

PRE

SIONS

ET

MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE

IM

PACTS

PRESSIONS ET IMPACTS

MÉDITERRANÉE OCCIDENTALE

JUIN 2012

PRESSIONS BIOLOGIQUES ET IMPACTS ASSOCIÉS

Introduction d'organismes microbiens pathogènes

Qualité microbiologique des coquillages destinés à la consommation humaine

Monique Pommepuy
(Ifremer, Brest).



1. CONTAMINATION DES COQUILLAGES PAR DES VIRUS

Les coquillages, par leur mode de nutrition, filtrent d'importantes quantités d'eau de mer et de ce fait sont susceptibles de concentrer les différentes particules, polluants et microorganismes présents dans ces eaux. Les données concernant la contamination de l'eau et des coquillages par les virus humains sont rares. En effet, il n'existe pas de dispositif de surveillance des virus ni de critère réglementaire en France ou en Europe. Les données utilisées ici sont issues d'études locales, notamment à l'étang de Thau, faisant suite à des épisodes de gastro-entérites alors que les huîtres étaient incriminées. Lorsque ces données existent, elles ne sont acquises que sur des secteurs de taille très limitée, proches du littoral, et durant de très courtes périodes : quelques mois, au mieux un an. La stratégie d'échantillonnage est adaptée à l'objet de l'étude et non à une surveillance. Enfin, nous n'avons aucune donnée sur les autres secteurs littoraux, ce qui ne préjuge en rien de l'absence de virus. Nous tenons à souligner qu'il est impossible de généraliser l'information acquise sur les sites étudiés à d'autres sites, ou de supposer que ce qui a été trouvé à une période donnée est généralisable dans le temps.

1.1. DÉFINITIONS

1.1.1. Risque viral

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

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

Les infections causées par le virus de l'hépatite A (VHA) sont peu nombreuses en Europe, les zones endémiques sont situées notamment dans les pays en voie de développement. La présence du VHA est donc rare dans les eaux usées et les rivières, et ne fait par conséquent pas l'objet de surveillance. Les données sur le VHA sont très limitées et ne permettent pas de faire un état des lieux dans le cadre de la DCSMM. En ce qui concerne les norovirus, les infections dont ils sont la cause surviennent toute l'année, avec un pic hivernal plus marqué. On dispose de quelques données localisées dans l'espace et le temps, mais comme pour le VHA, il n'existe pas de dispositif de surveillance des eaux ou des coquillages. Les données présentées ici sont la plupart du temps obtenues sur des zones qui ont fait l'objet de recherches particulières suite à des cas de gastro-entérites ou lors d'études ponctuelles. Ces données seront donc traitées comme telles et ne pourront permettre une généralisation pour un état des lieux de la qualité virologique des zones côtières.

1.1.2. Sources de contamination

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

1.1.3. Impacts

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

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

1.2. MÉTHODE DE DÉTECTION

Chaque échantillon de coquillages, constitué d'au moins 6 individus, est disséqué et seuls les tissus digestifs sont analysés. Les virus sont élués par broyage, précipités et centrifugés [5]. Les différents concentrats obtenus sont ensuite extraits selon le même protocole par lyse au guanidium et capture des acides nucléiques sur de la silice magnétique (kit Nuclisens, BioMérieux) [5]. Avant toute analyse, l'efficacité d'extraction est contrôlée par RT-PCR¹ en temps réel (rRT-PCR), par du mengovirus ajouté en début de traitement de l'échantillon. Si ces contrôles sont satisfaisants, les norovirus (NoV) sont recherchés sur l'extrait pur des acides nucléiques et après dilution au 1/10^e, par rRT-PCR, en utilisant les amorces et sondes sélectionnées par le laboratoire et préconisées par le groupe de travail CEN-TAG4².

1.3. EXEMPLE DE SUIVI DE LA CONTAMINATION VIRALE : CAS DE L'ÉTANG DE THAU

Les eaux contaminées de l'étang de Thau peuvent éventuellement, lorsque les conditions le permettent, affecter la qualité des eaux côtières. C'est à ce titre que les données sont présentées ici.

1.3.1. Contexte économique et géographique

L'étang de Thau représente 10 % de la production conchylicole française, soit environ 12 000 tonnes d'huîtres et 3 600 tonnes de moules sur 840 concessions d'élevage. Ces dernières représentent 1/5^e de la superficie totale de l'étang, le long du littoral nord, et sont réparties en trois zones de l'est à l'ouest : Bouzigues, Mèze, Marseillan. La surveillance régulière de l'étang de Thau dans le cadre du REMI³ (réseau de contrôle microbiologique des zones de production des coquillages), le place en catégorie B, c'est-à-dire que les coquillages doivent être purifiés avant d'être mis sur le marché (figure 1).

Le site de l'étang de Thau a une superficie d'environ 7 500 ha pour un volume global de 260 millions de m³. C'est l'étang le plus vaste et le plus profond du littoral français méditerranéen. Sa profondeur moyenne est de 4,5 m et atteint 10 m dans sa partie centrale [6]. Un cordon littoral sableux de 12 km sépare cet étang de la Méditerranée, limitant ainsi les échanges entre la lagune et la mer. La surface urbanisée occupe 16 % des 285 km² du bassin versant de l'étang, ce qui se situe au-dessus de la moyenne nationale pour les zones littorales. La population atteint 89 400 habitants, dont près de la moitié se concentre sur la ville de Sète. La densité de population est d'environ 240 habitants·km⁻². Le bassin de Thau est drainé par dix cours d'eau dont un seul est permanent : la Vène. Les débits de ces cours d'eau, temporaires ou permanents, peuvent varier très subitement lors d'événements pluviométriques plus ou moins intenses de type cévenol, en

1 rRT-PCR : Real Time – Polymerase Chain Reaction temps réel, technique permettant la quantification des ARN viraux.

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

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

automne et au printemps. Ces crues engendrent de fortes dessalures de l'étang, associées entre autres à des contaminations microbiologiques. Une source souterraine débouche au nord de l'étang : la Vise. Par ailleurs, par temps de pluie, de nombreuses sources de pollution potentielles de l'étang existent : les déversements des trop-pleins des postes de refoulement – 12 bassins versants concernés –, le lessivage urbain sur 7 bassins versants et les rejets des installations d'assainissement non collectif, qui concernent 1 bassin versant.

Le temps moyen de résidence des eaux de l'étang est estimé à 94 jours, ce qui en fait un milieu relativement confiné. Le principal vecteur de la circulation des eaux est le vent, en raison des faibles volumes d'eau douce mis en jeu. Les échanges avec la mer se font majoritairement par les canaux de Sète au nord-est et secondairement par le canal de Pisse-Saumes au sud-ouest. Ces échanges avec la mer sont contrôlés par trois facteurs représentés par la marée astronomique, barométrique et le vent [6].

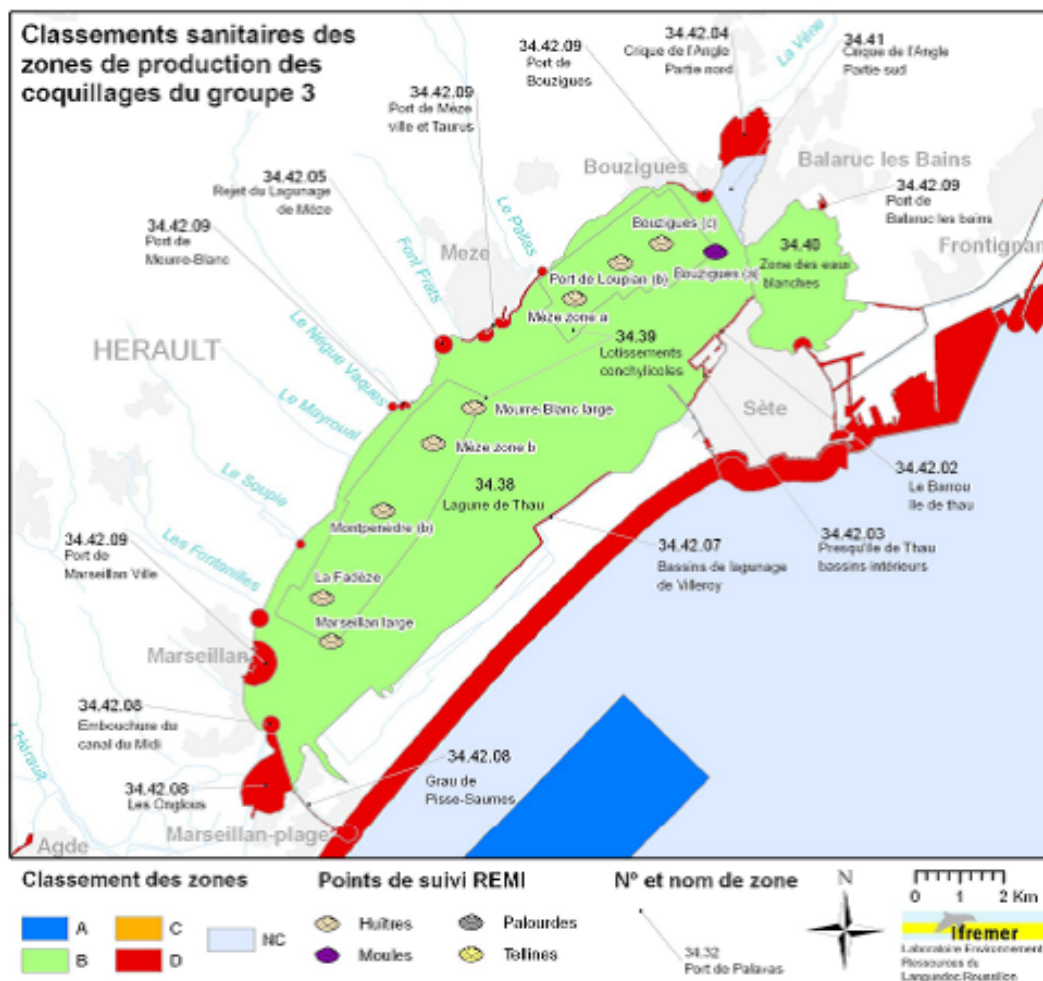


Figure 1 : Points de surveillance de la qualité des coquillages dans l'étang de Thau (Sources : REMI, Ifremer, 2011).

1.3.2. Contexte de l'étude

La base de données utilisée ici est issue d'une étude réalisée suite à des déclarations de gastro-entérites. Entre le 2 et le 27 février 2006, 38 Toxi-Infections Collectives à Norovirus (205 cas) sont survenues et les cas ont été rapportés à la consommation d'huîtres de l'étang de Thau. Les signes cliniques ont orienté la recherche de virus entériques, et en particulier de norovirus [7] [8] [9]. Dans ce contexte, des échantillons d'huîtres en lien avec les cas cliniques ont été prélevés soit chez les consommateurs malades, soit chez les producteurs, et analysés. Les prélèvements ont été réalisés à partir du 6 février au 20 mars.

1.3.3. Résultats

Le tableau 1 rapporte les résultats trouvés semaine par semaine (synthèse des différents points prélevés).

Date	Nombre échantillons	Moyenne* géométrique Log copies ARN/g	Écart-type Log copies ARN/g	Maximum Log copies ARN/g	Minimum* Log copies ARN/g	% < LD*
Semaine 6	17	3,03	0,88	4,57	< LD	5,6
Semaine 7	12	2,24	0,74	3,99	< LD	58,3
Semaine 8	2	1,70	0,00	1,70	< LD	100
Semaine 9	13	1,85	0,23	2,36	< LD	53,8
Semaine 10	12	1,96	0,50	3,07	< LD	11,8
Semaine 11	3	1,71	0,02	1,73	< LD	66,7

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

Tableau 1 : Concentration en norovirus trouvés dans les coquillages de l'étang de Thau (février-mars 2006).

La zone de production a été suivie pendant un mois. Début février, de fortes concentrations en NoV ont été observées sur l'ensemble du secteur, où seulement 6,6 % des coquillages n'étaient pas contaminés. Puis les analyses ont montré une lente décroissance de la contamination, aussi bien au niveau des moyennes que des valeurs maximales, ainsi qu'une baisse de l'occurrence des virus sur l'ensemble du secteur.

Une enquête environnementale a été conduite afin de comprendre ces contaminations élevées. Les résultats indiquent un ensemble de faits qui ont abouti à cette situation. En premier lieu, lors de l'hiver 2006 et pour cette région, le nombre de cas de gastro-entérites dans la population a atteint un pic important : 742 cas / 100 000 habitants entre les 7 et 15 janvier⁴. Or, il a été démontré qu'un individu malade excréta en moyenne 108 virus·g⁻¹ de selles, soit 1010 NoV·jour⁻¹ [10]. Une semaine plus tard, cette même région a été atteinte par des pluies très importantes – 138,2 mm en une semaine, selon les données Météo France –, quantité bien supérieure aux moyennes habituellement observées de 65,2 mm par mois depuis 43 ans. Ces pluies diluviennes ont entraîné des dysfonctionnements des stations d'épuration, des débordements de réseaux d'assainissement et des apports importants par les cours d'eaux environnants. Ainsi, de nombreux rejets ont déversé des eaux usées brutes directement dans la lagune et au niveau de la zone de production [9]. De nombreux postes de relèvement du réseau ont également dysfonctionné : le 29 janvier 2006, le poste de Balaruc a rejeté 14 000 m³, et le poste de Marseillan, 132 000 m³, contaminant ainsi les parcs d'élevage. Les déclarations de toxi-infections alimentaires ont été notifiées dès la semaine suivante.

1.3.4. Conclusion

Les coquillages sont sensibles à la contamination en raison de leur activité de filtration. Ceux de la lagune de Thau, et en particulier les huîtres, sont depuis de nombreuses années à l'origine d'une proportion importante des Toxi-Infections Alimentaires Collectives (TIAC) à virus entériques, le plus souvent à NoV, déclarées en France. Les implications de cette zone dans des déclarations de gastro-entérites liées à la consommation d'huîtres de ce secteur les plus importantes ont eu lieu en 2002/2003, 2005/2006, 2009 et en 2010/2011 [11] [12]. On a estimé (com. orale InVs) à 28 % (65/232), le nombre de TIAC déclarées en France de 2000 à 2010 imputables explicitement à la consommation d'huîtres de l'étang de Thau ou survenues dans la région Languedoc-Roussillon (sans mention de l'origine des huîtres sur la fiche de DO). Ce site représente 90 % de la production méditerranéenne [6].

Pour conclure, l'étude n'ayant porté que sur un secteur et une période limitée (2 mois), il n'est pas possible de généraliser les informations obtenues ni dans le temps, ni à d'autres secteurs de production conchylicole, ni à l'ensemble de la sous-région marine dans le cadre de la DCSSM ; il est vraisemblable qu'à d'autres périodes

⁴ <http://websenti.b3.jussieu.fr/sentiweb>

de l'année le secteur est pas ou peu contaminé en norovirus, puisque la présence de virus entérique est liée à la conjonction de plusieurs événements dont la présence d'épidémie dans la population et le rejet d'eaux usées, par temps d'orage ou lors de rupture de la chaîne de traitement des eaux usées.

1.4. POUR UNE SURVEILLANCE VIROLOGIQUE

Les situations comme celles décrites en 2006, avec un taux très important de gastro-entérites dans la population et des pluies diluviennes, entraînent la contamination des coquillages. Le développement récent de la RT-PCR en temps réel permet d'estimer le nombre de copies de génomes viraux présents dans les coquillages et d'évaluer ainsi, dans l'hypothèse d'une surveillance mise en place sur des secteurs sensibles, le risque sanitaire lié à la consommation des coquillages.

Dans le cadre de la DCSMM, si le suivi de ce type de contamination était adopté, les méthodes actuelles, en cours de validation sur le plan européen, pourraient être utilisées sur un plan d'échantillonnage type REMI et pourraient inclure des analyses d'eaux des principaux émissaires affectant les secteurs conchylicoles.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Le Guyader F.S., Pommepuy M., Loisy-Hamon F., 2010a. Virus entériques humains et aliments. *An. Inst. Past.*, 52, 8-11.
- [2] Le Guyader F.S., Krol J., Ambert-Balay K., Ruvoen-Clouet N., Desaubliaux B., Parnaudeau S., Le Saux J.-C., Ponge A., Pothier P., Atmar R.L., Le Pendu J., 2010b. Comprehensive analysis of a norovirus-associated gastroenteritis outbreak, from the environment to the consumer. *J. Clin. Microbiol.*, 48: 915-920.
- [3] Le Guyader F.S., Le Saux J.-C., Delmas G., Krol J., Ambert-Balay K., 2009b. Virus Aichi, norovirus, astrovirus, entérovirus et rotavirus impliqués dans des cas de gastro-entérites suite à la consommation d'huîtres. *Virologie* 13 : 1-3.
- [4] Le Guyader F.S., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009c. Monitoring viral contamination in shellfish growing areas. In: *New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environment management*. G. Burnell, G. Allan (Eds), Woodhead Publishing, Cambridge, p542-569.
- [5] Le Guyader F.S., Parnaudeau S., Schaeffer J., Bosch A., Loisy F., Pommepuy M., Atmar R.L., 2009a. Detection and Quantification of Noroviruses in Shellfish. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 618-624.
- [6] Serais O., 2007. Outil de management et de gestion de l'avertissement. Bassin de Thau (OMEGA-THAU). Phase 1 / Etape 1, synthèse des résultats REMI, Etang de Thau, période 1997-2006. In Ifremer, RST/LER/LERLR/07-04 juillet 2007.
- [7] Faillie J.L., Cicchero V., Serais O., Le Saux J.C., 2007. Toxi-infections alimentaires collectives liées à la consommation d'huîtres de la lagune de Thau contaminées par des virus entériques, France, février 2006 Rapport InVS-Ifremer. Janvier 2007. 27p.
- [8] Le Guyader F.S., Le Saux J.C., Ambert-Balay K., Krol J., Serais O., Parnaudeau S., Giraudon H., Delmas G., Pommepuy M., Pothier P., Atmar R.L., 2008. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology* 46, 4011-4017.
- [9] Le Saux J.C., Serais O., Parnaudeau S., Salvagnac P., Delmas G., Cicchero V., Claudet J., Pothier P., Balay K., Fiandrino A., Pommepuy M., Le Guyader F.S., 2009. Evidence of the presence of viral contamination in shellfish after short rainfall events. In *Proceeding of the 6th Int. Conf. On Molluscan Shellfish Safety*, Blenheim, New Zealand ed P Bushy. 256-252.
- [10] Atmar R.L., Opekun A.R., Gilger M.A., Estes M.K., Crawford S.E., Neill F.H., Graham D.Y., 2008. Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerging Infectious Diseases* 14, 1553-1557.
- [11] Barataud D., Doyle A., Gallay A., Thiolet J.M., Le Guyader F., Kohli E., Vaillant V., 2003. Toxi-infections alimentaires collectives à Norovirus liées à la consommation d'huîtres de l'étang de Thau, France, décembre 2002. *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*. 38, 177-179.
- [12] Doyle A., Barataud D., Gallay A., Thiolet J.M., Le Guyader S., Kohli E., Vaillant V., 2004. Norovirus foodborne outbreaks associated with the consumption of oysters from the Etang de Thau, France, December 2002. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 9, 24-26.