des prélèvements, et aussi parce que ce volume se rapproche de la quantité moyenne d'eau ingérée par une personne en une journée.

1. 1. 1. 2. Mode de sélection des prélèvements

Une première série de 11 prélèvements a été réalisée entre le 3 mai et le 9 juin 1993. Il s'agit d'eaux fréquemment hors normes bactériologiques, prélevées avant ou après traitement de potabilisation.

La deuxième série est constituée de 80 prélèvements effectués entre le 3 janvier et le 7 mars 1994, dans le cadre d'une enquête épidémiologique dont l'objectif était d'étudier le rôle de l'eau d'alimentation dans la survenue des gastro-entérites aiguës (GEA) infantiles à rotavirus. Un prélèvement d'eau était fait, le plus rapidement possible, (lendemain ou surlendemain de l'hospitalisation) sur le réseau public alimentant en eau le domicile de l'enfant malade.

Dans le cas d'une contamination chronique de l'eau d'alimentation et de l'apparition d'un phénomène épidémique localisé, nous aurions ainsi pu avoir des prélèvements d'eau antérieurs à l'hospitalisation et au signalement des nouveaux cas.

Parmi les 80 prélèvements, 56 ont été effectués sur le réseau d'eau d'alimentation des 75 cas signalés, et 24 sont des échantillons témoins recueillis hebdomadairement sur un réseau déterminé dans 3 villes du département de l'Isère : Grenoble, Voiron et Saint-Marcellin.

Ce mode de sélection des prélèvements d'eau a abouti à la constitution d'un échantillon non représentatif de la région, mais très divers sur le plan de l'origine géographique, du mode de traitement et de la configuration du réseau dans le département de l'Isère.

Les eaux étaient conservées à +4°C avant leur traitement et analyse.

1. 1. 1. 3. Échantillons témoins

Différents témoins ont également été inclus dans l'étude. Neuf échantillons d'eau déminéralisée stérilisée 20 min à 121°C constituent les témoins négatifs. Plusieurs témoins positifs ont aussi été étudiés. Il s'agit d'échantillons d'eau déminéralisée stérilisée, puis contaminée avec soit le poliovirus vaccinal type 1 (souche SABIN), soit le rotavirus (souche bovine RFC 67), seul ou mélangé avec des germes tests bactériens.

1. 1. 2. Concentration des prélèvements

Une étape de concentration de l'échantillon est indispensable pour deux raisons : le nombre limité de particules virales dans l'eau d'alimentation et le volume réduit, inférieur au ml, nécessaire pour la technique de détection des virus.

Nous avons choisi de concentrer les prélèvements en deux étapes d'ultrafiltration, avec des ultrafiltres en polysulfone de poids moléculaire nominal limite (pmnl) égal à 10^5 daltons.

Dans une première étape, l'échantillon de 2 l était concentré avec l'appareil Minitan® selon les conditions opératoires décrites dans le chapitre précédent.

Le rétentat, de volume 15 ml, était concentré dans une deuxième étape d'ultrafiltration grâce au concentrateur Centriprep®.

En 1 h, l'échantillon à analyser était donc concentré 2000 à 4000 fois en un volume adapté aux techniques de biologie moléculaire pour la détection virale.

1. 1. 3. PCR

1. 1. 3. 1. Extraction des acides nucléiques viraux

Les résultats de l'étude préliminaire nous ont conduit à adopter une extraction selon la technique utilisant l'isothiocyanate de guanidinium comme agent de lyse, puis le phénol et le chloroforme. Cette technique semble convenir pour la plupart des virus et a été appliquée aux concentrats hydriques.

Toutefois en accord avec GUTTMAN-BASS (52, 53), et après quelques essais effectués au laboratoire (non présentés ici - résumé de poster en annexe 1), la détection ultérieure des génomes viraux peut être perturbée par la présence d'inhibiteurs encore mal connus, dont certainement les substances humiques. Une phase de purification des acides nucléiques viraux par la silice a donc été réalisée en fin d'extraction afin d'éliminer la plupart de ces inhibiteurs (11, 98).

1. 1. 3. 2. RT-PCR, détection et caractérisation

Une recherche des entérovirus et des rotavirus a été réalisée pour les échantillons des deux séries de prélèvements avec les amorces, les protocoles de reverse transcription et de polymérase chain reaction, et le procédé de visualisation des produits d'amplification décrits dans l'approche préliminaire.

** PCR rotavirus : screening préliminaire des échantillons*

Toutefois pour la recherche du génome de rotavirus dans les échantillons hydriques, une première étape de screening a été réalisée en utilisant un autre couple d'amorces, permettant l'amplification d'un fragment moins long, de 392 paires de bases. Il s'agit des amorces Beg 9 (1 - 28) et RTB (376 - 392) (35) (Schéma 4)

RTB : 5' - GATCCTGTTGGCCATCC - 3'

Puis, une PCR semi-gigogne a été réalisée à partir de ce fragment amplifié de 392 paires de bases, afin d'augmenter la sensibilité de notre technique de détection. Cette PCR effectuée avec les amorces RTA (52 - 72) et RTB permet l'amplification d'un fragment de 341 paires de bases, inclu dans le fragment déjà amplifié (35).

RTA : 5' - GTATGGTATTGAATATAACCAC - 3'

Une amplification de 1062 paires de bases était ensuite réalisée pour les prélèvements positifs.

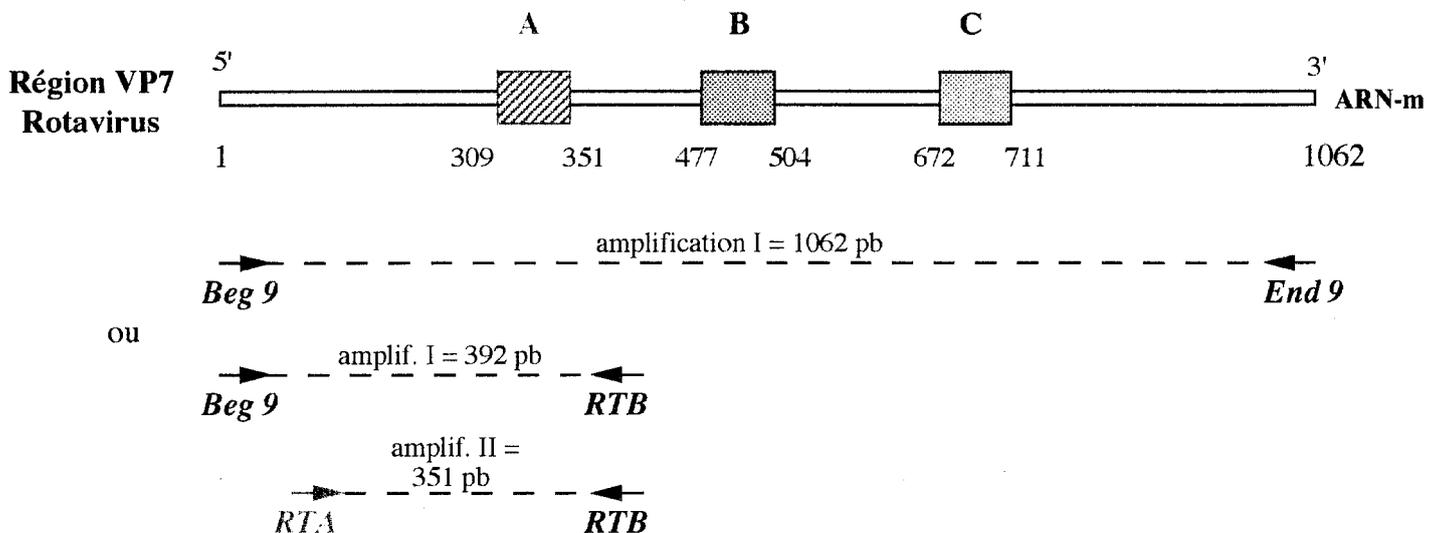


Schéma 4 - Partie du génome de rotavirus codant pour VP7

(1062 paires de bases)

Régions hypervariables A, B et C

Couples d'amorces utilisés

* pour l'amplification longue : Beg 9 et End 9

* pour l'amplification courte : Beg 9 et RTB

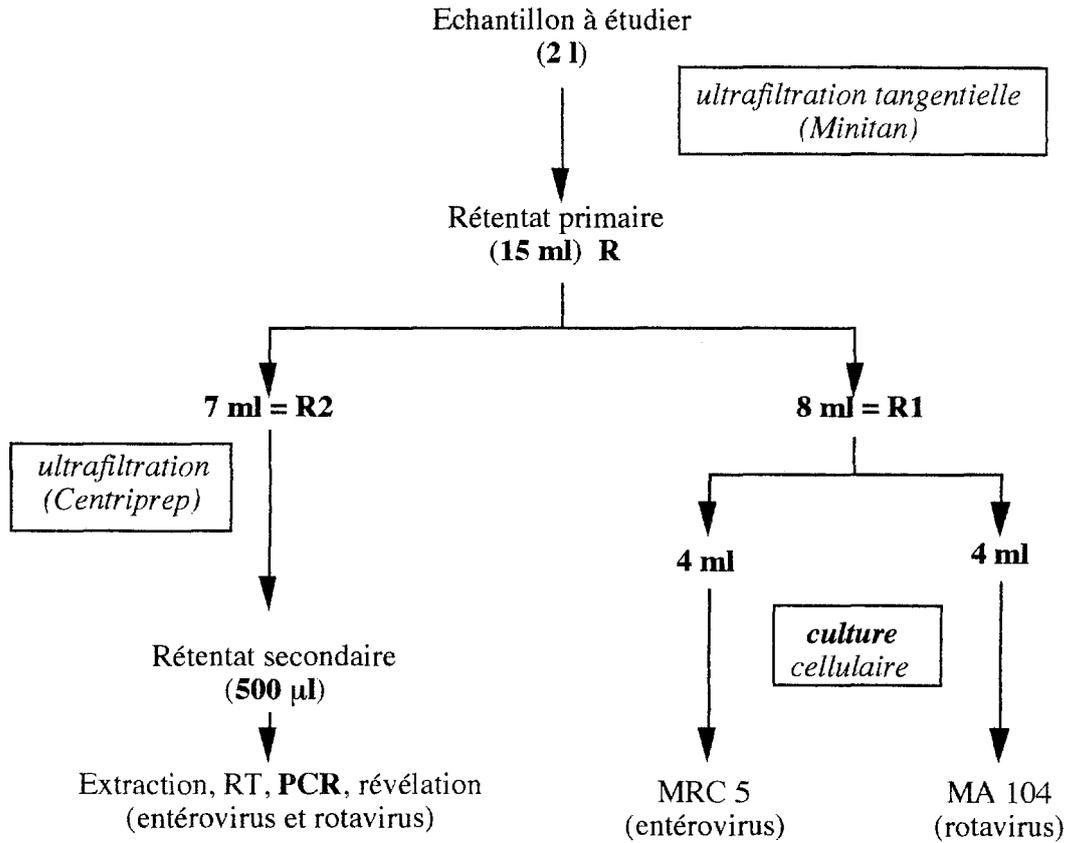
* pour la PCR semi-gigogne : RTA et RTB

* PCR entérovirus : détection en sonde froide

En ce qui concerne les entérovirus, une deuxième technique de révélation du produit d'amplification a également été testée. Ce procédé utilise une sonde froide (GEN-ETI-K® DEIA -SORIN).

Dans des travaux préliminaires, ce procédé s'est montré suffisamment sensible pour détecter une quantité aussi faible que 10^{-2} DICT₅₀ de poliovirus 1 (travaux non présentés ici).

**a/ Mode d'analyse de la première série de prélèvements (11 prélèvements) :
Printemps 93**



**b/ Mode d'analyse de la deuxième série de prélèvements (80 prélèvements) :
Hiver 94**

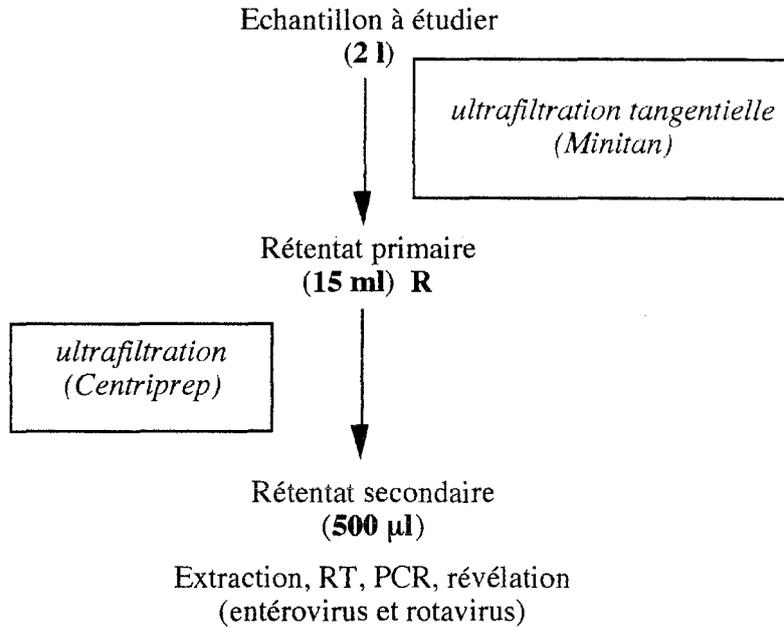


Schéma 5 - Succession des traitements des échantillons

1. 1. 4. Analyse bactériologique de l'eau

Chaque prélèvement d'eau a été effectué en double. Un échantillon était analysé au Laboratoire Régional d'Analyse des Eaux de Grenoble, afin de connaître sa qualité bactériologique.

1. 1. 4. 1. Technique

Pour la recherche des coliformes totaux et thermotolérants, des streptocoques fécaux et des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, le prélèvement (100 ml pour les recherches de coliformes et streptocoques, 20 ml pour la recherche des spores) est filtré sur une membrane de porosité 0,45µm.

Pour la recherche des coliformes totaux et thermotolérants, les filtres sont mis en culture sur une gélose lactosée au triphényl 2,3,5-tétrazolium et au tergitol-7, pendant 48 h, respectivement à 37°C et à 44°C (norme AFNOR NF T 90-414) (7).

Dans le cas des streptocoques du groupe D, dits fécaux, la membrane de filtration est déposée sur un milieu présomptif pour entérocoques, milieu de Slanetz et Bartley, à 37°C et le dénombrement est réalisé après 48 h (norme AFNOR NF T 90-416) (7).

Pour les spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices, c'est une gélose glucosée viande-foie qui est utilisée, et les filtres sont incubés en anaérobiose, à 37°C, pendant 48 h (norme AFNOR NF T 90-417) (7).

Le dénombrement des micro-organismes aérobies revivifiables à 37°C et à 22°C a aussi été effectué après incorporation en gélose d'1 ml d'échantillon hydrique, et incubation, respectivement 24 h à 37°C et 72 h à 22°C (normes AFNOR NF T 90-401 et NF T 90-402) (7).

1. 1. 4. 2. Coefficient de qualité microbiologique des eaux

Le coefficient de conformité bactériologique R des échantillons d'eau prélevé a été obtenu grâce aux données du service Santé-Environnement de la DDASS de l'Isère. Ces coefficients, calculés à partir des résultats des 10 dernières analyses bactériologiques pour chaque réseau, ont permis de classer les eaux d'alimentation selon 4 gradients de qualité :

$R \geq 90\%$ de conformité : bonne qualité (1)

$75\% \leq R < 90\%$ de conformité : moyenne qualité (2)

$50\% \leq R < 75\%$ de conformité : médiocre qualité (3)

$R < 50\%$ de conformité : mauvaise qualité (4)

1. 1. 5. Etude climatologique

La station Météo-France Grenoble-St-Martin-d'Hères nous a communiqué les données relatives à la climatologie de la région de Grenoble (altitude 212,0 m ; département Isère) durant les deux séries de prélèvements.

Des informations sur la température moyenne mensuelle (en °C), la moyenne mensuelle de l'humidité atmosphérique relative (en %), la hauteur mensuelle des précipitations (en mm) et le nombre mensuel de jours avec précipitations ont été recueillies pour les années 1993 et 1994.

Pour les trois premiers mois de l'année 1994, nous avons également obtenu un relevé de température quotidienne moyenne de l'air, sous abri (en °C) et de l'humidité relative quotidienne moyenne (en %).

NB Inoculation de cultures cellulaires

Dans la première série de prélèvements (printemps), seule la moitié du rétentat primaire (environ 7 ml) était concentrée une seconde fois avec le concentrateur Centriprep®. L'autre partie du rétentat primaire était divisée en deux parties égales d'environ 4 ml, qui étaient inoculées l'une sur cellules MRC 5, l'autre sur cellules MA 104. Un traitement de décontamination bactériologique de l'échantillon précédait toujours l'inoculation sur culture cellulaire (référence technique n°5). Les cultures étaient surveillées quotidiennement et une subculture était toujours réalisée.

1. 2. ETUDE DE L'IMPACT SANITAIRE

Une enquête de type cas-témoins prospective a été réalisée en milieu hospitalier durant 9 semaines, en parallèle de la deuxième série de prélèvements (hiver 1994). Une comparaison entre les souches de rotavirus isolées dans les selles des cas et dans l'eau d'alimentation a été effectuée par la technique du séquençage nucléotidique.

1. 2. 1. Enquête cas-témoins

1. 2. 1. 1. Population

Les unités d'étude ont été recrutées du 3 janvier 1994 au 7 mars 1994 au sein de la population constituée par les enfants hospitalisés dans les services de pédiatrie des centres hospitaliers de Voiron, Romans et Grenoble. Bien que situé dans le département de la Drôme, nous souhaitons que l'hôpital de Romans participe à l'étude car il était susceptible d'accueillir des enfants malades habitant dans le Sud-Ouest de l'Isère. Le rayonnement de ces trois centres hospitaliers n'a pas été évalué. Nous avons émis l'hypothèse que les enfants habitant près de

Grenoble, Voiron ou Romans seraient admis dans l'un de ces 3 centres hospitaliers en cas de maladie.

Était considéré comme un "cas" un enfant habitant ou séjournant en Isère, âgé de 2 ans maximum, hospitalisé au moins 24 heures pour une gastro-entérite aiguë et dont la recherche de rotavirus dans les selles était positive. Un témoin était un enfant habitant ou séjournant en Isère, âgé de 2 ans maximum, hospitalisé au moins 24 heures pour n'importe quelle pathologie non chirurgicale ni traumatique autre qu'une GEA, ou pour une GEA dont la recherche de rotavirus dans les selles était négative. N'étaient pas inclus les nouveau-nés hospitalisés depuis leur naissance et les enfants atteints de maladies cancéreuses.

1. 2. 1. 2. Dépistage des cas

Les médecins et internes des services de pédiatrie de Grenoble, Voiron et Romans devaient demander une recherche de rotavirus dans les selles de tout enfant âgé de 2 ans maximum, hospitalisé au moins 24 heures pour une GEA. Les prélèvements de selles étaient expédiés au laboratoire polyvalent d'analyses médicales de l'hôpital à Voiron et Romans, et au laboratoire de virologie au CHU de Grenoble. Pour chaque prélèvement était précisée l'adresse de l'enfant. La technique de dépistage utilisée dans les 3 laboratoires est identique. Cette technique est appelée test au latex (Slidex Rota-Kit2-bioMérieux®). Un échantillon de selles est dilué dans 2 ml de tampon, puis centrifugé. Une goutte du surnageant est mise en contact avec des billes de latex recouvertes d'anticorps monoclonaux anti-rotavirus. Les billes s'agglutinent si l'extrait de selle contient des rotavirus et la réaction est visible à l'œil nu. Le test des 3 laboratoires a une sensibilité de 91%, une spécificité de 99% (données du fabricant) et une excellente valeur prédictive positive.

Le surnageant de centrifugation résiduel des selles positives était isolé et conservé à -80°C en vue d'analyses ultérieures des rotavirus par PCR et séquençage.

Les laboratoires établissaient une liste des enfants "rotavirus positif", et transmettaient au jour le jour leur adresse afin de surveiller l'apparition de regroupements spatio-temporels de cas.

1. 2. 1. 3. Recueil de l'information : le questionnaire

Un questionnaire était rempli pour chaque cas et pour chaque témoin par le médecin, en présence d'un parent de l'enfant. Ce questionnaire comprenait des questions courtes relatives à l'identité de l'enfant (nom, prénom, âge, sexe, adresse), à l'hospitalisation (motif, date), aux habitudes de consommation d'eau et à la profession des parents.

Le questionnaire était rempli à l'admission de l'enfant par les externes ou internes en médecine.

1. 2. 1. 4. Qualité bactériologique des eaux d'alimentation

Un coefficient de conformité bactériologique R était affecté à l'eau du robinet du domicile des cas et des témoins, grâce aux adresses mentionnées dans le questionnaire et aux données du service Santé-Environnement de la DDASS de l'Isère. Les eaux d'alimentation ont été classées selon 4 gradients de qualité comme nous l'avons vu précédemment.

Dans l'analyse, nous avons souvent regroupé les eaux d'alimentation en 2 groupes : celles de bonne qualité, et celles de moyenne, médiocre et mauvaise qualités qui, par opposition, seront désignées par la suite "eaux de pas bonne qualité".

1. 2. 1. 5. Méthode d'analyse

Les relations entre variables qualitatives ont été analysées par le test exact de Fisher. Les principaux résultats sont présentés avec un intervalle de confiance à 95%.

1. 2. 2. Etude de la similitude rotavirus selles/rotavirus eaux

1. 2. 2. 1. Extraction de l'ARN viral des selles "rotavirus positif"

L'extraction a été réalisée de la même façon que pour les concentrats hydriques. N'ont été traitées que les selles des enfants pour lesquels le prélèvement d'eau qui avait été demandé avait donné un résultat positif à la PCR rotavirus.

1. 2. 2. 2. Amplification

Une amplification de 1062 paires de bases a été réalisée à partir du produit d'extraction des selles "rotavirus positif", selon le protocole détaillé dans la partie préliminaire de mise au point.

1. 2. 2. 3. Analyse des produits amplifiés par séquençage

Un séquençage après clonage a été réalisé sur les produits d'amplification de l'eau et des selles (séquençage selon la méthode de Sanger (102) ; Kit Sequenase 2.0, USB, Amersham). Le séquençage porte sur la région A située dans le génome du rotavirus codant pour la protéine VP7, et localisée entre les bases 307 et 351 (45 bases). Il s'agit d'une des 3 régions hypervariables situées dans le fragment codant pour VP7 (Schéma 4).

L'analyse du séquençage est effectuée par migration en gel de polyacrylamide 5%. Puis le gel est exposé à un film autoradiographique pendant 24 h à température ambiante. La lecture se fait directement sur le film.

Grâce au code génétique (Annexe 2), l'enchaînement des bases nucléotidiques est traduit en une séquence d'acides aminés, qui est comparée avec des séquences référencées dans une banque de données (NCBI).

2. RESULTATS

2. 1. QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU

2. 1. 1. Série de prélèvements Printemps 1993

Dans cette étude ciblée sur les entérovirus, nous avons testé en parallèle 2 systèmes de révélation des virus : l'inoculation sur cultures cellulaires et l'amplification des génomes par PCR.

2. 1. 1. 1. Résultats de la culture sur cellules

En ce qui concerne la culture, un effet toxique s'est toujours manifesté, plus rapidement sur les cellules MRC5 que sur les cellules MA104.

Une subculture a donc été réalisée systématiquement sur les mêmes systèmes cellulaires. **Aucun effet cytopathogène n'a été observé** après 15 jours de surveillance et de maintenance des cellules.

2. 1. 1. 2. Résultats de la RT-PCR

Une RT-PCR entérovirus et une RT-PCR rotavirus étaient effectuées. Les produits de la PCR étaient révélés et confirmés par southern blot et hybridation avec la sonde spécifique marquée au ³²p.

Un échantillon, sur les 11 analysés, a donné un résultat positif à la RT-PCR entérovirus, directement à la lecture du gel sous les ultra-violets.

Ce résultat positif a également été obtenu après une extraction à la protéinase K (photo 3).

L' entérovirus détecté n'a pas été typé.

Par contre, les échantillons ont tous donné un résultat **négatif en RT-PCR rotavirus**.

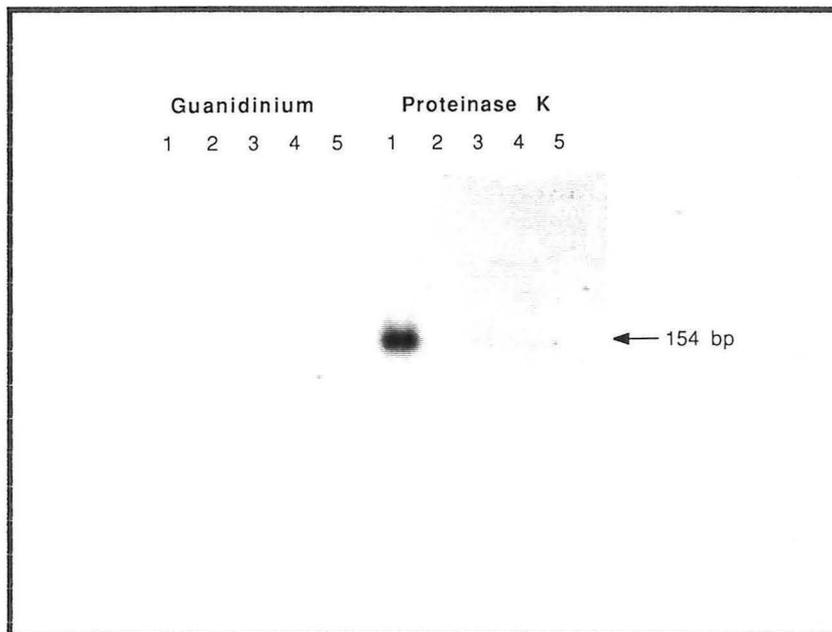


Photo 3 - Prélèvements Printemps 1993 (gel d'agarose)

Résultats (partiels) de la RT-PCR entérovirus ; 154 paires de bases amplifiées
 2 techniques d'extraction de l'ARN viral testées (I et II)
 1 = prélèvement n°3 - 2 = prélèvement n°4 - 3 = prélèvement n°5
 4 = prélèvement n°6 - 5 = témoin négatif

2. 1. 1. 3. Caractéristiques de l'échantillon entérovirus positif

Le prélèvement donnant un signal à l'analyse par RT-PCR était **conforme aux normes bactériologiques**. Il a été effectué **après un épisode de pluies abondantes**. La température de l'eau prélevée était voisine de +10°C. Il s'agit d'eau prélevée à sa source (Vinay), **avant traitement** aux rayons ultra-violetts. (Annexe 3)

2. 1. 1. 4. Résultats bactériologiques

Sur les 11 échantillons, il est à noter que **4 n'étaient pas conformes aux normes des eaux destinées à la consommation humaine** (Décret du 03/01/89 modifié), et contenaient des coliformes totaux (7 à 12 pour 100 ml), des coliformes thermotolérants (7 pour 100 ml) ou des streptocoques fécaux (1 à 5 pour 100 ml). **Ni entérovirus, ni rotavirus n'ont été détectés dans ces 4 prélèvements**. 3 échantillons sur les 4 étaient prélevés avant traitement et le quatrième était une eau distribuée non traitée.

Sur les 6 échantillons exempts de bactéries et de virus, 2 sont des eaux traitées (chlore ou rayons ultra-violetts) et 4 sont des eaux distribuées non traitées ou prélevées avant traitement.

2. 1. 1. 5. Tableau récapitulatif des 5 prélèvements contaminés par des bactéries ou des virus

* Annexe 3

nég. : négatif / pos. : positif

pluies : - : néant / + : faibles / +++ : abondantes

___ : paramètres non conformes

N° Echantillon	3	4	6	7	10
Date Prélèvement	10/5	11/5	17/5	18/5	8/6
Date Concentration	11/5	12/5	18/5	19/5	9/6
Lieu Prélèvement*	Vinay	St Hilaire du Touvet	Méandre	Sassenage	Monestier du Percy
Entérovirus (2 l)					
---> Culture	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
---> PCR	pos.	nég.	nég.	nég.	nég.
Rotavirus (2 l)					
---> Culture	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
---> PCR	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.
Coliformes totaux (100 ml)	0	0	<u>12</u>	<u>7</u>	0
Coliformes thermotolérants (100 ml)	0	0	0	<u>7</u>	0
Streptocoques fécaux (100 ml)	0	<u>2</u>	0	<u>5</u>	<u>1</u>
Spoires de bactéries sulfito- réductrices (20 ml)	0	0	0	0	0
Bactéries aérobies revivifiables à 22°C (1 ml)	15	<u>450</u>	<u>120</u>	22	25
Bactéries aérobies revivifiables à 37°C (1 ml)	8	0	<u>34</u>	0	<u>400</u>
Traitement de potabilisation	néant	néant	néant	néant	néant
Pluies dans les 10 jours précédants le prélèvement	+++	+	+	+	+

2. 1. 1. 6. Données climatologiques

Les prélèvements ont été réalisés entre le 3 mai et le 9 juin 1993.

	Mai	Juin
température moyenne mensuelle	+17,1°C	+19,9°C
humidité atmosphérique relative moyenne mensuelle	72%	75%
nombre mensuel de jours avec précipitations	16	14
hauteur mensuelle des précipitations	70 mm	123 mm

2. 1. 2. Série de prélèvements hiver 1994

Dans cette étude, le concentrat était analysé par RT-PCR uniquement.

Pour la détection des rotavirus, une PCR semi-gigogne était réalisée afin d'amplifier 341 paires de bases et d'augmenter la sensibilité.

Une recherche d'entérovirus était également réalisée sur les 80 prélèvements. Une PCR amplifiant 154 paires de bases était effectuée.

2. 1. 2. 1. Résultats de la recherche des rotavirus

Quatre prélèvements ont donné un résultat positif (Photo 4). Ces 4 prélèvements font partie des 56 dont le lieu de recueil était motivé par l'apparition d'un cas de gastro-entérite aiguë infantile à rotavirus nécessitant l'hospitalisation de l'enfant.

Aucun prélèvement parmi les 24 réalisés de façon systématique n'a donné un résultat positif.

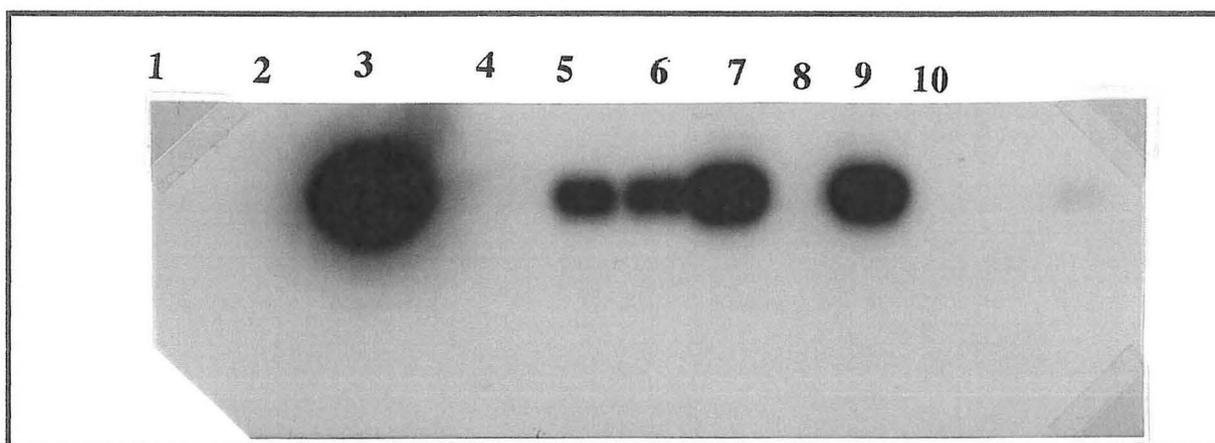


Photo 4 - Prélèvements Hiver 1994

Résultats (partiels) de la RT-PCR rotavirus ; 341 paires de bases amplifiées

Film autoradiographique après hybridation avec RTB marquée au ^{32}P

1 = no DNA - 2 = témoin négatif - 3 = témoin positif - 4 = témoin négatif

5 = prélèvement n°15 - 6 = prélèvement n°62 - 7 = prélèvement n°77

8 = prélèvement n°80 - 9 = prélèvement n°90 - 10 = témoin négatif

2. 1. 2. 2. Résultats de la recherche des entérovirus

Aucun échantillon n'a donné de résultat positif à la recherche des entérovirus.

2. 1. 2. 3. Résultats bactériologiques

Cinq prélèvements n'étaient pas conformes aux exigences de conformité bactériologique et renfermaient des coliformes totaux (1 à 6 pour 100 ml) ou des coliformes thermotolérants (1 pour 100 ml), des streptocoques fécaux (1 à 6 pour 100 ml) ou des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (1 dans 20 ml).

Ces prélèvements ont tous donné un résultat négatif à l'analyse virologique.

Quatre d'entre eux avaient été demandés spécifiquement pour des cas et un était un prélèvement hebdomadaire.

Il s'agissait d'eaux traitées au chlore ou non traitées, prélevées après des épisodes de pluies faibles ou abondantes et de température comprise entre +8 et +10°C.

2. 1. 2. 4. Tableau récapitulatif des 9 prélèvements contaminés par des bactéries ou des virus

* Annexe 3

** Les n° d'analyse en PCR des échantillons (15, 18, 30, ...) ne correspondent pas à l'enchaînement chronologique des dates de prélèvement (n°18 prélevé avant n°15).

nég. : négatif / pos. : positif

coefficient de conformité bactériologique (1994) : 1 - bonne qualité
2 - moyenne qualité
3 - médiocre qualité
4 - mauvaise qualité

pluies : - : néant / + : faibles / +++ : abondantes

___ : paramètres non conformes

N° Echantillon**	15	18	30	41	57	60	62	77	90
Date Prélèvement	3/3	21/2	3/3	31/1	7/2	26/1	25/1	17/1	10/2
Date Concentration	4/3	22/2	7/3	1/2	7/2	27/1	26/1	18/1	11/2
Lieu Prélèvement*	Nantoin	Moirans	St Blandine	Chevrières	Le Cheylas	Voiron	St Marcellin	La Côte St André	Rives
PCR Entérovirus (2 l)	nég.	nég.	nég.						
PCR Rotavirus (2 l)	pos.	nég.	nég.	nég.	nég.	nég.	pos.	pos.	pos.
Coliformes totaux (100 ml)	0	0	<u>6</u>	<u>1</u>	<u>1</u>	0	0	0	0
Coliformes thermo-tolérants (100 ml)	0	0	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	0	0	0
Streptocoques fécaux (100 ml)	0	<u>1</u>	<u>6</u>	0	0	<u>2</u>	0	0	0
Spores de bactéries sulfito-réductrices (20 ml)	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0
Bactéries aérobies revivifiables à 22°C (1 ml)	0	<u>45</u>	21	0	<u>1040</u>	<u>21</u>	0	0	0
Bactéries aérobies revivifiables à 37°C (1 ml)	0	0	2	0	4	<u>13</u>	0	0	0
Traitement de potabilisation	Cl	Cl	néant	néant	néant	Cl	Cl	néant	UV
Pluies dans les 10 jours précédant le prélèvement	-	+++	+	+	-	+	+++	+++	+++
Coefficient de conformité bactériologique	0,89 (2)	0,92 (1)	0,63 (3)	0,60 (3)	0,94 (1)	1,00 (1)	1,00 (1)	0,92 (1)	0,90 (1)
Température moyenne du décan précédent (°C)	9,1	2,6	9,1	3,1	5,3	1,8	1,5	4,0	6,0
Humidité atmosphérique relative moyenne du décan précédent (%)	77,3	80,9	77,3	82,7	77,4	85,6	86,1	92,6	80,0

2. 1. 2. 5. Données climatologiques

Les prélèvements ont été réalisés entre le 3 janvier et le 7 mars 1994.

	Janvier	Février	Mars
température moyenne mensuelle	+4,1°C	+6,3°C	+12,2°C
humidité atmosphérique relative moyenne mensuelle	86%	79%	70%
nombre mensuel de jours avec précipitations	15	8	8
hauteur mensuelle des précipitations	117 mm	19 mm	18 mm

Les moyennes des températures et des pourcentages d'humidité atmosphérique relative des 10 jours précédents chaque prélèvement contaminé ont été calculées et sont indiquées dans le tableau récapitulatif présenté en 2. 1. 2. 4.

2. 1. 3. Témoins

Les neuf témoins négatifs étaient concentrés avec les systèmes Minitan® et Centriprep® au début, tous les 15 jours et à la fin, dans chacune des deux séries de prélèvements de 1993 puis 1994. Ils n'ont jamais donné de signal aux PCR rotavirus (n°1 et 2) et entérovirus.

Deux échantillons d'eau du robinet contenant 10^3 DICT50 de rotavirus (n°3 et 4) ont donné un signal après la PCR rotavirus. Il en est de même pour les 2 échantillons d'eau déminéralisée (n°7 et 8) et les 2 échantillons d'eau du robinet contenant des germes tests (n°5 et 6) qui avaient été tous les 4 contaminés avec 10^3 DICT50 de rotavirus. Deux échantillons de 1 litre d'eau du robinet contaminés avec 10^3 DICT50 de rotavirus (n°9 et 10) et chlorés de façon à obtenir une concentration de chlore égale à 0,4 mg/l, puis conservés 10 jours à +4°C, ont donné un résultat négatif à la PCR rotavirus. (Photo 5)

Les 2 échantillons d'eau déminéralisée stérile contenant 1 DICT50 de poliovirus se sont révélés positifs après l'analyse par PCR.

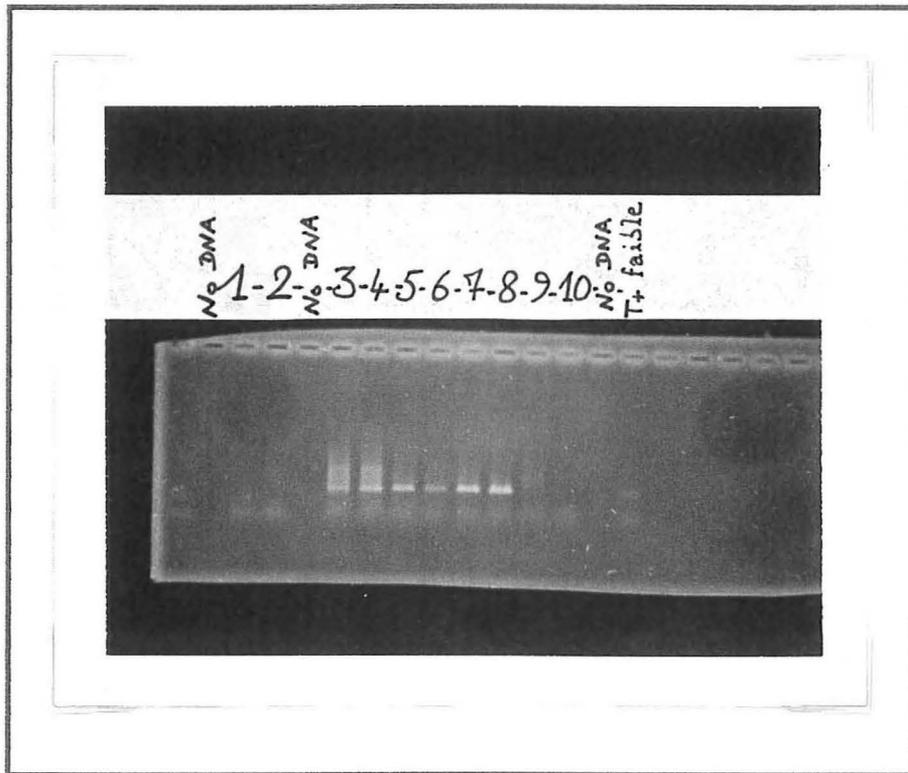


Photo 5- **Témoins positifs et négatifs (gel d'agarose)**
pour légende voir texte
no DNA : pas de dépôt
T+ faible : ARN rotavirus purifié amplifié

2. 2. ETUDE DE LA RELATION ENTRE LES GEA INFANTILES A ROTAVIRUS ET LA QUALITE DE L'EAU DESSERVIE

2. 2. 1. Résultats de l'enquête cas-témoins

2. 2. 1. 1. Recrutement des cas et des témoins

L'étude a duré 9 semaines, du 3 janvier au 7 mars 1994. **67 cas et 153 témoins** ont été inclus.

Parmi eux 38 cas et 70 témoins proviennent du centre hospitalier de Voiron. Parmi les 70 témoins, 39 présentaient une pathologie respiratoire ou de la sphère ORL, et 31, diverses pathologies non chirurgicales. Au CHU de Grenoble, 26 cas et 74 témoins ont été inclus. Parmi les 74 témoins, 29 souffraient de pathologies respiratoires ou de la sphère ORL. A Romans, 3 cas et 9 témoins ont été inclus. En effet, sur 28 enfants dépistés "rotavirus positif" par le laboratoire au cours de l'étude, 23 ne répondaient pas à la définition des cas (pas Isérois le plus

souvent), et n'ont donc pas été inclus. 5 témoins présentaient une pathologie respiratoire ou une autre maladie de la sphère ORL.

2. 2. 1. 2. Répartition spatio-temporelle des cas

Nous n'avons pas observé de phénomène épidémique localisé spatialement et temporellement dans la zone géographique étudiée durant l'hiver 1993-1994, à l'exception de **3 cas habitant dans la même commune, dans la même rue (à des numéros différents) et dépistés "rotavirus positif" durant la même semaine.**

Uniquement 18 cas ont été inclus durant le mois de janvier, alors que l'on en attendait au moins 3 fois plus, au regard des résultats des années précédentes. Le pic épidémique est centré sur la première semaine du mois de février durant laquelle 17 cas ont été inclus, comme le montre le schéma 6.

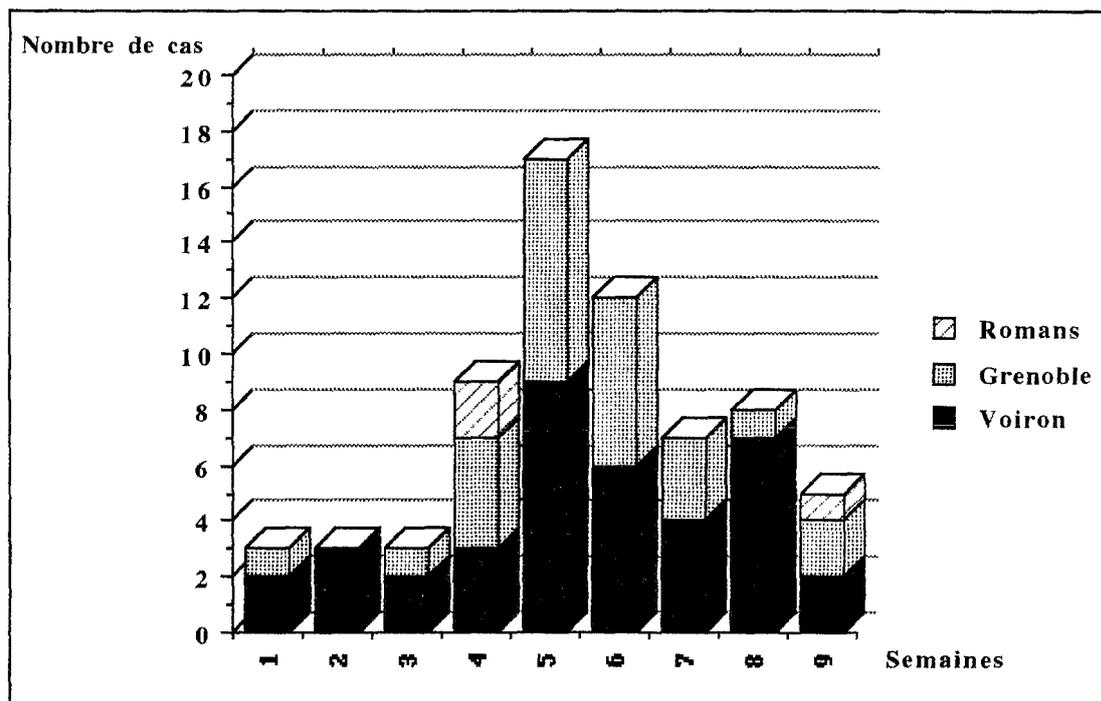


Schéma 6 - Répartition chronologique des cas semaine par semaine du 03/01/94 au 07/03/94

2. 2. 1. 3. Description des cas et des témoins

Le tableau 4 donne les principales caractéristiques socio-démographiques des cas et des témoins. La répartition par sexe des cas et des témoins est peu différente. En ce qui concerne l'âge moyen, il n'existe pas de différence significative entre les cas et les témoins ($\alpha > 0,4$). La

répartition par la profession du père varie peu chez les cas et les témoins. Cet indicateur laisse supposer que **les cas et les témoins ont été recrutés de façon identique.**

	Cas (n=67)		Témoins (n=153)	
	%	n	%	n
Sexe				
<i>garçons</i>	55	37	59	91
<i>filles</i>	45	30	41	62
Age				
<i>< 6 mois</i>	27	18	39	60
<i>6-24 mois</i>	73	49	61	93
Age moyen +/- écart-type (en mois)	9,9 +/- 5,9		9,2 +/- 6,9	
Profession du père				
<i>agriculteurs-exploitants</i>	0,0	0	0,7	1
<i>artisans,com. et chefs d'entr.*</i>	23,8	16	19,5	30
<i>cadreset prof. intellect. sup.**</i>	13,4	9	10,5	16
<i>professions intermédiaires</i>	20,9	14	19,6	30
<i>employés</i>	7,5	5	9,8	15
<i>ouvriers</i>	13,4	9	22,9	35
<i>retraités</i>	0,0	0	0,0	0
<i>autres sans act. prof.***</i>	7,5	5	12,4	19
<i>pas de père au foyer</i>	4,5	3	3,3	5
<i>pas de réponse</i>	9,0	6	1,3	2

Tableau 4 - Caractéristiques socio-démographiques des cas et des témoins

* *artisans, commerçants et chefs d'entreprises*

** *cadres et professions intellectuelles supérieures*

*** *autres sans activité professionnelle*

2. 2. 1. 4. Risque de GEA à rotavirus en fonction du type d'eau d'alimentation

Les résultats obtenus concernant l'eau d'alimentation sont présentés dans le tableau 5. Ils permettent de répondre à deux questions:

* Est-ce que la consommation d'eau du robinet par les enfants est un facteur de risque de GEA à rotavirus ?

La consommation d'eau du robinet n'est pas un facteur de risque. Les cas et les témoins qui boivent l'eau du robinet ont été répartis en deux groupes : ceux dont l'eau d'alimentation du domicile est habituellement de bonne qualité, et ceux pour qui elle n'est pas de bonne qualité en se référant aux standards bactériologiques. On ne note pas de différence significative entre les enfants hospitalisés pour une GEA à rotavirus et les enfants ne souffrant pas de GEA à rotavirus selon la qualité bactériologique de l'eau du robinet qu'ils consomment (OR = 1,54 IC95% : [0,32-7,01]). Ce résultat a été obtenu avec de très petits effectifs de cas (4) et de témoins (6) qui boivent de l'eau du robinet de " pas bonne qualité".

* Est-ce que le fait d'habiter dans une maison desservie par de l'eau qui n'est pas toujours conforme aux normes bactériologiques est un facteur de risque de GEA à rotavirus ?

Lorsque l'on considère la qualité bactériologique de l'eau d'alimentation du foyer où habite l'enfant, indifféremment du fait qu'il boive de l'eau du robinet ou en bouteille, la différence entre les cas et les témoins est significative ($p < 0,02$). **Les enfants qui habitent dans des zones desservies par de l'eau dont la qualité bactériologique n'est pas bonne (c'est-à-dire moins de 90% des analyses bactériologiques conformes) ont 3 fois plus de risque d'être hospitalisés pour une GEA à rotavirus que les témoins.**

	Cas %	Témoins %	OR	p<	Intervalle de confiance à 95%
consommation eau du robinet par l'enfant	44,3 (n=61*)	39,1 (n=151*)	1,2	>0,5	[0,7-2,4]
eau de "pas bonne qualité" alimentant le foyer de l'enfant	23,9 (n=67)	10,5 (n=152*)	2,7	<0,02	[1,2-6,1]

Tableau 5 - Risque de GEA infantile à rotavirus en fonction de l'eau du réseau public

* absence de l'information pour certains cas et pour certains témoins

2. 2. 2. Résultat de l'analyse par séquençage des souches de rotavirus isolées dans les selles et dans l'eau

Un séquençage était réalisé pour les produits de la PCR des 4 concentrats d'eau positifs et pour les produits d'amplification par PCR des extraits de selles des 4 enfants hospitalisés, rotavirus positifs, pour lesquels les prélèvements d'eau avaient été demandés.

Le séquençage a révélé la présence de **rotavirus de type bovin** dans les échantillons 62 et 90, de type **porcin** dans l'échantillon 77, et de **type humain groupe A, sérotype G4**, dans l'échantillon 15.

En ce qui concerne les selles, des rotavirus de groupe A de sérotype G1 ont été isolés dans les selles des enfants pour lesquels les échantillons 15, 62 et 90 avaient été demandés (Photo 6), et de sérotype G4 dans les selles de l'enfant pour lequel le prélèvement 77 avait été effectué.

L'échantillon n°90 a été prélevé sur le réseau alimentant les domiciles des 3 cas qui habitaient dans la même rue et qui ont été détectés "rotavirus positif" dans la même semaine. Les rotavirus isolés dans l'eau (sérotype bovin) ont été comparés à ceux retrouvés dans les selles de 2 enfants malades (sérotypes G1 et G4 humains), car pour le troisième le clonage préalable au séquençage n'a pas été possible.

Cette étude n'a donc pas permis d'établir une similitude entre les rotavirus des prélèvements hydriques et ceux isolés dans les selles des enfants. (Tableau 6)

	Souches isolées dans l'eau	Souches isolées dans les selles
15	LCLYYP <u>SEAP TQIS DNEW KDT</u> LS Souche humaine - Sérotype G4	LCLYYP <u>TEAS TQIN DGEW KDS</u> LS Souche humaine - Sérotype G1
62	LCLYYP <u>VAAS NKYA DTEW KDT</u> LS Souche bovine	LCLYYP <u>TEAI TQIN DGEW KDS</u> LS Souche humaine - Sérotype G1
77	LCLYYP <u>NEAA TEIA DDKW TDT</u> LS Souche porcine	LCLYYP <u>SEAP TQIS DNEW KDT</u> LS Souche humaine - Sérotype G4
90	LCLYYP <u>VEAS NEIA DTEW KDT</u> LS Souche bovine	LCLYYP <u>SEAP TQIS DNEW KDTY</u> LS Souche humaine - Sérotype G4
		LCLYYP <u>TEAS TQIN DGEW KDS</u> LS Souche humaine - Sérotype G1

Tableau 6- Séquences amino-acide déduites (région A/protéine VP7) des rotavirus isolés dans l'eau et dans les selles correspondantes, pour les 4 prélèvements positifs à la PCR rotavirus (15, 62, 77, 90)

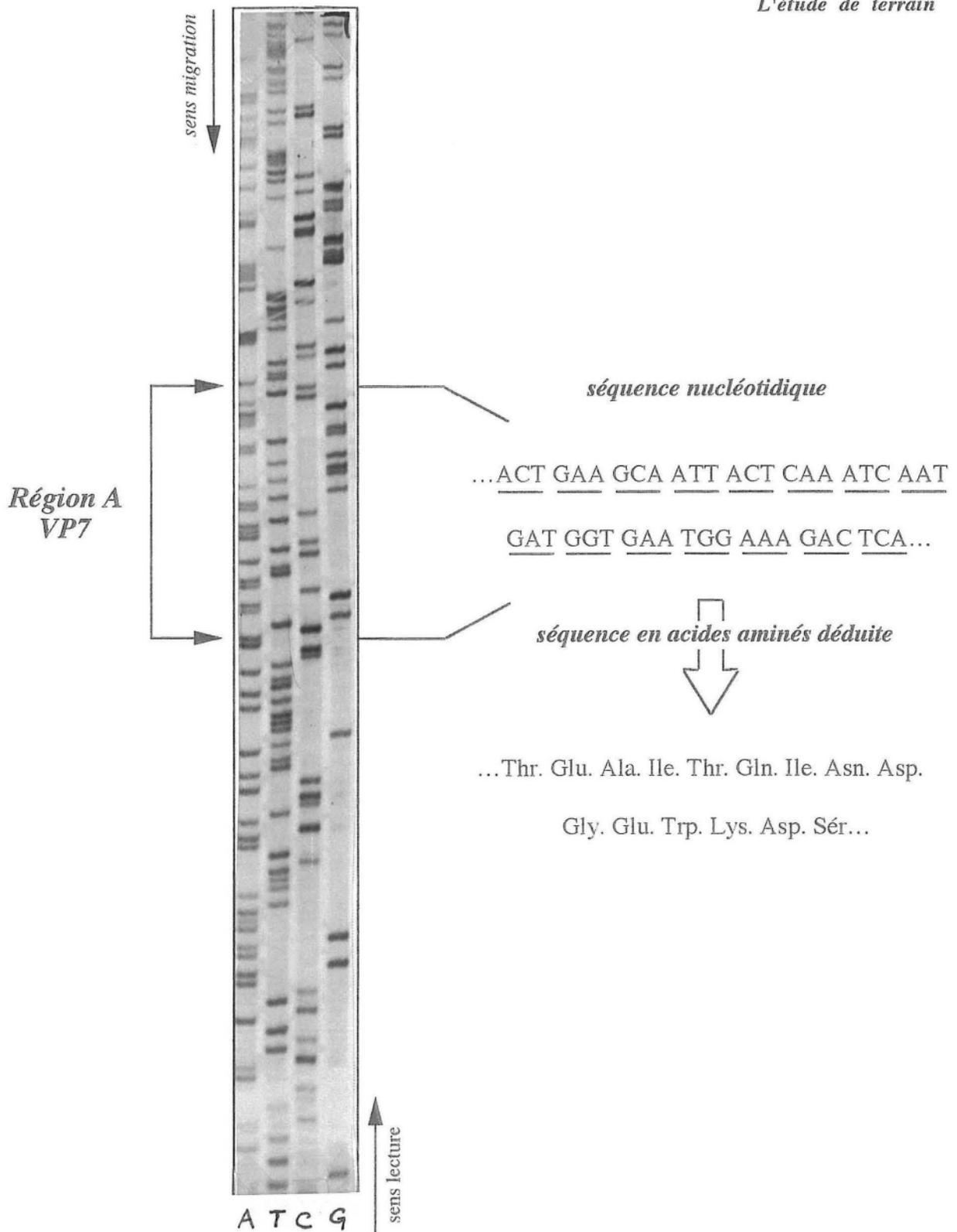


Photo 6 - Séquençage de rotavirus groupe A sérotype G1 dans les selles de l'enfant correspondant au prélèvement n°62

Gel d'autoradiographie - Lecture de la séquence nucléotidique - Séquence en acides aminés déduite.

CHAPITRE 3

DISCUSSION

A la lumière de la synthèse de la bibliographie et des résultats de notre étude expérimentale et appliquée, deux thèmes de discussion, réunis autour de questions d'intérêt majeur en virologie du milieu hydrique, se dégagent.

- Les technologies modernes utilisant les acquis de la biologie moléculaire apportent-elles des outils précieux pour la détection des virus dans l'environnement?

Quelle interprétation donner à un résultat positif de recherche de virus entériques dans l'eau d'alimentation par PCR?

- Quel est le risque sanitaire lié à la présence de virus dans l'eau d'alimentation? Existe-t-il une corrélation entre les contaminations virale et bactérienne de l'eau? Quel candidat proposer pour remplir le rôle de germe test viral?

1. CONSIDERATIONS TECHNOLOGIQUES

1. 1. DE LA DIFFICULTE A DETECTER LES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT

La détection des virus dans l'eau, et plus généralement dans l'environnement, est souvent fastidieuse et se heurte à plusieurs difficultés.

Contrairement aux prélèvements biologiques, les échantillons environnementaux sont généralement faiblement contaminés, d'où la nécessité d'analyser un volume de grande taille (69). Ce volume important, non adapté aux techniques utilisées pour le diagnostic virologique, devra donc dans un premier temps être concentré en un échantillon plus maniable. Cette opération préliminaire peut être à l'origine d'une perte de virus, ou peut être efficace pour certains virus uniquement. Une méthode valable pour l'ensemble des virus entériques est souhaitable.

Dans l'environnement, les techniques de diagnostic virologique sont limitées. Les plus anciennement utilisées sont la culture et la microscopie électronique. Toutefois ces deux méthodes présentent des limites. La microscopie électronique présente peu d'intérêt, en particulier pour les eaux d'alimentation, car le nombre de particules virales doit être important, ce qui est rarement le cas. Quant à la culture cellulaire, devant la grande variété de virus potentiellement présents dans un échantillon hydrique et en l'absence de toute orientation clinique en dehors d'un contexte épidémique, les inoculations doivent être pratiquées sur un panel de cellules variées. Tous les virus ne se cultivent pas sur une même lignée cellulaire "universelle", il serait souhaitable d'utiliser des cultures mixtes afin de cibler un large éventail d'espèces virales (101). Par ailleurs, de nombreux virus ne se cultivent pas sur les lignées cellulaires habituellement utilisées (virus de Norwalk, rotavirus, certains adénovirus), et échappent à l'analyse virologique. De plus, la culture cellulaire est une méthode nécessitant une minutie et un soin extrêmes, et de ce fait ne pourra être réalisée que par du personnel entraîné et motivé (101). Enfin, les résultats de la culture ne peuvent être obtenus qu'après un temps long, variant de quelques jours à quelques semaines. Ce délai est peu compatible avec l'urgence décisionnelle qui incombe aux instances sanitaires face à une pollution d'origine virale des ressources hydriques.

Pour combler ces faiblesses, les outils de la biologie moléculaire apportent de nouvelles perspectives analytiques. L'amplification des acides nucléiques par réaction de polymérisation en chaîne permet ainsi la détection de quantités de virus très faibles (3), quels que soient les virus en présence. Toutefois cette technique pose un problème d'interprétation des résultats aussi bien positifs que négatifs comme nous le discuterons plus loin.

1. 2. TAILLE DU PRELEVEMENT

Le volume de l'échantillon analysé varie beaucoup suivant les études, en particulier selon le type de milieu hydrique étudié.

Ce volume est souvent plus faible lorsque l'on s'intéresse à des eaux qui ont subi peu d'étapes d'épuration après qu'elles ont été contaminées. Il varie de 10 ml à 60 l pour les eaux usées brutes (94, 108, 113, 119), les effluents épurés à la sortie de la station d'épuration et avant rejet dans l'environnement (108, 113), les eaux de rivières (36, 69, 98), les eaux de piscines (36) ou les eaux marines (40, 119).

En ce qui concerne l'eau d'alimentation, les mesures réglementaires de protection sanitaire en vigueur dans les pays développés, sont telles que les contaminations virales devraient être très faibles ou inexistantes. Aussi, un grand volume sera souvent requis variant entre 9,8 et 1890 l (64, 65, 78, 111). Dans les pays en voie de développement, où la protection des ressources en eau est beaucoup plus aléatoire, les contaminations virales peuvent être plus importantes, autorisant un volume d'analyse plus petit.

A ce jour, il n'existe qu'une recommandation officielle, eu égard du volume d'examen, pour les entérovirus. Les entérovirus doivent être absents dans un volume "ramené de 10 l d'eau" (24).

A l'encontre de ces études, nous avons effectué nos analyses sur des prélèvements de 2 l. Nous avons en effet privilégié la quantité et la variété des échantillons plutôt que leur taille. Un facteur de commodité dans le transport et le stockage des prélèvements a également motivé une taille réduite de l'échantillon. De plus, si un homme utilise chaque jour un volume d'eau potable voisin de 150 l, il n'en consomme directement par voie orale que moins d'un litre. Par conséquent, un échantillon de 2 l peut refléter une exposition quotidienne en un lieu donné pour un être humain. Signalons aussi que les recommandations OMS de 1984, révisées en 1992, relatives aux eaux d'alimentation, sont basées sur une consommation de 2 litres d'eau par jour pour un individu de 70 kg pendant toute sa vie (90).

Ce volume est beaucoup trop grand pour les techniques d'isolement des virus couramment utilisées en pratique virologique. Une étape préalable de concentration est donc toujours nécessaire pour les eaux d'alimentation dont la concentration des virus est généralement très faible.

1. 3. ULTRAFILTRATION : DE LA SUSPENSION VIRALE AU RETENTAT

Les procédés de concentration des virus sont variés. Il est courant d'associer deux procédés de concentration, voire même jusqu'à quatre (64, 122), pour isoler les virus du milieu hydrique.

Un des procédés les plus utilisés en première étape de concentration est l'adsorption-élution sur des supports variés (69, 98, 108, 114, 122). C'est une méthode adaptée au traitement des grands volumes hydriques. Les supports d'adsorption peuvent être la poudre de verre, des filtres ou des cartouches, et plus récemment la laine de verre (122). Le traitement préalable des échantillons, en particulier avec la poudre de verre chargée négativement, et les éluants acides ou basiques utilisés pour récupérer les virus adsorbés sont de nature à altérer certains virus. Par contre l'adsorption sur filtre chargé positivement se prête bien à la concentration d'une large gamme de virus entériques : poliovirus, adénovirus, réovirus, rotavirus, parvovirus (114).

Une deuxième étape de concentration est souvent nécessaire après l'adsorption-élution. On a alors recours à la précipitation avec le chlorure de magnésium (64), la floculation seule (122) ou associée à une épuration sur résine de type Séphadex G-100 ou Chelex-100 (78), l'ultracentrifugation (98) ou la précipitation sur le polyéthylène glycol (113).

L'association de deux procédés de concentration est très performante puisque Vilaginès (122) récupère près de 70% des poliovirus introduits dans un échantillon d'eau en pratiquant une adsorption-élution sur laine de verre, puis une floculation. Un rendement encore supérieur, 80%, est obtenu pour le poliovirus 1 par adsorption sur nitrate de cellulose 0,45µm, élution

avec un tampon phosphate à l'urée et à l'arginine, et précipitation au chlorure de magnésium, puis en répétant une deuxième fois ces trois opérations (64). Ma (78) obtient quant à lui une récupération de 95% pour les coxsackievirus par adsorption-élution sur filtre, floculation, puis purification sur résines.

L'ultrafiltration, notamment l'ultrafiltration tangentielle, a également été bien utilisée, aussi bien en première qu'en deuxième étape de concentration (8, 29, 36, 39, 113, 118, 119). C'est un procédé applicable à tous les virus puisqu'il ne nécessite ni traitement préalable de l'échantillon, ni recours à un éluant plus ou moins agressif. Nous avons utilisé dans nos travaux appliqués deux étapes d'ultrafiltration : l'une avec un appareil réutilisable après désinfection des membranes, l'autre avec un concentrateur à usage unique.

Nous n'avons pas évalué le pourcentage de récupération pour les 3 virus testés, mais nous pouvons affirmer que l'association de ces deux procédés permet toujours de récupérer les virus, quels qu'ils soient, rotavirus, poliovirus ou virus de l'hépatite A, même lorsqu'ils sont à des concentrations aussi faibles que 1 DICT₅₀/l., et même lorsqu'ils sont simultanément présents dans un échantillon d'eau. Certains auteurs recommandent un traitement des membranes d'ultrafiltration à l'extrait de boeuf à 3% pour éviter l'adsorption virale et obtiennent une récupération de 82% pour le poliovirus et de 100% pour le VHA (29). En ce qui nous concerne, uniquement les membranes du système unitaire ont été prétraitées avec une solution d'extrait de boeuf à 3%.

Nous voudrions mettre l'accent sur l'importance d'un traitement efficace de désinfection des membranes d'ultrafiltration. Nous avons choisi une association d'acide fort et de base forte pour décontaminer les membranes et éliminer toute trace d'acide nucléique. Les résultats des témoins négatifs sont en faveur d'une absence totale de contamination des prélèvements et suggèrent la bonne qualité du traitement de décontamination réalisé.

Les deux étapes d'ultrafiltration permettent d'obtenir un rapport de concentration très élevé (2000 à 4000 fois), et donc un échantillon de petit volume compatible avec les méthodes d'analyse virologique.

1. 4. UNE TECHNIQUE MODERNE POUR LA DETECTION DES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT : LA PCR

L'évolution rapide des connaissances en biologie moléculaire et l'acquisition d'outils hautement performants ont ouvert de nouvelles perspectives d'investigation pour le biologiste. Ainsi l'amplification des génomes viraux par la technique de polymérisation en chaîne (PCR) ou les réactions d'hybridation moléculaire, très largement utilisées en biologie humaine, ont tout naturellement trouvé un domaine d'application de choix dans la microbiologie de l'environnement.

Dans la première partie de nos travaux, la sensibilité des protocoles de PCR avec les couples d'amorces sélectionnées a été établie pour 3 virus entériques : poliovirus, rotavirus et virus de

l'hépatite A. Le seuil de détection en PCR de ces 3 virus, 10^{-3} DICT50, 1 DICT50 et 10^{-2} DICT50, témoignent de la haute sensibilité de la technique appliquée. La moindre sensibilité dans le cas du rotavirus peut s'expliquer par le fait que le fragment amplifié est beaucoup plus long (1062 paires de bases contre 154 pour le poliovirus et 248 pour le VHA) et aussi parce qu'il s'agit d'un ARN double brin. Cette technique de mise en évidence des acides nucléiques viraux reste valable lorsque plusieurs ARN viraux coexistent dans le même échantillon, et permet de détecter alors au moins 1 DICT 50 de chacun des virus présents. Dans l'étude des mélanges de virus, des titres inférieurs à 1 DICT50 n'ont pas été testés car ces essais avaient pour but de montrer qu'il était possible de détecter simultanément 3 espèces virales contaminant un échantillon hydrique et à une concentration compatible avec une dose virale pouvant provoquer une pathologie. Dans ces essais, les conditions expérimentales voulaient être le plus ressemblantes possible avec une situation concrète de terrain. Les travaux étudiant la sensibilité de cette technique, rapportés dans la littérature, présentent des résultats souvent similaires aux nôtres (46, 50, 69, 78, 113).

Toutefois si la PCR est une technique applicable en théorie à tous les virus entériques, rapide puisqu'un résultat peut être obtenu en une journée, elle présente 2 problèmes : le premier, discuté plus loin, est l'interprétation d'un résultat négatif qui peut être la conséquence de la présence de substances ayant une action inhibitrice sur les enzymes de la RT-PCR, et le second concerne l'interprétation d'un résultat positif.

En effet, la PCR met en évidence des acides nucléiques et pas des particules virales infectieuses. De nombreux virus entériques sont des virus à ARN, et notre opinion, en accord avec Kopecka (69), est que l'ARN étant très fragile, s'il était présent à l'état libre dans l'échantillon hydrique, il serait vite dégradé (46, 118). Et d'autre part, les procédés utilisés pour la concentration et l'extraction des acides nucléiques sont tellement agressifs, aussi bien mécaniquement que chimiquement, qu'un ARN libre, non encapsidé, serait détruit (2). Par conséquent, les acides nucléiques détectés par PCR témoignent probablement de la présence de particules virales intactes dans l'échantillon étudié. De plus, si l'on avait des produits de dégradation des virus et non pas des virus intacts, il y aurait également des fragments de capsides. Or des travaux récents réalisés sur la souris, montre qu'une diarrhée à rotavirus peut être provoquée par la capside externe seule, et non par un virus infectieux (112).

La PCR est classiquement considérée comme une méthode d'analyse semi-quantitative. Toutefois, les avancées technologiques laissent prévoir la possibilité de quantifier les ARN détectés. Ceci devrait alors permettre de corréler un seuil d'ARN viral détecté par PCR à une infection virale.

Une inoculation sur cellules devrait être réalisée le plus souvent possible, en parallèle d'une PCR, pour confirmer un résultat positif (84), soit par l'observation d'un effet cytopathogène, soit pour réaliser ensuite une PCR à partir des cellules inoculées, dont la positivité serait alors la preuve que le virus, même s'il ne produit pas d'effet lytique sur les cellules, a bien pénétré à l'intérieur des cellules et était infectieux.

En ce qui concerne nos travaux appliqués, un entérovirus a été détecté par PCR dans un échantillon hydrique, mais n'a pas donné d'effet cytopathogène sur cellules MRC5, et après 15 jours d'observation, ces cellules, après extraction des acides nucléiques, n'ont pas donné de signal positif à la PCR entérovirus.

1. 5. LE PROBLEME DES INHIBITEURS

Une PCR spécifique réalisée avec un échantillon contaminé avec un virus donné, peut donner un résultat faussement négatif, alors que la culture donne un résultat positif. Cette erreur d'interprétation est la conséquence de l'action inhibitrice de certaines substances sur les enzymes utilisées pour la reverse transcription et la réaction de polymérisation en chaîne (103). Ces substances sont notamment les substances humiques, dont les acides humique et fulvique, naturellement présents dans les échantillons hydriques, à une concentration voisine de 300 µg/l dans l'eau de surface pour l'acide humique (53).

Nous avons toujours montré un effet inhibiteur de l'acide humique sur les RT-PCR poliovirus, rotavirus et VHA pour une concentration d'acide humique de 100 µg/l, quelle que soit la dose virale testée. En dessous de cette concentration, une purification des acides nucléiques après leur extraction présente un intérêt avant l'étape de RT-PCR, et augmente la fiabilité des résultats par rapport à une RT-PCR réalisée sans purification préalable (Annexe 1).

La purification avec le CF-11 cellulose a été testée pour le rotavirus, et la capture antigénique améliore nettement les résultats pour le VHA. Pour Ma (78), l'extraction phénol/chloroforme/alcool isoamylique est suffisante pour éliminer les inhibiteurs. Toutefois un passage sur résines types Séphadex G-100 ou Chelex-100 s'avère très efficace pour éliminer les inhibiteurs (78).

Dans la partie appliquée de notre étude, nous avons systématiquement pratiqué une purification sur silice des acides nucléiques selon la technique décrite par Boom (11). En effet, bien que travaillant avec des échantillons d'eau d'alimentation généralement peu chargés en matières organiques, dont les substances humiques, nous avons voulu faire une totale abstraction de ce risque de faux négatifs.

Les échantillons témoins n°1 et n°2, contaminés artificiellement simultanément avec des germes tests et des rotavirus ont donné un résultat positif à la PCR rotavirus, après purification de l'ARN sur la silice. Bien que nous ne disposions que de deux résultats, nous pouvons penser que la présence de bactéries ou de produits de dégradation d'origine bactérienne, n'interfère pas dans la PCR ou que la purification permet aussi de les éliminer (74).

1. 6. PERSPECTIVES TECHNOLOGIQUES

En l'absence de méthode normalisée pour l'analyse virologique des eaux destinées à la consommation humaine, à l'opposé de ce qui existe pour les bactéries (7), et devant la grande variété et les combinaisons multiples de techniques, nous ne pouvons qu'émettre certaines recommandations.

Une concentration de l'échantillon hydrique s'impose dans tous les cas. L'ultrafiltration nous paraît plus adaptée à la majorité des virus entériques que l'absorption-élution, et ne nécessite pas d'étapes préliminaires de traitement de l'échantillon. L'arrivée sur le marché d'unités de concentration type Centriprep® (Amicon) ou Macrosep® (Polylabo), adaptées aux volumes résultant de la première étape de concentration (moins de 20 ml), permet une certaine homogénéité dans la procédure de concentration de l'échantillon, avec un excellent rapport de concentration. Toutefois, le prix élevé de ces appareils freine actuellement leur possibilité d'extension à une analyse virologique des eaux en routine.

La purification des acides nucléiques s'avère d'intérêt majeur pour l'analyse des eaux environnementales. De nouvelles technologies conjugant une extraction et une purification par capture antigénique des acides nucléiques viraux sur des microbilles recouvertes par un mélange d'anticorps dirigés contre les virus fréquemment rencontrés dans le milieu hydrique sont de plus en plus décrites (50, 82, 86).

Enfin, l'amélioration ultime à apporter à l'amplification par RT-PCR est la réalisation concomitante des transcriptions inverses des ARN en ADNc de tous les virus potentiellement présents dans l'échantillon grâce à l'utilisation d'hexamères aléatoires (50, 119, 118). Ces chaînes courtes de 6 bases nucléotidiques se fixent au hasard sur les acides nucléiques viraux dénaturés quels qu'ils soient, et reconstituent un brin complémentaire d'ADN. Les produits de la RT sont ensuite amplifiés simultanément et non séparément par PCR, dans un programme unique, en présence d'un cocktail d'amorces spécifiques de tous les virus ciblés (32). La séparation électrophorétique en fonction de la longueur du fragment amplifié permet de distinguer les différents contaminants viraux par comparaison avec une échelle de poids moléculaire. Cette technologie appelée RT-multiplex PCR (119) est en cours d'évaluation au laboratoire de virologie et donne des résultats très encourageants.

Dans le futur, il serait souhaitable de privilégier l'utilisation de sondes froides pour la détection des produits de la PCR (36), donnant des résultats plus rapidement tout en étant aussi sensibles que les sondes radioactives qui restent une référence.

Ainsi, l'objectif technologique est atteint : les 3 virus étudiés ici, poliovirus, rotavirus et virus de l'hépatite A, représentatifs des virus entériques, peuvent être concentrés, leur ARN extrait, purifié, transcrit en ADN complémentaire et amplifié par PCR, puis détecté par southern blot, de façon simultanée, sans avoir à fractionner les échantillons à aucune étape de l'analyse.

Cette performance analytique ouvre des perspectives ambitieuses pour l'ensemble des virus entériques.

2. CONSIDERATIONS SANITAIRES

Plus d'une centaine de virus pathogènes sont éliminés dans les fèces humaines, et ces virus entériques se retrouvent tout naturellement dans les eaux usées brutes d'égoût. Des virus entériques ont été mis en évidence à différents stades du cycle de contamination virale du milieu hydrique, en particulier dans les eaux usées brutes (13, 94, 120), dans les eaux usées épurées (26, 56), dans les boues d'épandages (115), dans les eaux marines ou les fruits de mer (20, 74), dans les eaux superficielles (12, 98, 122), ou dans les eaux récréatives (87). Les travaux portant sur l'eau destinée à la consommation humaine sont peu nombreux (16, 64, 85, 116).

2. 1. FREQUENCE DE LA CONTAMINATION VIRALE DE L'EAU D'ALIMENTATION

L'importance en terme de fréquence de la contamination virale des eaux d'alimentation est très mal connue. Aucune étude de grande envergure, à notre connaissance, n'a été réalisée à ce jour pour estimer la contamination virale "endémique" des eaux potables destinées à la consommation humaine.

Dans notre étude, nous avons détecté des génomes viraux de rotavirus ou d'entérovirus dans 5,6% des échantillons d'eau analysés. Des résultats voisins sont rapportés dans la littérature : 3,7% en Croatie (5 échantillons positifs sur 135) (17), 2,1% dans un suivi de 20 ans en Roumanie (89), 11% aux USA (81), bien que des techniques beaucoup moins sensibles que les nôtres aient été utilisées. Dans des pays peu développés, tels que la Bolivie et le Mexique, la présence de virus dans l'eau de boisson a été évaluée à respectivement 40% et 77,8% des échantillons testés (60). A l'opposé, certaines études réalisées en Angleterre et aux USA tendent à montrer l'absence de virus dans l'eau potable (60). Mais il existe de grandes différences entre les approches analytiques utilisées et la qualité des eaux étudiées, d'où la difficulté pour comparer ces résultats.

Les deux espèces virales que nous recherchions ont été mis en évidence : 4 échantillons étaient contaminés par des rotavirus et 1, par des entérovirus. A ce jour 37 virus différents humains ont été isolés dans l'eau d'alimentation dans le monde (43), dont des entérovirus (22, 65, 81), des rotavirus (65), des réovirus (81) ou le VHA (110). Le virus de Norwalk, d'isolement très difficile, est également un contaminant fréquent des milieux hydriques (5). Sa détection dans l'eau d'alimentation présente un grand intérêt puisque c'est le premier agent des gastro-entérites aiguës virales des enfants et des adultes transmises par l'eau, la glace alimentaire ou l'alimentation (57).

2. 2. CARACTERE SAISONNIER DES CONTAMINATIONS VIRALES DU MILIEU HYDRIQUE

L'unique prélèvement détecté entérovirus positif a été réalisé en fin de printemps, alors que les échantillons détectés rotavirus positifs ont été prélevés au cours de l'hiver. Cette fluctuation saisonnière des virus détectés dans l'environnement a été mentionnée dans plusieurs travaux. Hedberg (57) insiste sur le caractère printanier ou automnal des gastro-entérites aiguës à virus de Norwalk. Les entérovirus et adénovirus sont plus souvent détectés dans des prélèvements effectués en été ou en automne (1, 56, 65, 94, 98) ; les réovirus et les rotavirus sont eux plus souvent isolés en hiver (6, 56, 65). Peigue-Lafeuille (94) met en évidence une différence significative entre la contamination par les entérovirus d'eaux usées épurées prélevées de mai à octobre (82 échantillons positifs sur 120) et la contamination d'échantillons recueillis de novembre à avril dans les mêmes conditions et mêmes lieux (35 échantillons positifs sur 120). Ce facteur saisonnier agit vraisemblablement sur la survie des virus dans l'environnement.

La résistance accrue du rotavirus aux basses températures a été souvent rapportée (6). Dans notre travail, la température moyenne des 10 jours précédants les 4 prélèvements contenant des rotavirus oscillait entre 9,1°C et 1,5°C. Dans 2 cas sur 4, cette température inférieure ou égale à +4°C pouvait en effet jouer en faveur d'une survie prolongée du virus dans l'environnement. Les données climatologiques reflètent malheureusement uniquement la situation de l'agglomération grenobloise et non celle du département de l'Isère. Aussi est-il probable que les températures de certains sites de prélèvement, situés à une altitude plus élevée que celle de Grenoble, étaient plus basses. Toutefois, il faut signaler que l'hiver 1994 s'est caractérisé par une douceur exceptionnelle avec uniquement 29 journées de température moyenne inférieure à +4°C et juste 4 jours de température moyenne inférieure à 0°C. Cette température n'a sans doute pas joué en faveur de la survie des rotavirus dans l'environnement, d'où un faible pourcentage d'isolement des rotavirus, aussi bien dans les échantillons d'eau que chez les enfants hospitalisés pour une gastro-entérite aiguë.

Nous nous sommes également intéressé au taux d'humidité atmosphérique relative. En effet, son rôle sur la survie des rotavirus dans l'environnement est mal défini (1). Certains auteurs ont suggéré un effet positif des basses humidités atmosphériques relatives, inférieures à 50% (6). Dans notre étude, les humidités atmosphériques relatives étaient généralement élevées, oscillant entre 77,3% et 92,6% pour les moyennes du décan précédant le jour des prélèvements rotavirus positifs.

Par contre, un facteur retrouvé pour 4 prélèvements sur les 5 contenant des virus, est l'abondance des pluies dans les 10 jours qui l'ont précédé. Ces précipitations importantes ont pu favoriser une filtration rapide et une contamination des eaux souterraines (57, 71), notamment en région karstique.

2. 3. IMPLICATION DE L'EAU D'ALIMENTATION DANS LES EPIDEMIES A VIRUS ENTERIQUES

Contrairement aux virus fragiles généralement transmis directement d'homme à homme ou accidentellement par des produits biologiques, les virus naturellement résistants, comme la plupart des virus entériques, peuvent adopter deux modes de transmission. Une transmission à cycle court fécal-oral ou une transmission à cycle long, par l'intermédiaire d'un vecteur souillé (eau, objet, aliment).

Dans les pays en voie de développement, les virus entériques sont fréquemment retrouvés dans le milieu hydrique du fait du niveau d'hygiène de l'eau rudimentaire. Dans les pays développés, ce n'est qu'en cas d'avarie et de contamination accidentelle du réseau de distribution que l'eau peut jouer un rôle dans la transmission des virus entériques (38, 71, 85, 116).

Le CDC définit les épidémies de pathologie d'origine hydrique comme étant les maladies survenant après la consommation ou l'usage d'eau potable. Aux USA, les données de surveillance des maladies causées par l'eau sous-estiment l'impact des virus sur la santé humaine (57). Face à des évidences épidémiologiques, il est toujours très difficile d'établir la responsabilité de l'eau dans l'apparition d'épidémies virales, soit pour des raisons analytiques, soit pour des raisons liées à la complexité même de l'investigation épidémiologique d'un milieu aussi labile que l'eau.

L'éventail varié et peu spécifique des manifestations cliniques des entérovirus (fièvre ou convulsion hyperthermique, syndrome méningé bénin) (101) s'observe plutôt au cours de l'été (94, 101), alors que la pathologie gastro-entéritique est très fréquente en hiver (6, 58). Cette réalité clinique est assez bien calquée sur les périodes de détection des entérovirus et des virus des gastro-entérites dans l'eau de boisson, et avec les résultats de notre étude.

La seule façon d'incriminer l'eau dans une épidémie virale serait de retrouver le même sérotype viral dans l'eau consommée par les malades et chez les malades. Etant donnée la durée d'incubation nécessaire avant l'apparition des signes cliniques, environ 2 jours pour une gastro-entérite aiguë à rotavirus, il est quasiment impossible d'obtenir l'eau consommée par le malade deux jours plus tôt. Toutefois, dans un contexte endémique, des prélèvements réguliers et fréquents peuvent refléter assez fidèlement la qualité de l'eau consommée par la population à un moment donné et à l'origine des troubles observés au sein de cette population. C'est ce que nous avons essayé de réaliser dans notre travail, en surveillant l'apparition des cas de gastro-entérite aiguë infantile à rotavirus et en essayant de repérer des regroupements géographiques et temporels de cas. Les prélèvements d'eau réalisés à posteriori du signalement d'un cas auraient alors pu traduire la qualité microbiologique de l'eau consommée par un enfant buvant la même eau d'alimentation, mais ayant contracté la maladie un peu plus tard. Nous avons observé un seul regroupement géographique et temporel de 3 cas. Un résultat positif a été obtenu pour un prélèvement d'eau réalisé la semaine durant

laquelle les 3 cas se sont déclarés. Il provenait de la rue où habitent les 3 enfants. Malheureusement, le rotavirus isolé dans l'eau était une souche bovine, alors que les 3 enfants étaient porteurs de souches humaines du groupe A.

Pour les 3 autres eaux positives, l'étude par séquençage n'a pas permis d'établir de similitude entre les rotavirus de l'eau et ceux des selles de l'enfant pour lesquels chacun de ces prélèvements avait été effectué. Il faut toutefois souligner le fait que nous n'avons séquencé que la région A au cours de ces travaux de comparaison entre souches de rotavirus. Or les régions B et C sont elles aussi riches d'informations et très discriminantes.

Peigue-Lafeuille adopte une attitude différente de la notre pour étudier le rôle de l'eau dans l'apparition des épidémies d'entérovirus (94). Une comparaison entre les entérovirus retrouvés dans les effluents de stations d'épuration et les entérovirus isolés dans les selles des enfants hospitalisés pour n'importe quel motif est menée. A plusieurs reprises, des détections répétées d'un entérovirus donné dans les effluents épurés étaient suivies à un mois d'intervalle de l'isolement du même type d'entérovirus dans un nombre anormalement élevé de selles, avec ou sans manifestations cliniques associées. Cette constatation est tout-à-fait en faveur d'un passage des virus entériques des eaux épurées jusqu'à l'homme, en dépit des facteurs environnementaux hostiles à la survie des virus et des traitements éventuels de potabilisation de l'eau. Il est dommage que cette étude n'ait pas pu estimer la possibilité géographique et temporelle pour les enfants porteurs des entérovirus d'avoir consommé l'eau contaminée par les mêmes entérovirus à la sortie de la station d'épuration. On réalise aisément la difficulté pour évaluer où sera une eau donnée, contenant des virus, un mois plus tard, et si cette même eau peut finir dans le verre d'un individu et le rendre malade!

2. 4. LE RISQUE DE GEA INFANTILE A ROTAVIRUS EST-IL LIE A LA CONSOMMATION D'EAU NON CONFORME AUX EXIGENCES REGLEMENTAIRES MICROBIOLOGIQUES ?

Les rotavirus humains sont responsables d'une morbidité importante chez les jeunes enfants durant l'hiver et représentent un problème de santé publique par le coût des journées d'hospitalisation (6, 58, 79) et les conséquences économiques pour les familles des enfants hospitalisés. Notre étude a confirmé en effet que près d'un enfant sur trois habitant en Isère, d'âge inférieur ou égal à 2 ans, qui est hospitalisé en hiver pendant au moins 24 heures pour une pathologie médicale, est atteint de GEA à rotavirus. Il est fort probable que beaucoup plus d'enfants contractent cette infection au cours de l'hiver, mais tous ne sont pas hospitalisés.

Le nombre de cas attendu au regard des données enregistrées les hivers précédents n'a pas été atteint. Un argument en faveur de ce déficit de cas pourrait être l'absence d'hiver froid et sec, qui n'a pas été favorable à la survie des rotavirus dans l'environnement.

Si la transmission interhumaine semble privilégiée dans les épidémies de GEA à rotavirus localisées à une crèche ou à un service de pédiatrie (15, 79), nous disposons de peu de données sur le mode de contamination des cas sporadiques. L'hypothèse d'une transmission par l'air a déjà été avancée. La transmission des rotavirus par l'eau semble plus probable. En effet, l'abondance des rotavirus rejetés dans l'environnement, leur résistance particulière dans des conditions de basse température, ainsi que l'inefficacité de certains traitements de décontamination microbienne de l'eau sont autant d'arguments en faveur de la présence de rotavirus dans l'eau d'alimentation (6, 93). La littérature rapporte d'ailleurs des épidémies massives de GEA à rotavirus provoquées par la consommation d'eau d'alimentation accidentellement souillée (6, 54, 116).

Nous n'avons pas mis en évidence une relation entre les GEA infantiles à rotavirus nécessitant une hospitalisation et la consommation d'eau du robinet, même lorsque l'eau qui est bue est régulièrement contaminée par des bactéries. Il est possible que les tests statistiques aient souffert d'une faiblesse d'effectifs, ou que l'absence de germes tests ne soit pas un bon indicateur de l'absence de virus. Le risque virologique lié à la consommation d'eau du réseau public aurait peut-être été mieux approché en considérant le type de traitement et son pouvoir virucide, ou l'origine de l'eau et la géologie des terrains traversés, au lieu de se référer à la qualité bactériologique.

On constate toutefois que les enfants qui habitent dans des foyers desservis par une eau de moyenne, médiocre ou mauvaise qualité bactériologique ont 3 fois plus de risque d'être hospitalisés pour une GEA à rotavirus que les enfants dont le domicile est desservi par une eau de bonne qualité. On peut penser que les tests gagnent en sensibilité dans la mesure où tous les cas et les témoins sont pris en compte, au lieu de s'intéresser uniquement aux enfants qui consomment l'eau du robinet. Mais il faut alors faire l'hypothèse que l'exposition au rotavirus résulte non seulement de la consommation d'eau souillée, mais aussi de la préparation d'aliments avec de l'eau contaminée, de l'eau utilisée pour la toilette, de l'inhalation de vapeurs d'eau chargées en virus, des contacts avec les autres personnes du foyer qui peuvent être des porteurs sains. Cet ensemble d'expositions à une eau qui n'est pas de bonne qualité bactériologique serait alors facteur de risque de GEA à rotavirus. Dans cette hypothèse, nous considérons qu'il existe une relation entre la contamination de l'eau par des rotavirus et la présence de germes tests.

Ce travail a permis d'observer une incidence de la maladie étudiée plus élevée dans certaines communes. Il serait souhaitable de réaliser une étude similaire au sein d'un espace géographique apparemment plus exposé, de taille restreinte, tel qu'un canton. Une enquête associant centres hospitaliers, médecins et pharmaciens pourrait alors être envisagée afin de recruter cas hospitaliers et cas de ville. Une recherche de rotavirus régulière dans des échantillons d'eau des différents réseaux de l'ensemble des communes considérées pourrait alors être menée en parallèle afin de tenter de corréliser des épisodes massifs de GEA infantiles à rotavirus à la présence de rotavirus dans l'eau d'alimentation.

2. 5. CORRELATION ENTRE LA CONTAMINATION BACTERIENNE ET LA CONTAMINATION VIRALE

L'analyse bactériologique des eaux d'alimentation est parfaitement définie par l'association française de normalisation (AFNOR) (7), alors qu'aucune réglementation n'existe à ce jour pour l'analyse virologique.

Certains arguments tendent à démontrer que l'absence de germes-tests ne reflète pas l'inocuité virale d'une eau destinée à la consommation (5, 65, 111).

Nos résultats témoignent de l'absence de corrélation, voire même de la corrélation négative, qui existe entre les contaminations bactérienne et virale de l'eau d'alimentation. Neuf prélèvements non conformes aux exigences réglementaires de l'arrêté 89-3 modifié étaient exempts de rotavirus et d'entérovirus, alors que 5 prélèvements contaminés par l'une ou l'autre de ces deux catégories de virus étaient bactériologiquement conformes. L'absence de corrélation entre les contaminations bactérienne et virale de l'eau, d'alimentation en particulier, a déjà été rapportée (65).

On constate également à travers nos résultats, que les eaux contenant des virus ont un coefficient de conformité bactériologique compris entre 0,89 et 1,00. Les résultats des 10 dernières analyses bactériologiques étaient conformes dans plus de 89% des cas.

Cette constatation analytique n'est pas en accord avec le résultat de l'étude cas-témoins menée dans la région, au même moment, et qui a montré que les enfants dont le foyer était desservi par une eau de qualités moyenne, médiocre ou mauvaise avaient un risque 3 fois plus élevé que les enfants recevant une eau de bonne qualité microbiologique à leur domicile de faire une GEA à rotavirus conduisant à leur hospitalisation. Ce résultat est superposable à celui d'une étude réalisée par le CAREPS (19), qui a permis d'établir que les troubles gastro-entériques étaient 2 fois plus fréquents dans les zones desservies par une eau non conforme aux exigences réglementaires.

Il est également important de noter que sur 56 prélèvements effectués à proximité du domicile d'un enfant de moins de 2 ans hospitalisé pour une GEA à rotavirus, au mieux deux jours après que l'enfant ait contracté le virus, 8 étaient contaminés par des microorganismes, bactéries ou virus, très vraisemblablement d'origine fécale. Par contre, sur les 24 prélèvements réalisés de façon hebdomadaire, sans tenir compte d'aucune morbidité déclarée, dans les communes du département de l'Isère (Grenoble, Voiron et Saint-Marcellin), 1 seul renfermait des indicateurs bactériens de contamination fécale.

2. 6. LA FAIBLESSE DES TRAITEMENTS DE POTABILISATION

Les virus entériques, notamment les rotavirus, sont souvent très résistants à certains agents classiquement utilisés pour la désinfection de l'eau (6), en particulier lorsque le protocole de désinfection est mal appliqué.

Ainsi des doses usuelles de chloration des eaux se sont révélées incapables à éliminer les rotavirus présents dans un échantillon d'eau (6). Cette inefficacité du traitement de potabilisation peut aussi être la conséquence de la présence de substances organiques en quantité trop importante et qui bloquent l'action désinfectante.

Dans notre travail, 42 échantillons étaient des eaux non traitées, et 49, des eaux traitées avant le prélèvement. Sur les 5 prélèvements qui contenaient des virus, 3 étaient des eaux traitées, soit au chlore [2], soit aux rayons ultra-violet [1], et les 2 autres n'avaient subi aucun traitement de potabilisation. Il semble donc que, si la contamination de l'eau ne s'est pas faite sur le trajet du réseau de distribution, les traitements de potabilisation ont manifestement été inefficaces dans 3 circonstances, et à chaque fois sur les rotavirus. Pour le prélèvement n°90, eau traitée aux UV, les résultats réguliers de la teneur en matières organiques (oxydabilité au KMnO₄ à chaud) communiqués par le Laboratoire Régional d'Analyse des Eaux, ne révèlent pas une concentration anormalement élevée de nature à réduire l'efficacité désinfectante du traitement aux UV comme cela a déjà été décrit (110). Dans le cas des virus, on retrouve donc presque autant d'échantillons contaminés dans les eaux traitées (6,1%) que dans les eaux non traitées (4,7%).

Par contre les prélèvements qui contiennent des germes tests bactériens sont des eaux qui n'ont subi aucun traitement de potabilisation avant leur distribution dans 7 cas sur 9. Les échantillons renfermant des bactéries indicatrices de contamination fécale sont donc 4 fois plus souvent des eaux non traitées (16,6%) que des eaux traitées (4,1%).

Il apparaît donc qu'en l'absence de contamination accidentelle du réseau d'alimentation en eau, hypothèse non vérifiée dans notre étude, les traitements de potabilisation au chlore ou aux UV correctement menés (non vérifiés dans notre étude) ne sont pas de nature à garantir une totale innocuité virale. Cette faiblesse peut être la conséquence d'un temps de contact trop court entre l'eau et l'agent désinfectant ou d'un abaissement trop rapide de la concentration en chlore qui est rapidement sous le seuil d'efficacité virucide, en particulier dans le cas des rotavirus.

2. 7. QUEL EST LE RISQUE SANITAIRE LIÉ À UN RESULTAT POSITIF DE LA PCR ROTAVIRUS OU ENTEROVIRUS ?

2. 7. 1. Aspect quantitatif

Tout comme dans le cas des germes tests bactériens, la présence de rotavirus, d'entérovirus, de VHA ou de tout autre virus entérique dans l'eau d'alimentation témoigne d'une contamination par les matières fécales. De la même façon que les coliformes et streptocoques fécaux, l'ingestion d'une telle eau ne conduit pas systématiquement à une infection caractérisée avec des manifestations pathologiques, et beaucoup d'individus sont porteurs

sains, asymptomatiques. La question est donc de savoir si on peut tolérer la présence de ces virus, et dans quelles proportions.

Si pour les shigelles par exemple, la dose minimale infectieuse est estimée comprise entre 1000 et 100000 germes, pour les virus cette dose est beaucoup plus faible et mal connue : 17 pfu (unités infectieuses formant une plage de lyse en culture) pour l'échovirus-12 (106), 1 pfu pour le poliovirus (106) et le rotavirus (124), soit de 1700 à 50 particules virales environ, si l'on tient compte du rapport particules virales/particules infectieuses qui est d'environ 100/1 pour les entérovirus et 50/1 pour les rotavirus (74).

Les normes sont généralement définies sur la base des connaissances du moment, en prenant une marge de sécurité qui peut être un facteur allant de 1 à 1000, pour que le risque pris soit aussi réduit que socialement acceptable et techniquement possible. Par conséquent, en prenant un facteur de sécurité 1000, il faudrait qu'il y ait moins de 1 entérovirus ou rotavirus dans l'échantillon étudié. Signalons aussi que les recommandations de 1970 de World Health Organization, stipulent que si on ne détecte pas plus d'une pfu virale par litre d'eau, il est raisonnable de considérer cette eau sûre pour la consommation (38). Logiquement, tout résultat positif d'une PCR ne peut provenir que de l'amplification d'au moins un génome viral, et par conséquent signaler la contamination de l'échantillon par au moins une particule virale. Il résulte de ces déductions, qu'avec un facteur de sécurité important, une eau d'alimentation devrait donner un résultat négatif à l'analyse virologique par PCR pour que le risque de contamination par les matières fécales, et donc par des germes potentiellement dangereux soit écarté. Par la même, le risque d'infection par le virus recherché lui-même (rotavirus, entérovirus, VHA) est totalement écarté.

2. 7. 2. Aspect qualitatif

Il est également important de typer le virus détecté. Dans le cas des rotavirus, comme nous l'avons montré dans ce travail, les souches animales sont susceptibles de contaminer l'eau d'alimentation. Ce phénomène est révélateur de 2 risques : d'une part, une contamination d'origine animale de l'eau par les rotavirus mais aussi éventuellement par des parasites bovins ou porcins, et, d'autre part, une possible contamination humaine par des sérotypes animaux présentant une forte homologie avec des souches humaines (45, 76). Cette infection humaine par des sérotypes animaux, déjà évoquée, mérite sans doute d'être prise en compte (45).

En ce qui concerne les entérovirus, notamment les poliovirus, une distinction entre souche sauvage et souche vaccinale devra être établie. Toutefois, un retour à la virulence dans l'environnement, par recombinaison, de souches vaccinales a été mentionné dans la littérature (41). Par contre, typer les entérovirus présente peu d'intérêt sur le plan clinique, dans la mesure où les manifestations pathologiques qu'ils provoquent sont très variées et peu spécifiques (101).

2. 8. LA DIFFICULTE EPIDEMIOLOGIQUE PROPRE AU DEPARTEMENT DE L'ISERE

Le département de l'Isère est caractérisé par un morcellement de la distribution des eaux de boisson. Plus de 1800 ouvrages de captage alimentent une population sédentaire de près d'un million d'habitants (recensement 1990). Pour desservir 533 communes, 955 unités de distribution sont individualisées (61). Ce morcellement est particulièrement fréquent en zone de montagnes.

Le département de l'Isère est alimenté presque exclusivement par des eaux souterraines, issues de 3 grands types d'aquifères : les domaines calcaires des Pré-Alpes, du Nord et du Vercors, d'une part. Ces aquifères se caractérisent par une très forte vulnérabilité aux contaminations microbiologiques. Les granites et micachistes des massifs cristallins, Meije, Pelvoux, Grandes Rousses, Chaîne de Belledonne, d'autre part. Et enfin, le domaine molassique du Bas-Dauphiné et, dans une moindre mesure, des Pré-Alpes du Sud.

Il existe une forte disparité entre les communes des domaines molassiques ou granitiques, d'une part, et celles des domaines calcaires karstiques, d'autre part. Dans les premières, l'eau est de bonne qualité microbiologique, mais est souvent vulnérable aux pollutions chimiques d'origine industrielle ou agricole. Dans les secondes, la qualité microbiologique est souvent médiocre (61).

Les 5 réseaux sur lesquels nous avons mis en évidence, de façon ponctuelle, des virus entériques sont situés en zone de molasse, alors que sur 26 réseaux prélevés en zone karstique (voir carte en annexe 3), aucun n'a donné un résultat positif à la recherche des virus (5 positifs en bactéries). On observe également qu'aucun enfant de 2 ans maximum habitant dans la zone des massifs cristallins n'a été hospitalisé pour une gastro-entérite aiguë à rotavirus durant l'étude. On peut donc penser que l'eau d'alimentation, qui y est généralement de bonne qualité microbiologique, a peu de probabilité d'être source de contamination par des microorganismes. Toutefois, il s'agit naturellement d'un secteur à faible densité d'habitation, occupé par une population plus âgée qu'à proximité des agglomérations, ayant donc moins d'enfants en bas âge. De plus, les infrastructures routières plus ou moins favorables en période hivernale, peuvent limiter le recours à l'hospitalisation.

9 prélèvements positifs (virus ou bactéries) sont situés dans le domaine molassique du Bas-Dauphiné. Il s'agit d'une zone tournée vers l'agriculture polyvalente et l'élevage, notamment bovin. Les souches de rotavirus isolées sont d'ailleurs dans 2 cas sur 4 bovines, et une autre est une souche porcine. Au cours de l'automne 1988, une épidémie à *Salmonella paratyphi* var. *java* a touché 40 personnes habitant dans une commune de cette zone. L'investigation épidémiologique devait conduire à supposer une contamination d'origine bovine d'une ressource hydrique (96). Certes, dans le cas des rotavirus, la contamination par des souches animales, notamment bovines, est peu probable, mais la présence de ces virus dans l'eau d'alimentation témoigne d'une souillure de l'eau par les matières fécales animales, peut-être

par la pratique de l'épandage dans les zones de cultures intensives, souillure qui peut être virale, mais aussi bactérienne ou parasitaire. De plus, la persistance de ces rotavirus dans des eaux traitées signe l'insuffisance ou l'inadéquation du procédé utilisé.

2. 9. INSUFFISANCE DES GERMES TESTS BACTERIENS ; QUELLES PERSPECTIVES ?

Il semble donc urgent de choisir un virus témoin de contamination fécale de l'eau. Les entérovirus ont été pressentis pour jouer le rôle d'indicateur de la présence de virus entériques pathogènes pour l'homme. De plus, la recherche par PCR des entérovirus permet de détecter toute une famille de virus (101), alors que les amorces rotavirus ou VHA ne détectent qu'une sorte de virus. Il y a donc plus de chances d'avoir des échantillons positifs en cherchant les entérovirus (74). De plus, nous avons vu dans les considérations épidémiologiques que trouver un entérovirus dans les eaux usées témoigne de la circulation du virus dans la population et a une valeur prédictive dans l'éclosion d'une épidémie (94). Les entérovirus sont également la seule catégorie de virus mentionnée dans les recommandations des Communautés Européennes pour le milieu aquatique (98) et l'US Environmental Protection Agency (USEPA) considère que c'est le meilleur et le plus significatif groupe de virus pour contrôler l'environnement (98).

Cependant nous avons déjà évoqué le caractère saisonnier de la présence dans le milieu hydrique des entérovirus et des nombreux autres virus entériques. Une association de 2 ou 3 virus doit-elle être adoptée pour détecter une contamination d'origine fécale quelle que soit la saison de l'année?

Par ailleurs, le poliovirus est considéré comme un mauvais modèle de souche virale pour l'étude des désinfectants, et sans doute pour l'étude de l'efficacité des traitements de potabilisation de l'eau (1) : les bactériophages, le virus de l'hépatite A, les rotavirus et les adénovirus sont plus résistants (2). Ainsi, dans l'échelle de résistance, on classe du plus fragile au plus résistant, le poliovirus, l'adénovirus, le bactériophage, le rotavirus et le VHA (2).

Havelaar rapporte une excellente corrélation entre la présence de FRNaphages, de coliformes thermotolérants, de streptocoques fécaux et de virus dans différentes catégories d'eaux environnementales (56). Ces bactériophages sont beaucoup plus faciles à surveiller et nécessitent des techniques moins pointues que dans le cas des virus. Ils pourraient donc présenter une alternative très intéressante à la détection des virus entériques dans l'eau, et jouer le rôle de témoins de contamination actuelle ou ancienne (63, 110).

3. CONCLUSION

Nous avons mis au point expérimentalement et évalué "en grandeur nature" une procédure analytique pour l'étude de la contamination de l'eau d'alimentation par les rotavirus, les entérovirus et le virus de l'hépatite A. Cette démarche devrait dans l'avenir être appliquée à d'autres virus entériques, contaminants fréquents des eaux et impliqués dans les pathologies humaines, notamment le virus de Norwalk et les adénovirus. Notre méthode, validée avec un volume d'étude de 2 litres, est transposable très aisément à des volumes plus grands. Des améliorations analytiques dans la RT-PCR ont été récemment testées et devraient alléger la charge de travail que constitue la recherche des virus dans l'eau.

En l'absence d'exigences réglementaires parfaitement définies par le législateur et devant le coût global de l'analyse (concentration-détection), ce type d'analyse n'est pas envisageable à ce jour en routine pour la surveillance des eaux d'alimentation.

La grande sensibilité de cette expertise analytique devrait toutefois la promouvoir dans l'investigation d'épidémies aiguës suspectées d'origine virale. Enfin, cette démarche est également applicable à l'étude d'autres types d'environnements, notamment à l'étude du rôle des surfaces contaminées comme vecteur de transmission des virus.

Conclusion

CONCLUSION

La fréquence et les conséquences de la contamination virale de l'eau destinée à la consommation humaine sont très mal connues en raison des très faibles concentrations virales rencontrées. L'ultrafiltration et l'amplification des acides nucléiques viraux par réaction de polymérisation en chaîne permettent une analyse virologique (entérovirus, rotavirus, virus de l'hépatite A) rapide, sensible et spécifique de l'eau d'alimentation. Ce procédé peut s'appliquer à des échantillons hydriques de grande taille et à des virus non détectables par inoculation sur cultures cellulaires ou se multipliant très lentement. Son application à d'autres virus, fréquemment impliqués dans des gastro-entérites d'origine hydrique, notamment le virus de Norwalk et les adénovirus, reste à évaluer. La rapidité d'obtention du résultat, généralement une journée, voire moins avec l'apparition de kits pour le diagnostic très performants, en font un outil privilégié pour les instances sanitaires en charge de la qualité de l'eau d'alimentation. Toutefois le coût élevé de l'analyse reste un obstacle à une large utilisation en routine.

L'analyse d'échantillons d'eau d'alimentation, prélevés sur différents réseaux dans le département de l'Isère, montre que des virus pathogènes pour l'homme ou l'animal peuvent être présents en l'absence de germes tests bactériens, y compris dans des eaux traitées, réputées de bonne qualité microbiologique. Leur présence indique une contamination des ressources hydriques par des matières fécales d'origines humaine ou animale, et une insuffisance ou une anomalie des traitements de potabilisation couramment appliqués.

Bien que le pouvoir infectieux des virus détectés n'aient pas pu être mis en évidence, il semble probable que les acides nucléiques viraux amplifiés provenaient de particules virales intactes, susceptibles de provoquer une infection dans la population. La morbidité liée à la présence de virus dans l'eau d'alimentation est certainement sous-estimée et bénigne. Elle ne pourra réellement être évaluée qu'à travers une étude épidémiologique de grande envergure, couplant une analyse régulière d'échantillons hydriques à un recueil des affections d'origine virale dans la population. Un tel travail devrait également permettre de discerner l'indicateur viral le plus prédictif de la survenue de pathologies, et le plus pertinent.

Dans l'attente de résultats épidémiologiques complémentaires et d'une démarche analytique officialisée, une démarche qualité devrait être appliquée à la production d'eau destinée à l'alimentation depuis son origine jusqu'au robinet du consommateur. Cette ambition prévaut particulièrement dans un département qui rayonne à travers la richesse de son patrimoine écologique et qui peut se targuer de ses immenses réserves hydriques glaciaires.

U.F.R. de PHARMACIECONCLUSIONSMémoire soutenu par M **SOULE HERVE**

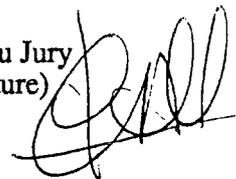
La fréquence et les conséquences de la contamination virale de l'eau destinée à la consommation humaine sont très mal connues en raison des très faibles concentrations virales apparentes rencontrées. L'ultrafiltration tangentielle et l'amplification des acides nucléiques viraux par réaction de polymérisation en chaîne permettent une analyse virologique rapide, sensible et spécifique de l'eau d'alimentation. Ce procédé peut s'appliquer à des échantillons hydriques de grande taille et à des virus non détectables par inoculation de cultures cellulaires ou se multipliant très lentement. Son application à d'autres virus, fréquemment impliqués dans des gastro-entérites d'origine hydrique, notamment le virus de Norwalk et les adénovirus, reste à évaluer. La rapidité d'obtention du résultat, généralement une journée, voire moins avec l'apparition de kits pour le diagnostic très performants, en font un outil privilégié pour les instances sanitaires en charge de la qualité de l'eau d'alimentation. Toutefois le coût élevé de l'analyse reste un obstacle à une large utilisation en routine.

L'analyse d'échantillons d'eau d'alimentation, prélevés sur différents réseaux dans le département de l'Isère, montre que des virus pathogènes pour l'homme ou l'animal peuvent être présents en l'absence de germes tests bactériens, y compris dans des eaux traitées, réputées de bonne qualité microbiologique. Leur présence indique une contamination des ressources hydriques par des matières fécales d'origines humaine ou animale, et une insuffisance ou une anomalie des traitements de potabilisation couramment appliqués.

Bien que le pouvoir infectieux des virus détectés n'aient pas pu être mis en évidence, il semble fort probable que les acides nucléiques viraux amplifiés provenaient de particules virales intactes, susceptibles de provoquer une infection dans la population. La morbidité liée à la présence de virus dans l'eau d'alimentation est certainement sous-estimée et bénigne. Elle ne pourra réellement être évaluée qu'à travers une étude épidémiologique de grande envergure, couplant une analyse régulière d'échantillons hydriques à un recueil des affections d'origine virale dans la population. Un tel travail devrait également permettre de discerner l'indicateur viral le plus prédictif de la survenue de pathologies, et le plus pertinent.

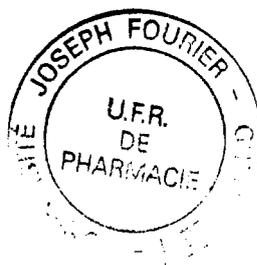
Dans l'attente de résultats épidémiologiques complémentaires et d'une stratégie analytique officialisée, une démarche qualité devra être appliquée à la production d'eau destinée à l'alimentation depuis son origine jusqu'au robinet du consommateur. Cette ambition prévaut particulièrement dans un département qui rayonne à travers la richesse de son patrimoine écologique et qui peut se targuer de ses immenses réserves hydriques glaciaires.

Le Président du Jury
(Nom et signature)



VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le



Vu, le Directeur de l'U.F.R.
de Pharmacie

J. ROCHAT

Vu, pour le Président de l'Université
Joseph Fourier - GRENOBLE 1,
le Directeur de l'U.F.R. de Pharmacie

J. ROCHAT

Références Bibliographiques

- 1 - **ABAD F.X., PINTÓ R.M. and BOSCH A.** -
Survival of enteric viruses on environmental fomites.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(10), 3704-10.
- 2 - **ABAD F.X., PINTÓ R.M., DIEZ J.M. and BOSCH A.** -
Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(7), 2377-83.
- 3 - **ABBASZADEGAN M., HUBER M.S., GERBA C.P. and PEPPER I.P.** -
Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(5), 1318-24.
- 4 - **ADMINISTRATION FRANÇAISE** -
Hygiène alimentaire: Eaux destinées à la consommation humaine.
Recueil de textes administratifs, Journal Officiel de la République Française, Avril 1991.
- 5 - **AKIN E.W.** -
Occurrence of viruses in treated drinking water in the United States.
Wat. Sci. Tech., 1985, 17, 689-700.
- 6 - **ANSARI S.A., SPRINGTHORPE V.S. and SATTAR S.A.** -
Survival and vehicular spread of human rotaviruses : possible relation to seasonality of outbreaks.
J. Infect. Dis., 1991, 13, 448-61.
- 7 - **ASSOCIATION FRANCAISE DE NORMALISATION.** -
Eaux méthodes d'essais.
Recueil de normes françaises, AFNOR, La Défense, 4ème édition, 1990.
- 8 - **BERMAN D., ROHR M.-E. and SAFFERMAN R.S.** -
Concentration of poliovirus in water by molecular filtration.
Appl. Environ. Microbiol., 1980, 40, 426-28.
- 9 - **BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M. and DELOINCE R.** -
Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water.
Appl. Environ. Microbiol., 1988, 54, 2705-10.
- 10 - **BLAKE P.A., RAMOS S., MacDONALD K.L., RASSI V., TARDELLI GOMES T.A., IVEY C., BEAN N.H. and TRABULSI L.R.** -
Pathogen-specific risk factors and protective factors for acute diarrheal disease in urban brazilian infants.
J. Infect. Dis., 1993, 167, 627-32.
- 11 - **BOOM R., SOL C.J.A., SALIMANS M.M.M., JANSEN C.L., WERTHEIM-VAN DILLEN P.M.E. and VAN DER NOORDAA J.** -
Rapid and simple method for purification of nucleic acids.
J. Clin. Microbiol., 1990, 28(3), 495-503.
- 12 - **BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and JOFRE J.** -
Survey of viral pollution in Besos river (Barcelona).
J.W.P.C.F., 1986, 58, 87-91.
- 13 - **BOSCH A., PINTO R.M., BLANCH A.R. and JOFRE J.** -
Detection of human rotavirus in sewage through two concentration procedures.
Water Res., 1988, 22, 343-48.

- 14 - **BOSCH A., GAJARDO R., ABAD F.X., DIEZ J.M. and JOFRE J.** -
Concentration of hepatitis A virus in environmental samples.
Wat. Sci. Technol., 1991, 22(2).
- 15 - **BUTZ A.M., FOSARELLI P., DICK J., CUSACK T. and YOLKEN R.** -
Prevalence of rotavirus on high-risk fomites in day-care facilities.
Pediatrics, 1993, 92, 202-05.
- 16 - **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., DENNIS D.T. et al.** -
A multistate outbreak of Norwalk virus gastroenteritis associated with consumption of commercial ice.
J. Infect. Dis., 1991, 164, 860-63.
- 17 - **CECUK D. et GRCE M.** -
Présence de virus dans l'eau potable en Croatie.
Rev. Epidém. et Santé Publ., 1992, 40, 182-86.
- 18 - **CECUK D., KRUZIC V., TURKOVIC B. et GRCE M.** -
Présence de virus humains dans l'environnement côtier d'un port croate.
Rev. Epidém. et Santé Publ., 1993, 41, 487-93.
- 19 - **CENTRE ALPIN DE RECHERCHE EPIDEMIOLOGIQUE ET DE PREVENTION SANITAIRE (C.A.R.E.P.S.).** -
Etude épidémiologique des effets sur la santé de la consommation d'eaux non conformes aux normes bactériologiques.
Mars 1985.
- 20 - **CHARLEI F. et FERCHAUD R.** -
Epidémie de gastro-entérites virales liée à la consommation de palourdes en Charente-Maritime.
B.E.H., 1994, 37, 169.
- 21 - **CHOMCZYNSKI P. and SACCHI N.** -
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.
Anal. Biochem., 1987, 162, 156-59.
- 22 - **CLARKE N.A., AKIN E.W., LIU O.C., HOFF J.C., HILL W.F., Jr., BRASHEAR D.A. and JAKUBOWSKI W.** -
Virus study for drinking-water supplies.
J. Am. Water Works Assoc., 1975, 67, 192-98.
- 23 - **CLIVER D.O.** -
Significance of water and environment in the transmission of virus disease.
Monog. Virol., 1984, 15, 30-42.
- 24 - **Code de la Santé Publique, Décret n°89-3 du 3 janvier 1989 relatif aux eaux destinées à la consommation humaine à l'exclusion des eaux minérales naturelles (J. O. du 4 avril 1989) modifié par le Décret n°90-330 du 10 avril 1990 (J. O. du 13 avril 1990) et par le Décret n°91-257 du 7 mars 1991 (J. O. du 8 mars 1991).**

- 25 - **CORWIN A., JAROT K., LUBIS I., NASUTION K., SUPARMAWO S., SUMARDIATI A., WIDODO S., NAZIR S., ORNDORFF G., CHOI Y. et al. -**
Two years' investigation of epidemic hepatitis E virus transmission in West Kalimantan (Borneo), Indonesia.
Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 1995, 89(3), 262-65.
- 26 - **DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S. and WRIGHT B.A. -**
Isolation of enterovirus and reovirus from sewage and treated effluents in selected Puerto Rican communities.
Appl. Environ. Microbiol., 1989, 55(2), 503-06.
- 27 - **DAURAT G. -**
Une épidémie de gastro-entérite aiguë à virus Norwalk-like liée à la consommation d'huîtres dans l'Hérault, Décembre 1992.
B.E.H., 1994, 37, 170-71.
- 28 - **Directive du Conseil du 15 juillet 1980 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (80/778/CEE).**
J. O. Com. Eur., 30.08.1980, L 229, 11-29.
- 29 - **DIVIZIA M., SANTI A.L. and PANÀ A. -**
Ultrafiltration : an efficient second step for hepatitis A virus and poliovirus concentration.
J. Virol. Methods, 1989, 23, 55-62.
- 30 - **DIZER H., NASSER A. and LOPEZ J.M. -**
Penetration of different human pathogenic viruses into sand column percolated with distilled water, groundwater or wastewater.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47, 409-15.
- 31 - **DUCHEMIN J. -**
Epidémie hydrique : une shigelle dans l'eau potable.
B.E.H., 1993, 45, 205-06.
- 32 - **EGGER D., PASAMONTES L., OSTERMAYER M. and BIENZ K. -**
Reverse transcription multiplex PCR for differentiation between polio- and enteroviruses from clinical and environmental samples.
J. Clin. Microbiol., 1995, 33(6), 1442-47.
- 33 - **FATTAL B. and KATZENELSON E. -**
Evaluation of gauze pad method to recover viruses from water.
Water Res., 1976, 10, 1135-40.
- 34 - **FERLEY J.P., ZMIROU D., COLLIN J.F. et CHARREL M. -**
Etude longitudinale des risques liés à la consommation d'eaux non conformes aux normes bactériologiques.
Rev. Epidém. et Santé Publ., 1986, 34, 89-99.
- 35 - **FLORES J., SEARS J., PEREZ SCHAEEL I., WHITE L., GARCIA D., LANATA C. and KAPIKIAN A.Z. -**
Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein VP7.
J. Virol., 1990, 64(8), 4021-24.



- 36 - **FUCHS F., LEPARC I., KOPECKA H., GARIN D. and AYMARD M.** -
Use of cRNA digoxigenin-labelled probes for detection of enteroviruses in humans and
in the environment.
J. Virol. Methods, 1993, 42, 217-26.
- 37 - **GAGGERO A., AVENDANO L.F., FERNANDEZ J. and SPENCER E.** -
Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhoea.
J. Clin. Microbiol., 1992, 30, 3294-97.
- 38 - **GAMBLE D.R.** -
Viruses in drinking-water. Reconsideration of evidence for postulated health hazard and
proposals for virological standards of purity.
Lancet, 1979, 425-28.
- 39 - **GARIN D., FUCHS F., CRANCE J.M., DELOINCE R., AYMARD M.
and BARTOLI M.** -
Validation of an ultrafiltration process to concentrate viruses from large volumes of
water.
Environ. Tech., 1993, 14, 397-400.
- 40 - **GARIN D., FUCHS F., CRANCE J.M., ROUBY Y., CHAPALAIN
J.C., LAMARQUE D., GOUNOT A.M. and AYMARD M.** -
Exposure to enteroviruses and hepatitis A virus among divers in environmental waters
in France, first biological and serological survey of a controlled cohort.
Epidemiol. Infect., 1994, 113, 541-49.
- 41 - **GEORGESCU M.-M., DELPEYROUX F. and CRAINIC R.** -
Tripartite genome organization of a natural type 2 vaccine/non vaccine recombinant
poliovirus.
J. Gen. Virol., 1995, 76, 2343-48.
- 42 - **GERBA C.P. and HAAS C.N.** -
Assessment of risks associated with enteric viruses in contaminated drinking water.
In "Chemical and biological characterization of sludges, sediments, dredge soils and
drilling muds", 1988, LICHTENBERG J.J. ed., American Society for testing and
materials, Philadelphia, 489-494.
- 43 - **GERBA C.P. and ROSE J.B.** -
Viruses in source and drinking water.
In "Drinking water microbiology", 1990, Springer-Verlag, New York, 380-95.
- 44 - **GERMANI Y., MORILLON M., BEGAUD E., DUBOURDIEU H.,
COSTA R. and THEVENON J.** -
Two-year study of endemic pathogens associated with acute diarrhea in New Caledonia.
J. Clin. Microbiol., 1994, 32(6), 1532-36.
- 45 - **GERNA G., STEELE A.D., HOSHINO Y., SERENO M., GARCIA D.,
SARASINI A. and FLORES J.** -
A comparison of the VP7 gene sequences of human and bovine rotaviruses.
J. Gen. Virol., 1994, 75, 1781-84.
- 46 - **GILGEN M., WEGMÜLLER B., BURKHALTER P., BÜHLER H.-P.,
MÜLLER U., LÜTHY J. and CANDRIAN U.** -
Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water.
Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(4), 1226-31.

- 47 - **GOUVEA V., GLASS R.I., WOODS P. et al.**
Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens.
J. Clin. Microbiol., 1990, 28, 276-82.
- 48 - **GOYAL S.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. -**
Human enteroviruses in oysters and their overlying waters.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 37(3), 572-81.
- 49 - **GRABOW W.O.K., GAUSS-MULLER V., PROZESKY O.W. and DEINHARDT D. -**
Inactivation of hepatitis A virus and indicator organisms in water by free chlorine residuals.
Appl. Environ. Microbiol., 1983, 46, 619-34.
- 50 - **GRINDE B., JONASSEN T.Ø. and USHIJIMA H. -**
Sensitive detection of group A rotaviruses by immunomagnetic separation and reverse transcription-polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1995, 55, 327-38.
- 51 - **GUST I.D. and PURCELL R.H. -**
Report of a workshop : waterborne non-A, non-B hepatitis.
J. Infect. Dis., 1987, 156(4), 630-35.
- 52 - **GUTTMAN-BASS N. and CATALANO-SHERMAN J. -**
Humic acid interference with virus recovery by electropositive microporous filters.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 49(5), 1260-64.
- 53 - **GUTTMAN-BASS N. and CATALANO-SHERMAN J. -**
Effects of humic materials on virus recovery from water.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52(3), 556-61.
- 54 - **HARRIS J.R., COHEN M.L. and LIPPY E.C. -**
Water-related disease outbreaks in the United States, 1981.
J. Infect. Dis., 1983, 148(4), 759-62.
- 55 - **HASLAY C., LECLERC H. -**
Microbiologie des eaux d'alimentation.
Lavoisier, Paris, 1993, 65-95.
- 56 - **HAVELAAR A.H., VAN OLPHEN M. and DROST Y.C. -**
F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(9), 2956-62.
- 57 - **HEDBERG C.W. and OSTERHOLM M.T. -**
Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis.
Clin. Microbiol. Rev., 1993, 6(3), 199-210.
- 58 - **HO M.-S., GLASS R.I., PINSKY P.F. and ANDERSON L.J. -**
Rotavirus as a cause of diarrheal morbidity and mortality in the United States.
J. Infect. Dis., 1988, 158(5), 1112-16.
- 59 - **HURST C.J., BENTON W.H. and STETLER R.E. -**
Detecting viruses in water.
J. Am. Waterworks Association, 1989, 81, 71-80.

- 60 - **HURST C.J.** -
Presence of enteric viruses in freshwater and their removal by conventional drinking water treatment process.
WHO Bul., 1991, 69, 113-19.
- 61 - **INSTITUT UNIVERSITAIRE DE SANTE PUBLIQUE DE GRENOBLE** -
Atlas santé-environnement dans le département de l'Isère.
Ministère de la Santé, Ministère de l'Environnement, Conseil Général de l'Isère, Institut français de l'environnement, 1993.
- 62 - **JANSEN R.W., SIEGL G. and LEMON S.M.** -
Molecular epidemiology of human hepatitis A virus defined by an antigen-capture polymerase chain reaction method.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1990, 87, 2867-71.
- 63 - **JOFRE J., BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R. and TARTERA C.** -
Evaluation of *Bacteroides fragilis* as indicators of the virological quality of water.
Wat. Sci. Tech., 1986, 18, 167-73.
- 64 - **JOTHIKUMAR N., KHANNA P., PAULMURUGAN R., KAMATCHIAMMAL S. and PADMANABHAN P.** -
A simple device for the concentration and detection of enterovirus, hepatitis E virus and rotavirus from water samples by reverse transcription-polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1995, 55, 401-315.
- 65 - **KESWICK B.H., GERBA C.P., DuPONT H.L. and ROSE J.B.** -
Detection of enteric viruses in treated drinking water.
Appl. Environ. Microbiol., 1984, 47(6), 1290-94.
- 66 - **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.** -
Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 261-64.
- 67 - **KNOLLE H.** -
Transmission of poliomyelitis by drinking water and the problem of prevention.
Gesundheitswesen, 1995, 57(6), 351-54.
- 68 - **KOPECKA H., PREVOT J., GIRARD M., FUCHS F. et AYMARD M.** -
Intérêt des sondes ARNc (ribosondes) synthétisées in vitro dans la détection des entérovirus par hybridation moléculaire.
Ann. Inst. Pasteur/Virol., 1988, 139, 217-25.
- 69 - **KOPECKA H., DUBROU S., PREVOT J., MARECHAL J. and LÓPEZ-PILA J. M.** -
Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(4), 1213-19.
- 70 - **LAGARDE E., JOUSSEMET M., LATAILLADE J.J. and FABRE G.** -
Risk factors for hepatitis A infection in France : drinking tap water may be of importance.
Eur. J. Epidemiol., 1995, 11(2), 145-48.

- 71 - **LAWSON H.W., BRAUN M.M., GLASS R.I.M., STINE S.E., MONROE S.S., ATRASH H.K., LEE L.E. and ENGLENDER S.J.** -
Waterborne outbreak of Norwalk virus gastroenteritis at a southwest US resort : role of geological formations in contamination of well water.
Lancet, 1991, 337, 1200-4.
- 72 - **LECLERC H., FESTY B. et LAZAR P.** -
Connaissances actuelles de la pathologie hydrique.
Rev. Epidém. et Santé Publ., 1982, 30, 363-85.
- 73 - **LEES D.N., HENSHILWOOD K. and DORÉ W.J.** -
Development of a method for detection of enteroviruses in shellfish by PCR with poliovirus as a model.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(8), 2999-3005.
- 74 - **LE GUYADER F., DUBOIS E., MENARD D. and POMMEPUY M.** -
Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription- seminested PCR.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(10), 3665-71.
- 75 - **LEMON S.M., BINN L.N. and MARCHWICKI R.H.** -
Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell culture.
J. Clin. Microbiol., 1983, 17, 834-39.
- 76 - **LI B., CLARK H.F. and GOUVEA V.** -
Amino acid sequence of the VP7 protein of human rotavirus HCR3 to that of canine and feline rotaviruses.
J. Gen. Virol., 1994, 75, 215-19.
- 77 - **MA J.-F., NARANJO J. and GERBA C.P.** -
Evaluation of MK filters for recovery of enteroviruses from tap water.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60, 1974-77.
- 78 - **MA J.-F., GERBA C.P. and PEPPER I.L.** -
Increased sensitivity of poliovirus detection in tap water concentrates by reverse transcriptase-polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1995, 55, 295-302.
- 79 - **MATSON D.O. and ESTES M.K.** -
Impact of rotavirus infection at a large pediatric hospital.
J. Infect. Dis., 1990, 162, 598-604.
- 80 - **McCAUSTLAND K.A., BI S., PURDY M.A. and BRADLEY D.W.** -
Application of two RNA extraction methods prior to amplification of hepatitis E virus nucleic acid by the polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1991, 35, 331-42.
- 81 - **McDERMOTT J.H.** -
Virus problems and their relation to water supplies.
J. Am. Water Works Assoc., 1974, 66, 693-98.
- 82 - **MONCEYRON C. and GRINDE B.** -
Detection of hepatitis A virus in clinical and environmental samples by immunomagnetic separation and PCR.
J. Virol. Methods, 1994, 46, 157-66.

- 83 - **MOORE B.E.** -
Survival of human immunodeficiency virus (HIV), HIV-infected lymphocytes, and poliovirus in water.
Appl. Environ. Microbiol., 1993, 59(5), 1437-43.
- 84 - **MOORE N.J. and MARGOLIN A.B.** -
Efficacy of nucleic acid probes for detection of poliovirus in water disinfected by chlorine, chlorine dioxide, ozone, and UV radiation.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(11), 4189-91.
- 85 - **MORENS D.M., ZWEIGHAFT R.M., VERNON T.M., WILLIAM GARY G., ESLIEN J.J., WOOD B.T., HOLMAN R.C. and DOLIN R.** -
A waterborne outbreak of gastroenteritis with secondary person-to-person spread.
Lancet, 1979, 1, 964-6.
- 86 - **MUIR P., NICHOLSON F., JHETAM M., NEOGI S. and BANATVALA J.E.** -
Rapid diagnosis of enterovirus infection by magnetic bead extraction and polymerase chain reaction detection of enterovirus RNA in clinical samples.
J. Clin. Microbiol., 1993, 31(1), 31-38.
- 87 - **MYINT S., MANLEY R. and CUBITT D.** -
Viruses in bathing waters.
Lancet, 1994, 343, 1640-41.
- 88 - **National Rotavirus Surveillance System Laboratories. Viral Gastroenteritis Section, Respiratory and Enteric Virus Br, Div of Viral and Rickettsial Diseases, Center for Infectious Diseases, CDC**
Rotavirus surveillance - United States, 1989-1990.
MMWR, 1991, 40(5), 80-7.
- 89 - **NESTOR I., LAZAR L., IONESCU N. and SOVREA D.** -
Viral contamination of some drinking waters in Romania : a twenty years study.
J. Hyg. Epidémiol. Microbiol. Immunol., 1989, 33, 397-408.
- 90 - **ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE (O.M.S.)** -
Directives de qualité pour l'eau de boisson.
Volume 1 : recommandations, GENEVE 1985.
- 91 - **PALSONS G.** -
Development of DNA probe-based commercial assays.
J. Clin. Immunoassay, 1988, 11, 152-158.
- 92 - **PASSAGOT J., CRANCE J.M., DELOINCE R., LAVERAN H., BEYTOUT D. et FONTANGES R.** -
Concentration du virus de l'hépatite A sur des membranes de cellulose.
Water Res., 1985, 19(9), 1167-70.
- 93 - **PAYMENT P., TRUDEL M. and PLANTE R.** -
Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants.
Appl. Environ. Microbiol., 1985, 50, 1418-28.
- 94 - **PEIGUE-LAFEUILLE H., LAVERAN H., AUBERGER M., CHAMBON M., TRIMOLET M. et BEYTOUT D.**
Bilan de quatre années de dépistage des entérovirus dans les eaux usées. Corrélations avec la pathologie humaine.
Rev. Epidém. et Santé Publ., 1985, 33, 445-51.

- 95 - PEIGUE-LAFEUILLE H. -**
Virus associés aux diarrhées aiguës. Actualités en 1991.
Méd. Mal. Infect., 1991, 21, 571-77.
- 96 - POTELON J.L., FERLEY J.P., ZMIROU D. et ENTRESSANGLE S. -**
Epidémie à *Salmonella paratyphi* var. *java* dans une commune de l'Isère.
Rapport d'investigation de la DDASS Isère, 1988.
- 97 - POTELON J.L. et ZYSMAN K. -**
Dossiers d'Experts - Guide des Analyses d'Eau Potable.
Editions de "La Lettre du Cadre Territorial", Voiron, 1993.
- 98 - PUIG M., JOFRE J., LUCENA F., ALLARD A., WADELL G. and GIRONES R. -**
Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(8), 2963-70.
- 99 - REED L.J. and MUENCH H. -**
A simple method of estimating fifty per cent endpoints.
Am. J. Hyg., 1938, 27(3), 493-97.
- 100 - RICHARDSON K.J., MARGOLIN A.B. and GERBA C.P. -**
A novel method for liberating viral nucleic acid for assay of water samples with cDNA probes.
J. Virol. Methods, 1988, 22, 13-21.
- 101 - ROTBART H.A. -**
Nucleic acid detection systems for enteroviruses.
Clin. Microbiol. Rev., 4(2), 156-68.
- 102 - SANGER F., NIKLENS S. and COULSON A.R. -**
DNA sequencing with chain-termination inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1977, 74, 5463-67.
- 103 - SANTOS N. and GOUVEA V. -**
Improved method for purification of viral RNA from fecal specimens for rotavirus detection.
J. Virol. Methods, 1994, 46, 11-21.
- 104 - SARRETTE B.A., DANGLLOT C.D. and VILAGINES R. -**
A new and simple method for recuperation of enterovirus from water.
Water Res., 1977, 11, 355-58.
- 105 - SATTAR S.A., RAPHAEL R.A. and SPRINGTHORPE V.S. -**
Rotavirus survival in conventionally treated drinking water.
Canad. J. Microbiol., 1984, 30, 653-56.
- 106 - SCHIFF G.M., STEFANOVIC G.M., YOUNG E.C., SANDER D.S., PENNEKAMP J.K. and WARD R.L. -**
Studies of echovirus-12 in volunteers : determination of minimal infectious dose and the effect of previous infection on infectious dose.
J. Infect. Dis., 1984, 150(6), 858-66.

- 107- SCHWARTZBROD J., DIXNEUF P., SCHWARTZBROD L., BROCHET J.C. et FOLIGUET J.M. -**
Etude du comportement du virus poliomyélitique de type 1 dans différents milieux hydriques.
Rev. Epidém. Méd. Soc. et Santé Publ., 1975, 23, 235-52.
- 108 - SCHWARTZBROD L., BENNANI. A, DE LAVERGNE E. et SCHWARTZBROD J. -**
Détection des rotavirus dans les eaux usées par immuno-enzymologie : étude préliminaire.
Rev. Fr. Sciences Eau, 1983, 2, 145-52.
- 109- SCHWARTZBROD L., VILAGINES P.H., SCHWARTZBROD J., SARETTE B., VILAGINES R. and COLLOMB J. -**
Evaluation of the viral population in two wastewater treatment plants, study by different sampling techniques.
Water Res., 1985, 11, 1353-56.
- 110- SCHWARTZBROD L. (Coordonateur) -**
Virologie des milieux hydriques.
Lavoisier, Paris, 1991.
- 111 - SEKLA L., STACKIW W., KAY C. and VAN BUCKENHOUI L. -**
Enteric viruses in renovated water in Manitoba.
Can. J. Microbiol., 1980, 26, 518-23.
- 112 - SHAW R.D., HEMPSON S.J. and MACKOW E.R. -**
Rotavirus diarrhea is caused by nonreplicating viral particles.
J. Virol., 1995, 69(10), 5946-50.
- 113 - SHIEH Y.-S.C., WAIT D., TAI L. and SOBSEY M.D. -**
Methods to remove inhibitors in sewage and other fecal wastes for enterovirus detection by the polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1995, 54, 51-66.
- 114 - SOBSEY M.D. and JONES B.L. -**
Concentration of poliovirus from tap water using positively charged microporous filters.
Appl. Environ. Microbiol., 1979, 37, 588-95.
- 115 - STRAUB T.M., PEPPER I.L., ABBASZADEGAN M. and GERBA C.P.-**
A method to detect enteroviruses in sewage sludge-amended soil using the PCR.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(3), 1014-17.
- 116 - TAO H., CHANGAN W., ZHAOYING F., ZINYI C., XUEJIAN C., XIAOQUANG L., GUANGMU C., HENLI Y., TUNGXIN C., WEIWE Y., SHUASEN D. and WEICHENG C. -**
Waterborne outbreak of rotavirus diarrhoea in adults in China caused by a novel rotavirus.
Lancet, 1984, 1, 1139-42.
- 117 - TRICARD D. et BUFFAUT P. -**
Le rôle de la norme : le cas des eaux destinées à la consommation humaine.
Revue de Santé Publique, 1992, 5, 71-79.
- 118 - TSAI Y.-L., SOBSEY M.D., SANGERMANO L.R. and PALMER C.J. -**
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., 1993, 59(10), 3488-91.

- 119 - **TSAI Y.-L., TRAN B., SANGERMANO L.R. and PALMER C.J.** -
 Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR.
Appl. Environ. Microbiol., 1994, 60(7), 2400-07.
- 120 - **VAN der AVOORT H.G., REIMERINK J.H., RAS A., MULDER M.N. and VAN LOON A.M.** -
 Isolation of epidemic poliovirus from sewage during the 1992-3 type 3 outbreak in The Netherlands.
Epidemiol. Infect., 1995, 114(3), 481-91.
- 121 - **VAUGHN J.M., CHEN Y.S. and THOMAS M.Z.** -
 Inactivation of human and simian rotaviruses by chlorine.
Appl. Environ. Microbiol., 1986, 51, 391-94.
- 122 - **VILAGINÈS Ph., SARRETTE B., HUSSON G. and VILAGINÈS R.** -
 Glass wool for virus concentration at ambient water pH level.
Wat. Sci. Tech., 1993, 27(3-4), 299-306.
- 123- **WALTER R., MACHT W., DÜRKOP J., HECHT R., HORNIG U. and SCHULZE P.** -
 Virus levels in river waters.
Water Res., 1989, 23(2), 133-38.
- 124 - **WARD R.L., BERNSTEIN D.I., YOUNG E.C., SHERWOOD J.R., KNOWLTON D.R. and SCHIFF G.M.** -
 Human rotavirus studies in volunteers : determination of infectious dose and serological response to infection.
J. Infect. Dis., 1986, 154(5), 871-80.
- 125 - **WILDE J., EIDEN J. and YOLKEN R.** -
 Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions.
J. Clin. Microbiol., 1990, 28(6), 1300-07.
- 126 - **WILDE J., YOLKEN R., WILLOUGHBY R. and EIDEN J.** -
 Improved detection of rotavirus shedding by polymerase chain reaction.
Lancet, 1991, 337, 323-26.
- 127 - **WOODY M.A. and CLIVER D.O.** -
 Effects of temperature and host cell growth phase on replication of F-specific RNA coliphage Q beta.
Appl. Environ. Microbiol., 1995, 61(4), 1520-26.
- 128 - **YANG F. and XU X.** -
 A new method of RNA preparation for detection of hepatitis A virus in environmental samples by the polymerase chain reaction.
J. Virol. Methods, 1993, 43, 77-84.
- 129 - **YOUNG D.C. and SHARP D.G.** -
 Poliovirus aggregates and their survival in water.
Appl. Environ. Microbiol., 1977, 33(1), 168-77.
- 130 - **ZMIROU D., BALDUCCI F., FERLEY J.P. et CHARREL M.** -
 Le rythme actuel des analyses de surveillance des eaux de boisson est-il suffisant ?
Sciences de l'eau, 1987, 6, 195-207.

Références Techniques
Tampons et Solutions

REFERENCES TECHNIQUES (RF)

RF 1 : Culture des rotavirus sur cellules MA104

Ajouter 0,5 µl de trypsine (trypsine Sigma IX - solution stock à 1 mg/ml) par ml d'échantillon à inoculer.

Inoculer les cellules MA104 et laisser en contact 1 h à 37°C en agitant régulièrement.

Rejeter l'inoculum. Maintenir les cellules dans un milieu de culture MEM sans serum de veau, contenant de la trypsine à la dilution de 1/2000.

RF 2 : Capture antigénique pour l'extraction de l'ARN du VHA (62, 80)

Des tubes Eppendorf stériles de 0,5 ml sont mis en contact avec une dilution au 1/250 d'anticorps polyclonal anti-HAV en tampon bicarbonate pH 9,6. Puis les sites de fixation libres des anticorps sont bloqués avec un serum d'albumine bovine, fraction V, à 1%. Après adsorption des anticorps par la paroi, les tubes sont lavés 3 fois en tampon PBS tween, puis 100 µl de la suspension virale sont déposés à l'intérieur. Après un contact d'une nuit à +4°C, les tubes sont lavés 6 fois, séchés et 10 µl d'H₂O DEPC sont introduits à l'intérieur.

RF 3 : Purification des ARN sur la silice

A la phase supérieure provenant de l'extraction phénol-chloroforme, sont ajoutés 25 µl de silice (Sigma Réf. 5631) préparés selon la technique de BOOM (11). Après 20 min d'agitation à température ambiante, l'ARN fixé sur la silice est isolé par centrifugation pendant 15 sec. Le culot est lavé 2 fois avec un tampon de lavage, puis une fois avec de l'éthanol à 70%. Après séchage du culot, l'ARN est élué par addition de 30 à 50 µl d'H₂O DEPC et chauffage 10 min à 56°C. La solution est centrifugée et le surnageant est isolé et conservé à -75°C avant analyse.

RF 4 : Détection des produits de la PCR entérovirus en sonde froide (GEN-ETI-K®-DEIA-SORIN)

Le principe de cette détection consiste à mettre en contact l'ADNc amplifié, puis dénaturé, avec une sonde interne fixée sur les parois d'une plaque ELISA pour microtitration par l'intermédiaire d'un pont streptavidine-biotine. L'ADN piégé par la sonde est révélé par un anticorps monoclonal anti-ADN, spécifique de l'ADN double-brin. Un deuxième anticorps anti-IgG marqué à la peroxydase est alors ajouté et les échantillons positifs sont repérés par addition du substrat de l'enzyme.

RF 5 : Traitement de décontamination bactérienne des rétentats avant inoculation sur cellules

Ajouter 50 µl de chloroforme par ml de rétentat.

Vortexer 10 min.

Centrifuger 5 min à 3000 rpm.

Recueillir le surnageant et ajouter du PBS 10X (1X en solution finale) et un cocktail d'antibiotiques. Agiter.

TAMPONS ET SOLUTIONS

<u>Tampon PBS</u>	NaCl NaH ₂ PO ₄ ·12H ₂ O PO ₄ H ₂ K KCl H ₂ O distillée qsp 10 l pH 7,4	80 g 29 g 2 g 2 g
<u>Tampon guanidinium 2X</u>	isothiocyanate de guanidinium N-Lauroyl sarcosine Tris-HCl pH 8 β mercaptoéthanol	4,2 N 0,5% 25 mM 0,1 M
<u>Tampon de lyse triton 10X</u>	Triton 100X NaCl Tris-HCl pH 7,5 EDTA	0,1% 100 mM 10 mM 1 mM
<u>Tampon de lavage PBS Tween</u>	PBS Tween	0,5%
<u>Solution de lavage (immuno-capture)</u>	Tris pH 8,4 KCl MgCl ₂	20 mM 75 mM 2,5 mM
<u>Tampon 5X de l'enzyme RT-Gibco-BRL</u>	Tampon du kit prêt à l'emploi	
<u>Tampon TBE</u>	Tris borate EDTA H ₂ O qsp 1 l pH 8,0	0,9 M 20 mM
<u>SSC 20X</u>	NaCl Citrate Na ₃ H ₂ O qsp 1 l pH 7,0	175,3 g 88,23 g
<u>Tampon PNK 10X</u>	Tris pH 7,6 MgCl ₂ Dithiothreitol EDTA pH 8,0	0,5 M 0,1 M 50 mM 1 mM
<u>Tampon de pré-hybridation</u>	SSC Denhardt SDS	5X 5X 0,2%
<u>Tampon SSC-SDS</u>	SSC 2X + SDS 1%	
<u>Tampon de lavage de la silice à base d'éthanol</u>	éthanol Tris-HCl pH 7,4 EDTA NaCl	50 % 10 mM 1 mM 50 mM
<u>Tampon Taq Polymerase</u>	KCl Tris HCl pH 8,3 MgCl ₂ Gélatine	50 mM 10 mM 1,5 mM 0,01%

Abréviations

ABREVIATIONS

ARN	acide ribonucléique
DICT50	dose inhibant les cultures cellulaires à 50%
VHA	virus de l'hépatite A
ml	millilitre
l	litre
min	minute
PCR	polymerase chain reaction (réaction de polymérisation en chaîne)
µl	microlitre
µm	micromètre
rpm	round per minute (tour par minute)
H₂O DEPC	eau diéthylpyrocarbonate
DTT	dithiothreitol
RT	reverse transcription
CF11	poudre de fibres de cellulose
V/V	volume à volume
VP	viral protein
ADN	acide désoxyribonucléique
HCl	acide chlorhydrique
cDNA	acide désoxyribonucléique complémentaire
KCl	chlorure de potassium
MgCl₂	chlorure de magnésium
dNTP	désoxynucléoside triphosphate
pmol	picomole
NaOH	hydroxyde de sodium
ATP	adénosine triphosphate
h	heure
NE	non effectué
bp	bases paires
GEA	gastro-entérite aiguë
pmnl	poids moléculaire nominal limite
ARNm	acide ribonucléique messenger
ELISA	enzyme linked immuno-sorbent assay

IgG	immunoglobuline de type G
R	coefficient de conformité bactériologique
DDASS	direction départementale des affaires sanitaires et sociales
m	mètre
mm	millimètre
sec	seconde
g	gramme

Sommaire

INTRODUCTION	- 1
 PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE	
 CHAPITRE 1 :	
RISQUE VIRAL D'ORIGINE HYDRIQUE	- 2
 <u>1. LES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE ET LEUR POUVOIR PATHOGENE</u>	- 2
1. 1. ENTEROVIRUS	- 2
1. 2. VIRUS DES HEPATITES	- 3
1. 3. VIRUS DES GASTRO-ENTERITES	- 3
1. 3. 1. Rotavirus	- 3
1. 3. 2. Réovirus	- 4
1. 3. 3. Petits virus ronds (small round viruses)	- 4
1. 3. 3. 1. Virus de Norwalk	
1. 3. 3. 2. Calicivirus	
1. 3. 3. 3. Astrovirus	
1. 3. 3. 4. Parvovirus-like	
1. 3. 4. Coronavirus	- 5
1. 3. 5. Coronavirus-like virus	- 5
1. 4. ADENOVIRUS	- 5
1. 5. TABLEAU RECAPITULATIF DES PRINCIPAUX VIRUS ENTERIQUES ET DE LEURS MANIFESTATIONS PATHOLOGIQUES	- 6
1. 6. LES BACTERIOPHAGES	- 6
 <u>2. SURVIE DES VIRUS ENTERIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT</u>	- 7
2. 1. CARACTERISTIQUES STRUCTURALES FAVORISANT LA SURVIE DES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT	- 7
2. 1. 1. L'absence d'enveloppe virale	- 8
2. 1. 2. L'agrégation et l'adsorption	- 8
2. 2. FACTEURS NATURELS AFFECTANT LA SURVIE	- 8
2. 2. 1. Facteurs physiques	- 9
2. 2. 1. 1. Température	

2. 2. 1. 2. Humidité atmosphérique	
2. 2. 1. 3. Lumière	
2. 2. 2. Facteurs chimiques	- 10
2. 2. 2. 1. Effet du pH	
2. 2. 2. 2. Effet des ions	
2. 2. 2. 3. Effet de la salinité	
2. 2. 3. Facteurs biologiques	- 10
2. 3. INFLUENCE DES TRAITEMENTS DE DESINFECTION SUR L'ELIMINATION DES VIRUS	- 10
2. 3. 1. Les paramètres de la désinfection	- 11
2. 3. 2. Procédés de traitement des eaux destinées à l'alimentation humaine	- 11
2. 3. 2. 1. Procédés utilisant des produits chlorés	
2. 3. 2. 2. Autres procédés de traitement des eaux	
<u>3. LE CYCLE DE CONTAMINATION VIRALE DU MILIEU HYDRIQUE</u>	- 12
3. 1. SOURCES DE CONTAMINATION DU MILIEU HYDRIQUE	- 13
3. 2. SOURCES DE CONTAMINATION POUR L'HOMME	- 13
CHAPITRE 2 :	
PATHOLOGIE INFECTIEUSE D'ORIGINE HYDRIQUE	
<u>1. INFECTIONS NON VIRALES D'ORIGINE HYDRIQUE</u>	- 15
1. 1. BACTERIES	- 15
1. 2. PARASITES	- 16
1. 3. TOXINES	- 16
<u>2. PATHOLOGIES VIRALES ET EAU D'ALIMENTATION</u>	- 17
2. 1. EPIDEMIES VIRALES D'ORIGINE HYDRIQUE ACCIDENTELLES	- 17
2. 1. 1. Epidémies d'hépatites	- 17
2. 1. 2. Epidémies de gastro-entérites virales	- 17
2. 1. 3. Epidémies dues aux entérovirus	- 18
2. 2. MORBIDITE LIEE A LA CONTAMINATION VIRALE "ENDEMIQUE" DE L'EAU D'ALIMENTATION	- 18
2. 2. 1. Fondements	- 18

2. 2. 2. Doses infectieuses	- 19
2. 2. 3. Portage asymptomatique	- 19
2. 2. 4. Arguments épidémiologiques	- 19

<u>3. LE CADRE DE PROTECTION SANITAIRE : LES NORMES MICROBIOLOGIQUES DE L'EAU DESTINEE A LA CONSOMMATION HUMAINE</u>	- 20
---	-------------

3. 1. LE CONTEXTE REGLEMENTAIRE APPLICABLE AUX EAUX DESTINEES A LA CONSOMMATION HUMAINE	- 21
3. 1. 1. Règles sanitaires	- 21
3. 1. 2. Normes de qualité	- 21
3. 1. 3. Le suivi de la qualité	- 22
3. 1. 4. Attitude en cas de dépassement des normes	- 23
3. 2. MICROORGANISMES INDICATEURS USUELS	- 24
3. 2. 1. Principe	- 24
3. 2. 2. Caractéristiques des indicateurs	- 24
3. 2. 3. Pertinence des germes tests	- 24
3. 2. 4. Limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine	- 25
3. 2. 5. Limites des indicateurs microbiologiques	- 26

CHAPITRE 3 : DETECTION DES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE

<u>1. ECHANTILLONNAGE</u>	- 27
----------------------------------	-------------

1. 1. HETEROGENEITE VIRALE DES MILIEUX HYDRIQUES : DIFFICULTE D'ECHANTILLONNAGE	- 27
1. 2. ORGANISATION D'UNE PROCEDURE D'ECHANTILLONNAGE	- 28

<u>2. CONCENTRATION DES VIRUS DE L'EAU</u>	- 28
---	-------------

2. 1. ULTRACENTRIFUGATION	- 29
2. 2. METHODES D'ELECTROPHORESE ET D'ELECTRO-OSMOSE	- 29
2. 3. METHODES DE SEPARATION EN DEUX PHASES	- 29
2. 4. METHODES D'ADSORPTION PASSIVE	- 29
2. 5. METHODES D'ULTRAFILTRATION	- 30

2. 6. METHODES D'ADSORPTION-ELUTION	- 30
2. 6. 1. Principe	- 30
2. 6. 2. Adsorption-élution sur poudre de verre	- 31
2. 6. 3. Adsorption-élution sur filtres ou cartouches	- 31
2. 6. 4. Adsorption-élution sur laine de verre	- 31
2. 7. CONCENTRATION PAR FLOCCULATION	- 32
<u>3. MISE EN EVIDENCE DES VIRUS DU MILIEU HYDRIQUE</u>	- 33
3. 1. MICROSCOPIE ELECTRONIQUE (ME)	- 33
3. 2. CULTURE	- 33
3. 3. IMMUNOESSAIS	- 34
3. 4. TECHNIQUES D'HYBRIDATION MOLECULAIRE	- 34
3. 4. 1. Sans amplification	- 34
3. 4. 2. Polymerase Chain Reaction (PCR)	- 35
<u>4. LES INHIBITEURS DE LA DETECTION DES VIRUS</u>	- 36

PARTIE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION	- 37
---------------------	-------------

CHAPITRE 1 : ETUDE PRELIMINAIRE Concentration et mise en évidence des virus dans l'eau expérimentalement contaminée

<u>1. ECHANTILLONS ET METHODES</u>	- 39
1. 1. DEFINITIONS	- 39
1. 2. ECHANTILLONS D'EAU	- 39
1. 3. CONCENTRATION DES ECHANTILLONS	- 40
1. 3. 1. Première concentration : ultrafiltration tangentielle (Minitan®)	- 40
1. 3. 2. Deuxième concentration	- 42
1. 3. 2. 1. Ultracentrifugation	
1. 3. 2. 2. Ultrafiltration (Centriprep®)	
1. 4. MISE EN EVIDENCE DES VIRUS SUR CULTURE CELLULAIRE	- 42

1. 5. DETECTION DES GENOMES VIRAUX PAR REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE (PCR)	- 44
1. 5. 1. Extraction des acides nucléiques	- 44
1. 5. 1. 1. Méthode I : Extraction isothiocyanate de guanidinium/ phénol/chloroforme	
1. 5. 1. 2. Méthode II : Extraction avec la protéinase K	
1. 5. 1. 3. Méthode III : Traitement avec un tampon de lyse	
1. 5. 1. 4. Méthode IV : Traitement par un simple chauffage	
1. 5. 1. 5. Méthode V : Extraction type méthode I couplée à une purification sur le CF11 cellulose	
1. 5. 2. Reverse transcription (RT)	- 45
1. 5. 3. Amplification par polymérase chain reaction (PCR)	- 46
1. 5. 3. 1. Amorces	
1. 5. 3. 2. Technique	
1. 5. 4. Révélation et caractérisation du produit de la PCR	- 47
1. 5. 4. 1. Révélation : électrophorèse et Southern blot	
1. 5. 4. 2. Caractérisation : hybridation avec une sonde chaude marquée au ³² P	
 <u>2. RESULTATS</u>	 - 50
 2. 1. ECHANTILLONS D'EAU MONOCONTAMINES	 - 50
2. 1. 1. Culture cellulaire	- 50
2. 1. 2. PCR	- 50
2. 2. ECHANTILLONS D'EAU POLYCONTAMINES	- 52
 <u>3. CONCLUSIONS</u>	 - 54
 CHAPITRE 2 :	
ETUDE APPLIQUEE	
Approche de la contamination virale des eaux d'alimentation en région dauphinoise et de son impact sanitaire	
 <u>1. ECHANTILLONS ET METHODES</u>	 - 55
 1. 1. ANALYSE DES PRELEVEMENTS D'EAU	 - 55
1. 1. 1. Echantillons d'eau	- 55
1. 1. 1. 1. Taille de l'échantillon	
1. 1. 1. 2. Mode de sélection des prélèvements	

1. 1. 1. 3. Échantillons témoins	
1. 1. 2. Concentration des prélèvements	- 56
1. 1. 3. PCR	- 57
1. 1. 3. 1. Extraction des acides nucléiques viraux	
1. 1. 3. 2. RT-PCR, détection et caractérisation	
1. 1. 4. Analyse bactériologique de l'eau	- 60
1. 1. 4. 1. Technique	
1. 1. 4. 2. Coefficient de qualité microbiologique des eaux	
1. 1. 5. Etude climatologique	- 61
1. 2. ETUDE DE L'IMPACT SANITAIRE	- 61
1. 2. 1. Enquête cas-témoins	- 61
1. 2. 1. 1. Population	
1. 2. 1. 2. Dépistage des cas	
1. 2. 1. 3. Recueil de l'information : le questionnaire	
1. 2. 1. 4. Qualité bactériologique des eaux d'alimentation	
1. 2. 1. 5. Méthode d'analyse	
1. 2. 2. Etude de la similitude rotavirus selles/rotavirus eaux	- 63
1. 2. 2. 1. Extraction de l'ARN viral des selles "rotavirus positif"	
1. 2. 2. 2. Amplification	
1. 2. 2. 3. Analyse des produits amplifiés par séquençage	
<u>2. RESULTATS</u>	- 64
2. 1. QUALITE MICROBIOLOGIQUE DE L'EAU	- 64
2. 1. 1. Série de prélèvements Printemps 1993	- 64
2. 1. 1. 1. Résultats de la culture sur cellules	
2. 1. 1. 2. Résultats de la RT-PCR	
2. 1. 1. 3. Caractéristiques de l'échantillon entérovirus positif	
2. 1. 1. 4. Résultats bactériologiques	
2. 1. 1. 5. Tableau récapitulatif des 5 prélèvements contaminés par des bactéries ou des virus	
2. 1. 1. 6. Données climatologiques	
2. 1. 2. Série de prélèvements hiver 1994	- 67
2. 1. 2. 1. Résultats de la recherche des rotavirus	
2. 1. 2. 2. Résultats de la recherche des entérovirus	
2. 1. 2. 3. Résultats bactériologiques	
2. 1. 2. 4. Tableau récapitulatif des 9 prélèvements contaminés par des bactéries ou des virus	
2. 1. 2. 5. Données climatologiques	

2. 1. 3. Témoins	- 70
2. 2. ETUDE DE LA RELATION ENTRE LES GEA INFANTILES A ROTAVIRUS ET LA QUALITE DE L'EAU DESSERVIE	- 71
2. 2. 1. Résultats de l'enquête cas-témoins	- 71
2. 2. 1. 1. Recrutement des cas et des témoins	
2. 2. 1. 2. Répartition spatio-temporelle des cas	
2. 2. 1. 3. Description des cas et des témoins	
2. 2. 1. 4. Risque de GEA à rotavirus en fonction du type d'eau d'alimentation	
2. 2. 2. Résultat de l'analyse par séquençage des souches de rotavirus isolées dans les selles et dans l'eau	- 75
CHAPITRE 3 :	
DISCUSSION	
<u>1. CONSIDERATIONS TECHNOLOGIQUES</u>	- 77
1. 1. DE LA DIFFICULTE A DETECTER LES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT	- 77
1. 2. TAILLE DU PRELEVEMENT	- 78
1. 3. ULTRAFILTRATION : DE LA SUSPENSION VIRALE AU RETENTAT	- 79
1. 4. UNE TECHNIQUE MODERNE POUR LA DETECTION DES VIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT : LA PCR	- 80
1. 5. LE PROBLEME DES INHIBITEURS	- 82
1. 6. PERSPECTIVES TECHNOLOGIQUES	- 83
<u>2. CONSIDERATIONS SANITAIRES</u>	- 84
2. 1. FREQUENCE DE LA CONTAMINATION VIRALE DE L'EAU D'ALIMENTATION	- 84
2. 2. CARACTERE SAISONNIER DES CONTAMINATIONS VIRALES DU MILIEU HYDRIQUE	- 85
2. 3. IMPLICATION DE L'EAU D'ALIMENTATION DANS LES EPIDEMIES A VIRUS ENTERIQUES	- 86
2. 4. LE RISQUE DE GEA INFANTILE A ROTAVIRUS EST-IL LIE A LA CONSOMMATION D'EAU NON CONFORME AUX EXIGENCES REGLEMENTAIRES MICROBIOLOGIQUES ?	- 87

2. 5. CORRELATION ENTRE LA CONTAMINATION BACTERIENNE ET LA CONTAMINATION VIRALE	- 89
2. 6. LA FAIBLESSE DES TRAITEMENTS DE POTABILISATION	- 89
2. 7. QUEL EST LE RISQUE SANITAIRE LIE A UN RESULTAT POSITIF DE LA PCR ROTAVIRUS OU ENTEROVIRUS ?	- 90
2. 7. 1. Aspect quantitatif	- 90
2. 7. 2. Aspect qualitatif	- 91
2. 8. LA DIFFICULTE EPIDEMIOLOGIQUE PROPRE AU DEPARTEMENT DE L'ISERE	- 92
2. 9. INSUFFISANCE DES GERMES TESTS BACTERIENS ; QUELLES PERSPECTIVES ?	- 93
<u>3. CONCLUSION</u>	- 94
 <i>CONCLUSION</i>	- 95
 <i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	- 97
 <i>REFERENCES TECHNIQUES - TAMPONS ET SOLUTIONS</i>	- 108
 <i>ABREVIATIONS</i>	- 111
 <i>SOMMAIRE</i>	- 113
 <i>ANNEXES</i>	



Annexes

ANNEXE n°1

Communications par affiches dans différents congrès
sur le thème
"Microbiologie de l'environnement"

IXth INTERNATIONAL CONGRESS OF VIROLOGY GLASGOW 8 - 13 AUGUST 1993



ABSTRACT FORM

Instructions

Type within the blue lines:
Authors' names (up to 6),
Institution, Address. Underline
name of presenter. If more than
6 authors, type *et al.*

Use black ink for handwritten
symbols.

NB Your abstract will be printed
in the book of Abstracts exactly
as typed — no corrections can
be made. Submit this original
form **plus four copies**.
See reverse side for a sample
abstract.

Please choose from the Topics
1- 79 listed on reverse side:

First choice Topic

Second choice Topic

Tick preferred presentation:

Oral Poster

COMPARISON BETWEEN CELL CULTURE AND PCR FOR RECOVERING ENTERIC VIRUSES FROM ENVIRONMENTAL WATER

Genoulaz O (1), Gratacap B (1), Soule H (1), Levêque F (2),
Deloince R (2), Seigneurin JM (1).

(1) Laboratoire de Virologie Médicale Moléculaire, Faculté de
médecine and (2) CRSSA, Grenoble, France.

The application of PCR for detection of Human Enteric Viruses
in environmental samples has been investigated.

We performed the assay in experimentally contaminated
samples containing sequential dilutions of poliovirus type 1 or
rotavirus in distilled water (2 liters). All assays were performed
using a polysulfonate membrane of 100.000 molecular weight
limit. A second step of concentration was performed for PCR
investigation. Selected primers were chosen in the 5' NC
region for poliovirus and in gene 9 for rotavirus. Hepatitis A
virus PCR was also performed (primers in the VP3 to VP1
regions).

For recovering poliovirus, PCR could detect as few as
0.001 TCID 50 of virus (10 to 100 TCID 50 for cell culture). By
contrast, the single round PCR for rotavirus had a sensitivity
similar to that of cell culture. For HAV, an immunoaffinity step
improved the level of sensitivity (0.01 TCID 50).

Thus, this ultrafiltration system associated with RNA
amplification technique can be used to specifically detect and
analyse viral nucleic acids in environmental water.

PRESENTING AUTHOR

Please print in **BLOCK CAPITALS**

Title (Prof., Dr., Mr., Ms. etc.)Ms.....

Family NameGENOULAZ..... First Name & InitialsOdile.....

InstitutionLaboratoire de Virologie - Faculté de Médecine -.....

Street/P.O. BoxDomaine de La Merci.....

City LA.TRONCHE..... Postcode38706..... CountryFRANCE....

Telephone.....(33) 76 63 71 00..... Fax(33) 76 54 80 74.....

Mail this completed form and 4 photocopies
together with the registration form to:

ICV 93 Registration Secretariat
CEP Consultants Ltd
26-28 Albany Street
Edinburgh EH1 3QH
SCOTLAND, UK

For office use

ABSTRACTS MUST BE RECEIVED BY 15TH FEBRUARY 1993

The logo of the Société Française de Microbiologie (SFMM) is located at the top center of the page. It consists of the letters 'SFMM' in a stylized, bold font, enclosed within a circular border. The entire page is framed by a decorative border with ornate scrollwork at the corners and arrows pointing inward along the sides.

Société Française de Microbiologie

28, rue du Docteur Roux - 75724 Paris Cedex 15
45.68.81.79

*Section
d'Ecologie Microbienne*

**COLLOQUE
DES 7 ET 8 DECEMBRE 1994**

C.I.S.
Institut Pasteur, Paris

LE POINT SUR LA MICROBIOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT

*

Programme et résumés des communications et affiches

DETECTION DES VIRUS PAR PCR DANS L'EAU : IMPORTANCE D'UNE PURIFICATION DES ACIDES NUCLEIQUES

O. GENOULAZ¹, X.-J. LIU^{1,2}, H. SOULE¹, B. GRATACAP-
CAVALLIER¹, F. LEVEQUE³, J.-M. SEIGNEURIN¹

¹Laboratoire de Virologie Médicale Moléculaire, Faculté de
Médecine, Grenoble, ²Department of microbiology, Second
Medical University of Shanghai, People's Republic of China,
³CRSSA, Grenoble.

La PCR est sensible à différents types d'inhibiteurs, dont l'acide humique. Or l'acide humique est largement retrouvé dans les eaux. Par conséquent, une purification des ARN viraux extraits d'échantillons d'eau s'impose avant leur amplification.

Des concentrations variables d'acide humique préparées dans l'eau distillée (1 mg/ml à 10 ng/ml) ont été mises en présence d'une dose fixe de virus ou d'un mélange de virus (poliovirus vaccinal type 1, virus de l'hépatite A, rotavirus). Des essais ont été répétés en faisant varier la dose virale de 10^3 à 1 DICT50. Pour chaque échantillon, 2 techniques d'extraction ont été testées en parallèle : l'une classique par le guanidinium/phénol/chloroforme et l'autre avec en plus une purification par la silice. La synthèse des ADN complémentaires a été réalisée à l'aide d'amorces spécifiques de chaque type de virus ou de mélanges d'hexamères. Nous avons montré qu'au delà de 100 µg/ml, l'acide humique inhibe la RT.PCR des 3 virus testés, pour les deux méthodes d'extraction utilisées. Une concentration inférieure ou égale à 10 µg/ml n'a pas d'effet inhibiteur, quelle que soit la méthode d'extraction utilisée. Lorsque la concentration d'acide humique est comprise entre 10 et 100 µg/ml, et quelle que soit la dose virale et le virus testé, il y a inhibition de la RT.PCR lorsque les échantillons sont traités par la méthode classique. Alors qu'il n'y a pas d'inhibition pour les échantillons purifiés sur silice.

La technique de purification sur silice et l'utilisation des mélanges d'hexamères nous ont permis de détecter les contaminations virales mixtes d'échantillons modérément chargés en acide humique. Cette technologie peut donc être utilisée dans la surveillance épidémiologique de l'environnement.



SFM

Société Française de Microbiologie

28, rue du Docteur Roux - 75724 Paris Cedex 15
45.68.81.79

*Section
d'Ecologie Microbienne*

**COLLOQUE
DES 7 ET 8 DECEMBRE 1994**

C.I.S.
Institut Pasteur, Paris

**LE POINT SUR
LA MICROBIOLOGIE
DE
L'ENVIRONNEMENT**

*

Programme et résumés des communications et affiches

DETECTION DE ROTAVIRUS PAR PCR DANS L'EAU D'ALIMENTATION

B. GRATACAP-CAVALLIER¹, H. SOULE¹, O. GENOULAZ¹, P. CHEVALLIER², M.-C. BOUVIER², J.-M. SEIGNEURIN¹

¹Laboratoire de Virologie Médicale Moléculaire, Faculté de Médecine, Grenoble, ²Laboratoire Régionale d'Analyse des Eaux, Faculté de Médecine, Grenoble.

Les rotavirus sont rejetés en très grande quantité dans les selles de sujets contaminés, et sont très résistants dans l'environnement. Leur présence dans les eaux usées et l'inefficacité sur les rotavirus de certains traitements de potabilisation des eaux laissent penser que l'eau d'alimentation peut être une voie de contamination.

L'objectif de ce travail était de rechercher, par la technique de polymérase chain reaction (PCR), des rotavirus dans les eaux consommées par des enfants atteints de gastro-entérite aiguë (GEA) à rotavirus. Pour cela, la provenance géographique des enfants âgés de moins de 5 ans, hospitalisés pour une GEA à rotavirus, a été étudiée dans le département de l'Isère au cours de l'hiver 1993/1994. 80 prélèvements de 2 litres d'eau du réseau public ont été effectués à proximité du domicile de ces enfants, puis concentrés 4000 fois par ultrafiltration tangentielle en deux temps. Une extraction avec le guanidinium et le phénol-chloroforme, suivie d'une purification des ARN par la silice, a été effectuée. Les acides nucléiques viraux ont été mis en évidence par RT-semi-nested-PCR.

Seuls des cas sporadiques de GEA infantiles à rotavirus ont été observés. Aucune véritable épidémie n'a été décelée au cours de ce travail. Quatre prélèvements d'eau ont donné un résultat positif après RT-semi-nested-PCR : ils étaient conformes aux normes bactériologiques. Par contre 6 autres prélèvements contenaient des bactéries, mais pas de rotavirus.

L'absence de germes-tests dans une eau d'alimentation ne peut sans doute pas garantir son innocuité virale. Si les moyens analytiques faisaient défaut jusqu'à présent, on peut désormais envisager l'utilisation de la PCR comme outil ultra-sensible pour l'analyse virologique des eaux.

4ème CONGRES DE LA SFM
Tours, 2-5 MAI 1995

PALAIS DES CONGRES LE VINCI - TOURS

Proposition de Communication

Date limite d'envoi à la SFM : 31 Janvier 1995

LE THEME DE LA COMMUNICATION EST RATTACHE A :

Section n°.....9.....(compléter par n° 1 à 9)

ou

Colloque Parallèle n°.....(compléter par n° CP1 à CP18)

Rotavirus et environnement :

intérêt de la PCR et du séquençage nucléotidique
GENOULAZ O, SOULE H, GRATACAP B*, INNOCENTI P,
MALLARET MR, FRANCOIS P, BOST M, POTELON JL,
CHEVALLIER P, SEIGNEURIN JM.

Laboratoire de Virologie, Faculté de médecine de Grenoble.
Domaine de la Merci, 38700 LA TRONCHE.

La transmission des Rotavirus (RV) est classiquement directe, fécale-orale, de personne à personne. La transmission indirecte par l'eau, l'air, ou les surfaces environnementales est mal connue mais probablement très importante. **Deux études sur ce thème** ont débuté en 1993 au Laboratoire de Virologie du CHU de Grenoble.

La première a pour objectif de mettre en évidence le rôle éventuel de l'eau de boisson dans la transmission des RV. Dans ce but nous avons établi une surveillance géographique de l'origine des cas de gastroentérites à RV hospitalisés dans 3 centres hospitaliers de la région (Grenoble-Voiron-Romans).

80 échantillons de 2 litres d'eau du réseau de distribution ont été prélevés près du domicile des enfants. Ils ont été concentrés 4000 fois. La présence d'ARN de RV a été recherchée par "semi nested" RT-PCR (amplification de 392 paires de bases dans la région 5'): 4 prélèvements se sont révélés positifs. Le séquençage nucléotidique de ces souches est en cours.

La 2ème étude concerne la transmission nosocomiale du virus. Ce travail a été réalisé au cours de l'hiver 1993-94 dans les 2 unités de maladies infectieuses pédiatriques du CHU de Grenoble.

80 prélèvements ont été réalisés : téléphones, tapis de jeu, table de soins, poignées de portes, matériel médical, mains d'infirmières, thermomètres, lavabos... Tous les prélèvements ont été testés en RT-PCR: 37,5 % des prélèvements étaient positifs : 57% (8/14) pour l'intérieur des chambres et 38% (20/52) à l'extérieur. Les surfaces les plus infectées sont celles qui sont directement en contact avec l'enfant: matériel médical, tapis de jeu, table de soins.

5 cas nosocomiaux ont été notés pendant la durée de l'étude. Des études de séquençage sont en cours pour essayer de préciser la "diffusion environnementale" d'une souche virale donnée infectant un enfant donné.

Mots-clés (Maximum 3)..... ROTAVIRUS, ENVIRONNEMENT, PCR.....

Survie du virus de l'hépatite A dans l'eau de mer et détection de l'ARN viral par RT-PCR

AT5-6

¹Françoise Lévêque, ²Jean-Marc Crance, ²Alain Jouan, ³Louis Schwartzbrod et ²Robert Deloince

1-Délégation Générale de l'Armement, Direction des Recherches et Technologies, Paris
2-Centre de Recherches du Service de Santé des Armées, Unité de Virologie, La Tronche,
3-Faculté des Sciences Biologiques et Pharmaceutiques, Laboratoire de Virologie, Nancy

La survie du virus de l'hépatite A en eau de mer reconstituée stérile a été étudiée à différentes salinités (14 g/l, 24 g/l et 33 g/l) et températures (4°C, 19°C et 25°C) sur une période de 3 mois avec une concentration initiale virale de 10⁵ doses infectieuses par ml. La présence de virus infectieux est mise en évidence par infection de cellules hépatiques en culture. L'ARN viral est détecté par transcription réverse en ADN complémentaire et amplification d'un fragment d'ADN par réaction de polymérisation en chaîne (RT-PCR) après immunocapture des particules virales.

Les résultats montrent l'absence d'influence de la salinité sur le comportement aux différentes températures. A 4°C, le titre infectieux reste stable pendant les trois mois d'incubation. A 19°C, le titre baisse d'un facteur 1000. Le virus infectieux est détecté à la fin de la période d'incubation. A 25°C, l'inactivation virale est totale dans les conditions expérimentales après 60 jours d'incubation.

L'ARN viral a été recherché dans tous les échantillons. Une immunocapture préalable est rendue nécessaire du fait de l'inhibition des enzymes de RT-PCR par les sels d'eau de mer. Le fragment génomique amplifié correspond à la région VP1-VP3. Une seule amplification par PCR de 40 cycles est réalisée. Le fragment amplifié est révélé par visualisation en lumière UV après électrophorèse sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium. Le fragment attendu est facilement détecté dans tous les échantillons. L'ARN viral peut donc être détecté après la perte du caractère infectieux des particules virales et la poursuite de leur incubation pendant 30 jours.

Nos résultats montrent que dans certaines conditions en eau de mer reconstituée, la perte du caractère infectieux du virus et l'incubation prolongée des particules virales non infectieuses n'empêche pas la détection d'ARN viral par RT-PCR. Cette conclusion renforce l'idée que les résultats de détection par PCR d'agents biologiques dans l'environnement doivent être analysés avec prudence. Ces études comparatives de survie dans l'environnement des agents infectieux et la détection de leurs acides nucléiques doivent être approfondies afin de déterminer la validité des techniques de biologie moléculaire pour l'évaluation des risques sanitaires dans l'environnement.

EVOLUTION, NOMENCLATURE ACTUELLE ET DIAGNOSTIC BACTERIOLOGIQUE DES *Pasteurellaceae*

F. ESCANDE*

*Laboratoire des *Pasteurella*, C.I.P., Institut Pasteur, Paris.

La famille des *Pasteurellaceae* regroupe 3 genres bactériens: *Pasteurella*, *Actinobacillus* et *Haemophilus*. A l'exception de nombreuses espèces d'*Haemophilus* et de quelques *Pasteurella* spp., qui nécessitent des facteurs de croissance (X et V), ces bactéries se développent sur des milieux ordinaires; toutefois l'apport de certains substrats (extrait globulaire, sang, sérum) favorisent leur croissance, surtout en primoculture.

De nombreux travaux, basés sur des études phénotypiques, puis génétiques (comparaison des séquences ARNr 16S, hybridations ADN-ADN, contenu en G+C%) ont grandement contribué à "l'évolution taxonomique" de ces trois genres au cours de ces dernières années.

De nombreuses espèces ont été soit transférées d'un genre à un autre, soit exclues de leur propre genre ou en attente d'une classification, soit nommées comme nouvelle espèce ou sous-espèce, ou nouveau genre.

Le genre *Pasteurella* regroupe actuellement 20 espèces (11 espèces *sensu stricto*) dont certaines sont exclusivement isolées chez l'homme ou l'animal.

Quelques caractères "clef" permettent de différencier ces genres bactériens.

Rotavirus et eaux :

AT5-7

Intérêt de la PCR et du séquençage nucléotidique
GENOULAZ O, SOULE H, GRATACAP B*, INNOCENTI P, MALLARET MR, FRANCOIS P, BOST M, POTELON JL, CHEVALLIER P, SEIGNEURIN JM.
Laboratoire de Virologie, Faculté de médecine de Grenoble.
Domaine de la Merci, 38700 LA TRONCHE.

La transmission des Rotavirus (RV) est classiquement directe, fécale-orale, de personne à personne. La transmission indirecte par l'eau, l'air, ou les surfaces environnementales est mal connue mais probablement très importante. Jusqu'à présent les moyens disponibles pour rechercher les RV dans l'environnement étaient très limités; le développement des techniques de biologie moléculaire permet une nouvelle approche de la question.

Afin d'apprécier le rôle éventuel de l'eau de boisson dans la transmission des RV, une étude a été mise en place en région grenobloise, durant l'hiver 1993-1994. Pour cela, nous avons établi une surveillance géographique de l'origine des cas de gastroentérites à RV hospitalisés dans 3 centres hospitaliers de la région (Grenoble-Voiron-Romans).

80 échantillons de 2 litres d'eau du réseau de distribution ont été prélevés près du domicile des enfants. Ils ont été concentrés 4000 fois. La présence d'ARN de RV a été recherchée par "semi-nesté" RT-PCR (amplification de 392 paires de bases dans la région 5'). Les prélèvements se sont révélés positifs. Ce résultat est d'autant plus intéressant qu'il s'agissait d'eaux bactériologiquement conformes.

Afin de préciser l'origine de la contamination hydrique, une étude par séquençage a été entreprise, d'une part sur les prélèvements d'eaux positifs, d'autre part sur les selles des enfants demeurant dans le secteur géographique correspondant. L'identité entre les virus trouvés dans l'eau et ceux infectant les enfants n'est actuellement pas prouvée.

AT7-2

LE POINT SUR LES BACTERIES APPARENTÉES

C. LION*

*Laboratoire de Bactériologie, C. H. U., Nancy.

On regroupe sous l'appellation de "bactéries" apparentées aux *Pasteurella* un ensemble hétérogène ayant en commun d'être, comme les *Pasteurella*, de petits bacilles à Gram négatif, et d'avoir le même habitat: la salive et l'oropharynx des animaux. Pour cette raison, elles sont susceptibles de contaminer les plaies par morsures et d'être transmises à l'homme par léchage, griffade, ou simple contact avec les animaux.

Très différentes des *Pasteurella* sur le plan génétique, elles ont longtemps été connues, selon la désignation du CDC d'Atlanta, sous les noms de EF-4 (Eugonic Fermenter 4), DF-2 (Dysgonic Fermenter 2), M-5 et II-J. Les techniques récentes de biologie moléculaire ont permis de classer certaines d'entre elles dans des genres déjà existants ou nouvellement créés. C'est ainsi que M-5 a été classée dans le genre *Neisseria* (*N. weaveri*); DF-2 a été reconnu comme une nouvelle espèce du genre *Capnocytophaga* sous le nom de *C. canimorsus*, cependant que DF-2 like, espèce très proche, est nommée *C. cynodegmi*. II-J appartient maintenant au genre *Weeksella* sous le nom d'espèce *W. zoohelcum*.

Chez l'homme, le pouvoir pathogène de ces bactéries (rarement isolées en culture pure) reste difficile à cerner. Elles sont généralement impliquées dans des infections de plaie consécutives à des morsures ou griffades par des chiens ou des chats. Les infections systémiques sont exceptionnelles; seule *C. canimorsus* a un pouvoir pathogène bien établi: elle est responsable de septicémies parfois foudroyantes et de méningites chez les sujets immunodéprimés (en particulier splénectomisés et éthyliques), mais également chez des patients sans facteurs de risque. Exceptionnellement, cette espèce est isolée à partir d'infections oculaires.

Rotavirus et environnement : intérêt de la PCR et du séquençage nucléotidique

GENOULAZ Odile*, SOULE Hervé*, GRATACAP-CAVALLIER Bénédicte*, INNOCENTI Patricia*, MALLARET Marie-Reine**, FRANCOIS Patrice***, BOST Michel***, POTELON Jean Luc**, CHEVALLIER Pénine*** et SEIGNEURIN Jean Marie*
* Laboratoire de Virologie Médicale Moléculaire, ** Laboratoire Régional de Contrôle des Eaux, Faculté de Médecine, Grenoble, *** Unité d'Hygiène Hospitalière, **** Département de Pédiatrie, CHU Grenoble, ** Service Santé Environnement, DDASS Isère

INTRODUCTION

Les Rotavirus (RV) sont responsables de la moitié des gastro-entérites entraînant une hospitalisation chez les enfants de moins de 2 ans. Leur transmission est classiquement directe, fécale-orale, de personne à personne. La transmission indirecte par l'eau, l'air ou les surfaces environnementales est mal connue, mais probablement très importante. En effet, les RV sont sécrétés en très grande quantité dans les selles des sujets infectés, et ils sont très résistants dans le milieu extérieur et leur dose infectieuse minimale est très faible. Jusqu'à présent, les moyens disponibles pour détecter les RV dans l'environnement étaient très limités. Le développement de techniques ultra-sensibles de biologie moléculaire permet une nouvelle approche de la question.

Peut-on retrouver des rotavirus dans l'eau de boisson?

Mettre en évidence le rôle éventuel de l'eau de boisson dans la transmission des rotavirus

* Surveillance de l'origine géographique des cas de gastro-entérites aiguës à RV hospitalisés dans 3 centres hospitaliers de la région (Grenoble, Voiron, Romans) du 03/01/94 au 10/03/94

* 80 échantillons de 2 litres d'eau du réseau de distribution, prélevés à proximité du domicile des enfants. (concentrés 4000 fois)

La présence d'ARN de RV a été recherchée par RT-PCR.

Les prélèvements positifs ont été analysés par séquençage ou en polymorphisme de restriction (RFLP) pour tester la similarité entre :

- * les virus trouvés dans l'eau et ceux infectant les enfants
- * les virus trouvés sur les surfaces et ceux des enfants ayant contracté le RV durant leur séjour à l'hôpital.

* 4 prélèvements d'eau de boisson sur 80 détectés positifs en PCR rotavirus (prélèvements bactériologiquement conformes)

* Pas de RV identiques dans les selles des 4 enfants hospitalisés desservis par les réseaux correspondants

Cette étude a permis de montrer que des rotavirus humains ou animaux pouvaient être présents dans des eaux d'alimentation bactériologiquement conformes. Les souches détectées constituent un risque éventuel pour l'homme. En effet, la dérive antigénique des rotavirus à partir d'un ancêtre commun peut expliquer les passages inter-espèces. L'absence de germes tests dans une eau d'alimentation ne peut donc pas garantir de son innocuité virale.

En conclusion, la performance des nouvelles technologies (grande sensibilité de la PCR, génotypage possible par séquençage) ouvre des perspectives très intéressantes dans l'épidémiologie virale en général et tout particulièrement dans l'appréciation du risque nosocomial lié à l'environnement.

L'infection nosocomiale en pédiatrie : bien détecter, les surfaces contaminées pour bien prévenir

OBJECTIFS

Evaluer la contamination virale de prélèvements environnementaux effectués dans un service de pédiatrie en période épidémique

MATERIEL

* 80 prélèvements :

- 66 prélèvements de surfaces :

- 14 à l'intérieur des chambres d'enfants * rotavirus + * (thermomètres, lavabos, poignées de porte ...)
- 52 à l'extérieur des chambres d'enfants * rotavirus + * (téléphones, poignées de porte, matériel médical, mains ...)

- 14 prélèvements d'eau de nettoyage des sols

METHODE

RESULTATS

37,5% de prélèvements positifs en PCR rotavirus

* **Variation selon le lieu de prélèvement :**

- 57,5% des prélèvements faits à l'intérieur des chambres positifs
- 38% des prélèvements faits à l'extérieur des chambres positifs

* **Variations selon la période de l'étude :**

- 47,5% de prélèvements positifs au moment du pic épidémique
- 27,5% de prélèvements positifs lors de l'extinction de l'épidémie

* **Variations selon le type de prélèvements :**

- Les surfaces le plus fréquemment contaminées sont celles qui sont directement en contact avec l'enfant : matériel médical, tapis de jeu, tables de soins, ainsi que les poignées de porte.

Profils de restriction du gène VP7 amplifié par PCR Beg9-End9 pour 11 prélèvements positifs

CONCLUSION

Ce travail a permis une meilleure connaissance du risque nosocomial lié à l'environnement et a abouti à la mise en place de mesures pratiques de prévention des gastro-entérites aiguës à rotavirus.

ANNEXE n°2

LE CODE GENETIQUE

Correspondance entre un codon de trois bases nucléotidiques et un acide aminé

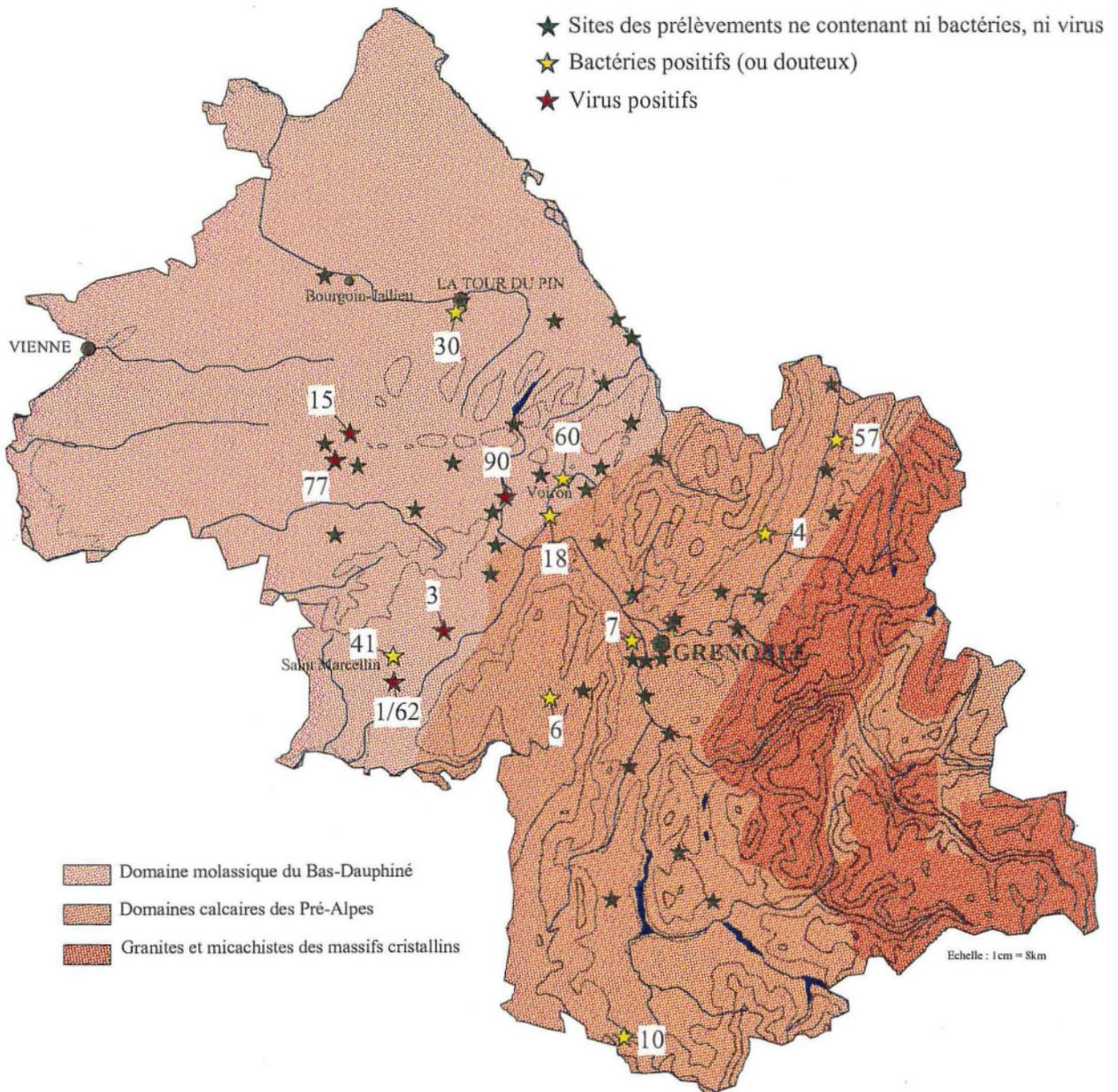
		B A S E 2			
		U	C	A	G
B A S E 1	U	UUU Phénylalanine UUC Phe = F	UCU UCC UCA UCG Sérine Ser = S	UAU Tyrosine UAC Tyr = Y	UGU Cystéine UGC Cys = C
		UUA Leucine UUG Leu = L		UAA arrêt lecture UAG TERM	UGA TERM UGG Tryptophane Trp = W
	C	CUU Leucine CUC	CCU Proline CCC	CAU Histidine CAC His = H	CGU Arginine CGC
		CUA Leu = L CUG	CCA Pro = P CCG	CAA Glutamine CAG Gln = Q	CGA Arg = R CGG
A	AUU Isoleucine AUC Ile = I AUA	ACU Thréonine ACC	AAU Asparagine AAC Asn = N	AGU Sérine AGC Ser = S	
	AUG Méthionine Met = M	ACA Thr = T ACG	AAA Lysine AAG Lys = K	AGA Arginine AGG Arg = R	
G	GUU Valine GUC Val = V GUA GUG	GCU Alanine GCC Ala = A GCA GCG	GAU Aspartate GAC Asp = D	GGU Glycine GGC Gly = G GGA GGG	
			GAA Glutamate GAG Glu = E		

ANNEXE n°3

Situation géographique des prélèvements d'eau d'alimentation
contaminés par des bactéries ou des virus.
(Isère - 1993-1994)

NB Bactéries positifs (ou douteux) signifie que le prélèvement 1, série de prélèvements printemps 1993, était douteux à l'analyse bactériologique.

**Situation géographique des
prélèvements d'eau d'alimentation
contaminés par des bactéries ou des virus.
(Isère - 1993-1994)**



NOM Prénom	SOULE Hervé
TITRE DU MEMOIRE	Apport de la biologie moléculaire pour une approche analytique et sanitaire de la contamination virale de l'eau d'alimentation dans le département de l'Isère.
NATURE DU MEMOIRE	Mémoire du D.E.S. de "Pharmacie Spécialisée" tenant lieu de thèse de Docteur en Pharmacie GRENOBLE, 1996.
RESUME	<p>Les virus entériques abondent dans le milieu hydrique. Souvent plus résistants que les germes tests bactériens, ils sont pourtant peu pris en compte dans le suivi de la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine, en raison des difficultés analytiques pour les détecter. Leur impact sanitaire est donc mal connu et probablement sous-estimé. L'objectif de ce travail a été la mise au point préliminaire et la validation dans une étude de terrain de techniques de biologie moléculaire pour l'analyse virologique de l'eau. Dans les essais préliminaires, 2 l d'eau contaminée avec un virus, poliovirus, rotavirus ou virus de l'hépatite A (ou un mélange des 3 virus) ont été concentrés en 2 étapes par ultrafiltration et ultracentrifugation. Puis, les virus ont été détectés par PCR et culture.</p> <p>L'étude appliquée a porté sur la recherche d'entérovirus et de rotavirus dans 91 échantillons d'eau d'alimentation prélevés dans le département de l'Isère de mai à mars 1994. Une enquête cas-témoins, menée en parallèle, a testé le facteur de "eau d'alimentation" dans le déclenchement des GEA à rotavirus dans une population d'enfants hospitalisés pour cette pathologie, durant la même période. Une concentration virale inférieure ou égale à 1 DICT50/l a toujours été détectée par PCR, après ultrafiltration, quel que soit le virus étudié, seul ou en mélange. Sur 91 échantillons d'eau sur 91 ont donné un résultat positif à la PCR : 4 pour les rotavirus et 87 pour les entérovirus. Ces prélevements étaient conformes aux exigences bactériologiques réglementaires. 4 sur 5 faisaient suite à des épisodes de gastroentérites abondantes. Les rotavirus isolés sont des souches humaine, bovine et porcine. Les entérovirus sont différents de celles présentes chez les enfants malades. Toutefois, le risque de GEA à rotavirus est 3 fois plus élevé pour les enfants régulièrement desservis par de l'eau non conforme.</p> <p>L'ultrafiltration et la PCR permettent donc une analyse virologique sensible, spécifique et rapide de l'eau d'alimentation, applicable notamment aux virus non cultivables sur cellules. La présence de virus dans l'eau d'alimentation, d'espèce variable suivant les saisons, n'est pas corrélée à la contamination bactériologique.</p>
MOTS CLES	Virus entériques - Eau d'alimentation - Ultrafiltration - Réaction de polymérisation en chaîne (PCR) - Impact sanitaire.
JURY <u>Président</u> <u>Membres</u>	M le Professeur J. CALOP M le Professeur J. M. SEIGNEURIN M le Professeur B. JOLY Mme le Docteur B. GRATACAP-CAVALLIER Mme le Docteur M. C. ALBERTO-GONDOUIN M J. L. POTELON
Date de soutenance	Jeudi 14 Mars 1996
Adresse de l'auteur	[Données à caractère personnel]