

## Virologie et Station d'épuration

**PERSISTANCE DU SARS-COV-2 ET DES BACTERIOPHAGES  
FECAUX DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITEES :  
EVALUATION ET GESTION DE LA DISPERSION**

### Rapport final actualisé

**Mai 2022**



**ACTALIA**

*Institut Technique Agro-Industriel (ITAI)  
Pôle Sécurité des aliments*

*310 Rue Popielujko  
50 000 SAINT-LO*

*Tel : 02 33 06 71 71 / Fax : 02 33 06 71 81*

*Contact : n.boudaud@actalia.eu*

## Table des matières

<b>I.</b>	<b>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE .....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>OBJECTIFS .....</b>	<b>4</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTATS ATTENDUS .....</b>	<b>5</b>
<b>IV.</b>	<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>5</b>
	IV.1. Stations d'épuration étudiées et plan d'échantillonnage .....	5
	IV.2. Quantification des génomes du SARS-CoV-2 et des phages ARN F-spécifiques du groupe II dans les eaux usées brutes et traitées .....	6
	IV.3. Quantification des phages ARN F-spécifiques et des coliphages somatiques infectieux totaux dans les eaux usées brutes et traitées.....	7
<b>V.</b>	<b>RESULTATS ET DISCUSSION.....</b>	<b>8</b>
	V.1. Action 1 : suivi du SARS-CoV-2 et des phages fécaux dans les eaux usées brutes et traitées au niveau du bassin d'Arcachon.....	8
	V.2. Action 2 : surveillance épidémiologique du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes au niveau du bassin d'Arcachon.....	14
<b>VI.</b>	<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>16</b>
<b>VII.</b>	<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>17</b>
<b>VIII.</b>	<b>REFERENCES .....</b>	<b>18</b>
<b>IX.</b>	<b>ANNEXE 1.....</b>	<b>20</b>

## I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Un nouveau coronavirus humain, appelé « *Severe Acute Respiratory Syndrome CoronaVirus 2* » (SARS-CoV-2) a fait son apparition dans la région de Wuhan en Chine fin 2019. Le SARS-CoV-2, appartenant à la famille des *Coronaviridae*, est un virus enveloppé dont la taille varie entre 50 et 140 nm. Il renferme un génome à ARN simple brin à polarité positive d'environ 30 000 nucléotides. Les données scientifiques disponibles indiquent que le SARS-COV-2, responsable de la **Covid-19**, est transmissible essentiellement par **voie respiratoire** via les aérosols générés par les personnes infectées lors de toux ou d'éternuements. La transmission **par contact avec des surfaces contaminées** est également suspectée (Aboubakr et al., 2020). Enfin, une transmission **par voie féco-orale** ne peut pas être exclue (Mohan et al., 2021; Zhang et al., 2020). Depuis le 31 décembre 2019, ce coronavirus est responsable de plus 513 millions de cas confirmés et de 6,2 millions de décès dans le monde (*données Santé Publique France du 30 avril 2022*). Les personnes infectées par le SARS-CoV-2 peuvent être symptomatiques (e.g. fièvre, toux, maux de tête, courbatures, perte de l'odorat et du goût, diarrhées, détresse respiratoire) mais aussi asymptomatiques. Depuis son apparition officielle, en novembre 2019, plusieurs vagues épidémiques et variants préoccupants (e.g. Alpha, Delta, Omicron) se sont succédés au cours du temps, avec des pouvoirs infectieux et de contagiosité spécifiques.

Il est aujourd'hui parfaitement bien établi dans la littérature que le **génome du SARS-CoV-2 peut être retrouvé dans les eaux usées brutes** compte tenu du fait que les personnes infectées (symptomatiques et asymptomatiques) peuvent excréter ce virus dans les selles (Liu et al., 2020 ; Zhang et al., 2020). Il a en effet été montré que le SARS-CoV-2 pouvait être présent dans les selles des individus symptomatiques (~43% des cas d'après une méta-analyse) mais aussi des individus asymptomatiques (Zhang et al., 2021). Ces mêmes auteurs ont montré que la prévalence dans les selles est plus importante chez les patients ayant des symptômes gastro-intestinaux et que la durée d'excrétion virale dans les selles pouvait durer environ 3 semaines. Des études scientifiques sont actuellement conduites pour mieux comprendre le tropisme de ce virus vis-à-vis des cellules intestinales mais aussi pour mieux appréhender l'excrétion du SARS-CoV-2 dans les selles humaines des individus symptomatiques et asymptomatiques.

Au début de la pandémie au printemps 2020, certaines études ont montré l'intérêt de rechercher le génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes aux Pays-Bas et en France pour suivre sa circulation dans les populations rattachées à un réseau de collecte (Medema et al., 2020 ; Wurtzer et al., 2020). Selon ces mêmes auteurs, l'analyse des teneurs en génomes de SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes permettent de i) **suivre localement les niveaux de contamination virale dans les populations** et, ii) **d'anticiper sur les résurgences de nouvelles vagues épidémiques lorsque le virus circule à bas bruit dans les populations**. Cet indicateur pourrait aider à la mise en place de procédures sanitaires limitant la circulation du virus dans les populations et ainsi empêcher la saturation des hôpitaux concernant la prise en charge des patients infectés.

C'est dans ce contexte que le **réseau OBEPINE** (*Observatoire Epidémiologique des Eaux Usées*) a été créé en avril 2020 sous l'impulsion du fonds « CARE » du Ministère de la Recherche pour promouvoir l'analyse des eaux usées en France comme outil de surveillance épidémiologique dans le cadre d'un plan de lutte intégrée contre l'épidémie de Covid-19 en France (<https://www.reseau-obepine.fr/>). Les membres fondateurs de ce réseau OBEPINE sont le LCPME (UMR 7564 : CNRS – Université Lorraine), la Sorbonne-Université, Eau de Paris, l'Institut de Recherche Biomédicale des Armées et l'Ifremer. Les méthodes d'extraction et de quantification du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées qui ont été développées par le réseau OBEPINE reposent sur des principes d'ultracentrifugation, d'ultrafiltration, de concentration ou de lyse directe (Medema et al., 2020 ; Wurtzer et al., 2020 ; Bertrand et al., 2020). Ces méthodes ont été éprouvées et validées par plusieurs essais inter-laboratoires organisés en 2020 et

2021. Entre le 01 janvier 2021 et le 30 avril 2022, environ **200 STEP françaises** représentatives du maillage national ont été suivies de manière bihebdomadaire par ce réseau. Les analyses en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes ont été effectuées par un réseau restreint de laboratoires dont les compétences techniques ont été validées par le comité de coordination et d'orientation scientifique (ccos) d'OBEPINE (dont ACTALIA qui a suivi environ 40 STEP depuis janvier 2021). Des rapports modélisés intégrant la concentration en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées et le débit journalier des STEP étaient ensuite transmis toutes les semaines aux autorités de gestion et aux traiteurs d'eaux usées. Il est important de rappeler ici que **le caractère infectieux de ce virus dans les eaux usées ne peut pas être précisé** car les méthodes utilisées ne se basent que sur la détection du génome du SARS-CoV-2 par RT-qPCR ou ddPCR. En parallèle, le réseau **Sum'Eau**, piloté par le Laboratoire d'Hydrologie Nancy (Anses) (LHN), a été créé par le Ministère de la Santé et des Solidarités en 2021 pour reprendre progressivement ces missions de surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Ce même réseau évalue entre 2022 les différentes méthodes d'extraction et de quantification du SARS-CoV-2 dans les eaux usées à travers une étude multicentrique d'envergure (i.e. suivi de 12 STEP hebdomadaires pendant 11 semaines). Le réseau OBEPINE continuera d'exister mais *via* un Groupement d'Intérêt Scientifique (GIS) avec des missions orientées sur des travaux de recherche collaboratifs.

Ces types de structure et de réseau sont en parfaite harmonie avec la recommandation européenne UE 2021/472 concernant une approche commune pour la mise en place d'une surveillance systématique de la présence du SARS-CoV-2 et de ses variants préoccupants dans les eaux usées au sein de l'Union Européenne (Journal Officiel de l'Union Européenne, 2021). Cette recommandation « *encourage les Etats Membres à mettre en place des structures adéquates associant les autorités sanitaires et les autorités compétentes dans le domaine des eaux usées dans le but de fusionner et relier l'ensemble des données pertinentes et de coordonner l'interprétation et la communication des résultats* ». En Europe, des structures ou des réseaux similaires au réseau OBEPINE ont aussi été développées dans d'autres Etats Membres de l'Union Européenne, notamment aux Pays-Bas.

Depuis la première diffusion de ce présent rapport en janvier 2020, la **dispersion potentielle du SARS-CoV-2 infectieux dans l'environnement** (e.g. masses d'eau continentales, zones de baignade, zones conchylicoles) a été largement étudiée par la communauté scientifique. D'ailleurs, la littérature regorge de données sur le sujet. Sans surprise, les études les plus sérieuses montrent clairement que le SARS-CoV-2 infectieux affiche une survie très faible dans l'environnement compte tenu du fait que ce soit un virus enveloppé ayant un génome de grande taille (~ 30 kbases). Après adhésion des particules virales sur des supports inertes (e.g. plastique, cuivre, acier inox), des abattements en SARS-CoV-2 infectieux compris entre 2,0 à 3,5 Log<sub>10</sub> ont été obtenus en moins de 72 heures à 21-23°C (van Doremalen et al., 2020). Il n'est donc pas surprenant que très peu d'études aient montré la présence de SARS-CoV-2 infectieux dans les eaux usées (Foladori et al., 2020). Récemment, une réduction de 4,0 Log<sub>10</sub> du SARS-CoV-2 infectieux dans les eaux usées brutes après 4 jours à 20°C a été montré après inoculation d'environ 10<sup>5</sup> à 10<sup>6</sup> virus infectieux à T<sub>0</sub> (Varbanov et al., 2021). Ces mêmes auteurs ont aussi observé des abattements supérieurs à 5,0 Log<sub>10</sub> en SARS-CoV-2 infectieux après un traitement à 50°C pendant 30 min ou après un traitement à pH 11 pendant 10 min, indiquant une très bonne efficacité du traitement classique des boues d'épuration. L'ensemble de ces données laisse donc supposer que la majorité des particules de SARS-CoV-2 sont non infectieuses dans cet environnement hostile favorisant leur inactivation. Le risque de contamination par le SARS-CoV-2 à partir des eaux usées est à ce jour considéré comme négligeable.

Il est bien établi dans la littérature que **la survie des virus nus** (i.e. comme les bactériophages fécaux) **est significativement plus élevée dans l'environnement que celle des virus enveloppés** (i.e. comme le SARS-CoV-2). Les bactériophages ARN F-spécifiques (**FRNAPH**) et les coliphages somatiques

(CS) sont naturellement retrouvés dans les eaux usées car ils sont excrétés *via* les selles humaines. Comme pour les virus entériques, ils ne se répliquent pas ou très peu dans l'environnement. Concernant les FRNAPH, il existe quatre génogroupes différents. Les génogroupes II et III ont plutôt une origine humaine tandis que les génogroupes I et IV ont plutôt une origine animale (Hartard et al., 2015). La survie des génogroupes des FRNAPH infectieux est quant à elle variable dans l'environnement. Elle suit la séquence suivante : FRNAPH-I > FRNAPH-II >> FRNAPH-III et -IV. C'est la raison pour laquelle les génogroupes I et II sont majoritairement retrouvés dans les rejets d'eaux usées d'origine urbaine (Hartard et al., 2015 ; Wolf et al., 2010). Concernant les CS, il existe quatre familles distinctes dont l'abondance suit la séquence suivante dans l'environnement : *Siphoviridae* > *Microviridae* > *Podoviridae* >> *Myoviridae* ((McMinn et al., 2017; Sidhu et al., 2018). Globalement, les CS sont connus pour être plus abondants et plus résistants dans l'environnement que les FRNAPH (Bertrand et al., 2012 ; Mocé-Llivina et al., 2003).

C'est ainsi que la recherche des **FRNAPH** et **CS infectieux** dans les eaux usées brutes et traitées peut être utile pour évaluer de manière sécurisante les performances des STEP pour éliminer les virus entériques d'origine hydrique (*i.e.* « *worst case scenario* »). Ces phages sont d'ailleurs **utilisés en routine pour évaluer les performances des traitements des eaux en Europe et aux USA** (WHO, 2011 ; US-EPA, 2006). Ils sont aussi recommandés dans le projet de révision de la Directive Européenne pour estimer la qualité de l'eau destinée à la consommation humaine (Parlement Européen, 2020).

Une revue récente décrit une persistance et une occurrence nettement plus faibles de certains coronavirus dans les eaux usées à différentes températures par rapport à certains bactériophages fécaux, en particulier le phage MS2 (Mohan et al., 2021). Enfin expérimentalement, il a été prouvé que les coliphages somatiques infectieux étaient très largement plus résistants que le SARS-CoV-2 infectieux dans les eaux usées brutes à 20°C et après certains traitements de désinfection (*i.e.* chaleur, pH basique) (Varbanov et al., 2021). En évaluant les performances des systèmes de traitement des eaux usées en utilisant ces bactériophages fécaux infectieux (FRNAPH, CS) comme indicateurs, il est possible d'estimer de manière indirecte et sécurisante l'élimination du SARS-CoV-2 par ces mêmes traitements tout en appliquant un **principe de précaution** compte tenu de sa plus faible survie dans l'environnement.

## II. OBJECTIFS

Le Syndicat Intercommunal du Bassin d’Arcachon (**SIBA**) et **ELOA** ont sollicité ACTALIA pour évaluer l’impact de cinq STEP (*i.e.* Biganos, La Teste, Marcheprime, Mios et Cazaux) situés au niveau du Bassin d’Arcachon vis-à-vis de l’élimination des virus entériques, en utilisant les FRNAPH (infectieux et génome) et les CS infectieux comme indicateurs. Les concentrations en génomes de SARS-CoV-2 en entrée et sortie de STEP ont également été contrôlées afin d’évaluer son occurrence (en entrée de station) et sa dispersion potentielle dans l’environnement (dans les rejets d’eaux usées). Ces études ont été réalisées entre avril et mai 2020 puis entre juin et septembre 2021. Les objectifs de ce projet étaient divisés en deux actions.

Dans l’**action 1**, il s’agissait de suivre les concentrations en génomes de SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes et traitées de plusieurs STEP et de les comparer à celles en génomes de bactériophages ARN F-spécifiques du groupe II (FRNAPH-II) entre avril et mai 2020. En parallèle, les concentrations en FRNAPH et CS infectieux totaux ont été déterminées pour estimer dans des conditions sécurisantes les performances des systèmes de traitement des eaux usées vis-à-vis de l’élimination des virus entériques d’origine hydrique (incluant le SARS-CoV-2). Enfin, les concentrations en FRNAPH (infectieux et génome) et en CS infectieux dans les eaux usées brutes et traitées ont été suivies pendant plusieurs semaines pour contrôler le comportement de certaines stations d’épuration vis-à-vis de l’élimination des virus.

Dans l’**action 2**, il s’agissait d’effectuer une surveillance épidémiologique hebdomadaire de la circulation du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes de plusieurs STEP entre avril 2020 et avril 2022. Les concentrations en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées ont été comparées au taux d’incidence au niveau du département de la Gironde. Les résultats de cette action ont également été communiqués au réseau OBEPINE. Les données acquises dans cette étude ont été incrémentées dans une base de données nationale puis valorisées par voie de rapports modélisés de manière hebdomadaire, de publications scientifiques et de communiqués de presse.

### III. RESULTATS ATTENDUS

Les résultats attendus de ce projet sont les suivants :

- suivre les tendances locales de la **circulation du SARS-CoV-2** dans les eaux usées brutes dans cinq STEP du bassin d’Arcachon entre avril 2020 et avril 2022 avec diffusion des résultats auprès du SIBA, des autorités sanitaires et des élus locaux.
- anticiper sur des **résurgences potentielles** du SARS-CoV-2 et des différentes **vagues épidémiques** (avril 2020, octobre 2020, avril 2021, juillet 2022, février 2022) en lien avec le taux d’incidence.
- analyser la **présence de génomes de SARS-CoV-2 dans les eaux usées traitées** pour évaluer sa dispersion potentielle dans l’environnement.
- estimer l’**efficacité des STEP vis-à-vis de l’élimination des virus entériques d’origine hydrique** en utilisant les bactériophages fécaux (FRNAPH et CS) comme indicateurs.
- déterminer si des **traitements ou mesures supplémentaires** appliqués aux eaux usées pourraient être nécessaires pour améliorer l’élimination des virus entériques mais aussi pour mieux protéger l’environnement et les opérateurs des STEP.

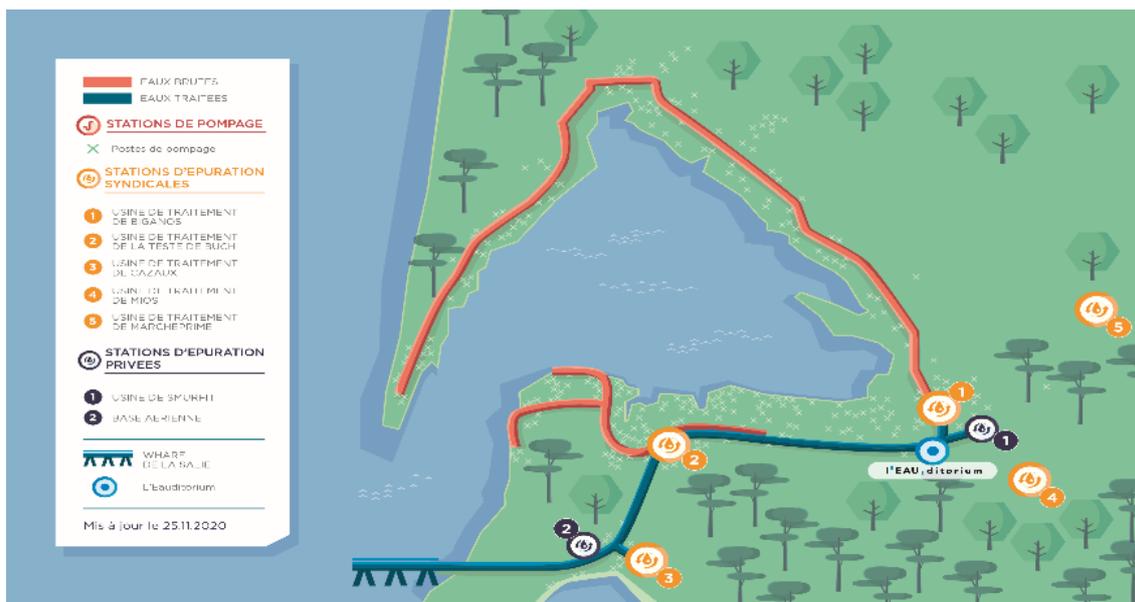
### IV. MATERIELS ET METHODES

#### IV.1. STATIONS D’EPURATION ETUDIEES ET PLAN D’ECHANTILLONNAGE

Dans l’**action 1**, des eaux usées brutes et traitées ont été collectées sur différentes STEP situées au niveau du Bassin d’Arcachon (Biganos, La Teste, Marcheprime, Mios et Cazaux) entre le 14 avril et le 14 mai 2020. Des échantillons provenant du « ZI », « puits du Wharf » et « bout du Wharf » ont aussi été collectés le 21-22 avril 2020. Tous ces échantillons (1 L) ont été congelés avant envoi à ACTALIA. Des eaux usées brutes et traitées ont également été collectées au niveau des STEP de Biganos et de La Teste entre le 14 juin et le 13 septembre 2021 pour évaluer l’impact d’un nouveau traitement par les UV<sub>254nm</sub>. Enfin, des eaux usées brutes et traitées ont été analysées entre le 18 octobre 2021 et le 24 janvier 2022 pour suivre le comportement de la station de Mios vis-à-vis de l’élimination des particules virales en utilisant les indicateurs FRNAPH et CS. Au total, **73 échantillons** ont été analysés dans le cadre de cette action.

Dans l’**action 2**, des échantillons d’eaux usées brutes ont été régulièrement collectés à partir de huit STEP et postes de relèvement situés au niveau du bassin d’Arcachon (Biganos, La Teste, Marcheprime, Mios, Cazaux, Jane de Boy, Règue verte et Marché d’Audenge) entre le 14 avril 2020 et le 30 avril 2022. Pour chaque site, des échantillons (1 L) d’eaux usées brutes congelées (prélevés avant le 06 juillet 2020) ou fraîches (prélevés après le 06 juillet 2020) a été acheminés par transporteur froid à ACTALIA. Au total, **385 échantillons** ont été analysés dans le cadre de cette action.

La localisation géographique des différents points de prélèvements est présentée sur la **figure 1**.



**Figure 1 : localisation des différents points de prélèvements des eaux usées brutes et traitées.**

Les STEP de Biganos et de La Teste ont une capacité de 135 000 et 150 000 équivalents - habitants (eq-ha), respectivement. Tandis que celles de Cazaux, Mios et Marcheprime ont une capacité inférieure à 20 000 eq-ha. Les traitements des eaux usées font intervenir des cultures fixées (*i.e.* Biganos et La Teste) ou des cultures libres (*i.e.* Marcheprime, Mios et Cazaux).

#### **IV.2. QUANTIFICATION DES GENOMES DU SARS-CoV-2 ET DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DU GROUPE II DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITEES**

L'extraction et la quantification du génome du SARS-CoV-2 par RT-qPCR dans les eaux usées ont été effectuées en utilisant les protocoles développés par le LCPME (Bertrand et al. 2020), membre fondateur du réseau OBEPINE. Ces protocoles ont été éprouvés et validés par le réseau OBEPINE.

Pour l'action 1, la **méthode d'ultrafiltration** a été utilisée à partir d'une prise d'essai de 100 mL. Pour l'action 2, les **méthodes d'ultrafiltration ou de concentration** ont été utilisées en 2020 à partir d'une prise d'essai de 100 mL. En 2021, seule la **méthode de lyse directe** a été utilisée à partir d'une prise d'essai de 5 mL car elle montrait une meilleure sensibilité de détection en raison de l'apport réduit d'inhibiteurs de PCR. Une étape de concentration de l'extrait d'ARN viral purifié a parfois été employée pour abaisser la limite de détection, au moyen du « *RNA clean & Concentrator 5w* » (Ozyme). Seule la région codant le gène E du génome du SARS-CoV-2 a été recherchée en utilisant les systèmes d'amorces et de sonde décrits par Corman et al. (2020). La quantification du génome du SARS-CoV-2 a été réalisée en utilisant une gamme étalon standard (*i.e.* plasmide nCoV-ALL Control, Eurofins) comprise entre 5 et  $10^5$  copies de génome / réaction. Les rendements d'extraction ont été déterminés pour contrôler les performances des méthodes d'ultrafiltration et de concentration. Les résultats étaient considérés comme valides lorsque le rendement d'extraction était supérieur à 1,0% comme recommandé dans la norme ISO 15216-1 (NF EN ISO 15216-1, 2017).

L'extraction et la purification du génome des FRNAPH-II ont été effectuées en utilisant les mêmes méthodes (*i.e.* ultrafiltration, concentration ou lyse directe) que celles utilisées pour le génome du SARS-CoV-2. La quantification du génome du FRNAPH-II par RT-qPCR a été effectuée en utilisant des méthodes publiées (Hartard et al., 2015 ; Wolf et al., 2010). Pour chaque échantillon, les génomes des FRNAPH-II et du SARS-CoV-2 ont été quantifiés à partir des mêmes méthodes d'extraction et de purification.

Pour les méthodes d'ultrafiltration et de concentration, les **limites de détection** (LDD) et de **quantification** (LDQ) sont respectivement de 200 et de 1 000 copies de génome/L. Pour la méthode de lyse directe, la LDD et la LDQ sont respectivement de 2 000 et 10 000 copies/L. En présence de « *RNA clean & Concentrator 5w* » (Ozyme) pour la méthode de lyse directe, la LDD et la LDQ sont de 1 000 et 5 000 copies/L, respectivement. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

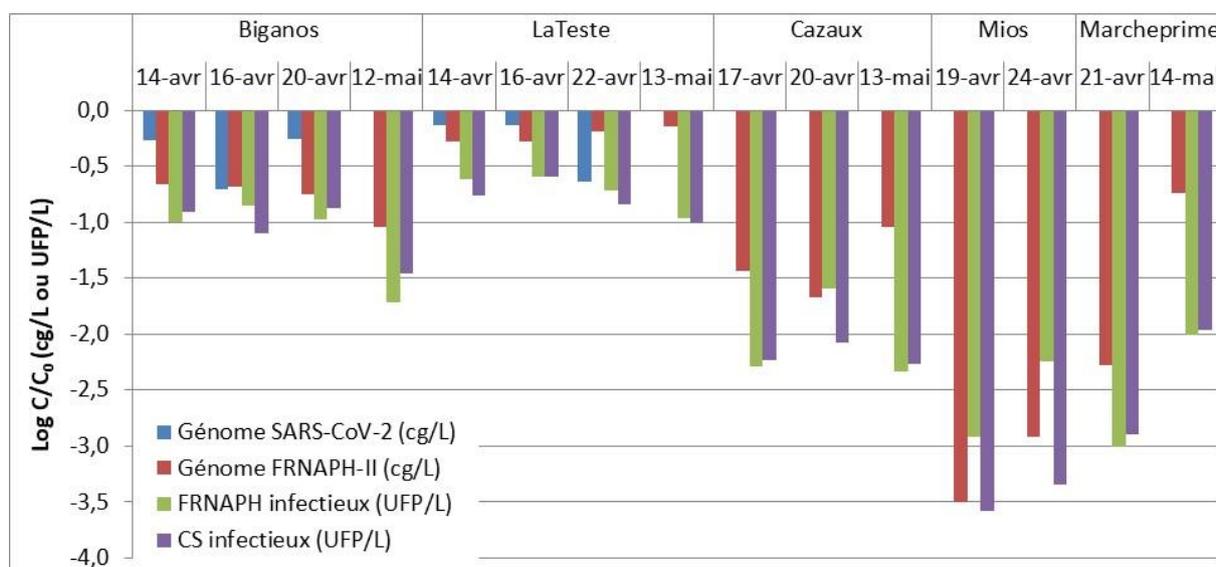
#### **IV.3. QUANTIFICATION DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES ET DES COLIPHAGES SOMATIQUES INFECTIEUX TOTAUX DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITEES**

Les bactériophages fécaux infectieux (FRNAPH et CS) dans les eaux usées brutes et traitées (1,5 mL) ont été quantifiés en utilisant les méthodes décrites par Hartard et al. (2015) et par les normes ISO 10705-(1-2) (2001). La LDD est de 667 phages infectieux (Unité Formant Plage, UFP) par litre d'eaux usées pour les FRNAPH et les CS. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

## V. RESULTATS ET DISCUSSION

### V.1. ACTION 1 : SUIVI DU SARS-CoV-2 ET DES PHAGES FECAUX DANS LES EAUX USEES BRUTES ET TRAITEES AU NIVEAU DU BASSIN D'ARCACHON

Les concentrations en génomes de SARS-CoV-2 et de FRNAPH-II, ainsi que celles en FRNAPH et CS infectieux totaux, ont été déterminées dans les eaux usées brutes et traitées de cinq STEP situées au niveau du Bassin d'Arcachon. Ces analyses ont permis d'estimer les performances des systèmes de traitement des eaux usées vis-à-vis de l'élimination de ces virus entre avril et mai 2020. Pour chaque virus cible, l'efficacité des STEP a été calculée en faisant le rapport entre la concentration virale dans les rejets d'eaux usées (C) et celle retrouvée dans les eaux usées brutes (C<sub>0</sub>). Les résultats d'abattements (**Log C/C<sub>0</sub>**) sont présentés sur la **figure 2**.



cg/L : copies de génome/L.

**Figure 2 : abattements (Log C/C<sub>0</sub>) en génomes (SARS-CoV-2 et FRNAPH-II) et en phages fécaux infectieux (FRNAPH et CS) dans les STEP de Biganos La Teste, Cazaux, Mios et Marcheprime entre avril et mai 2020.**

Le **génome du SARS-CoV-2** a uniquement été détecté entre le 14 et le 22 avril 2020 dans les **eaux usées brutes et traitées dans les stations de Biganos et La Teste**. Les concentrations retrouvées se situaient autour de la LDQ (*i.e.* 1 000 copies de génome/L) en utilisant la méthode d'ultrafiltration. Le génome du SARS-CoV-2 a aussi été détecté à des niveaux inférieurs à la LDQ au niveau des **points « ZI » et « puits du Wharf »** en avril 2020. Ces résultats sont cohérents avec i) la situation épidémiologique en France durant cette période de fin de confinement où le virus circulait activement et, ii) la capacité des stations de Biganos et La Teste à éliminer les génomes viraux. **Pour les autres échantillons analysés durant cette période, le génome du SARS-CoV-2 n'a jamais été détecté.**

Les concentrations en génomes de FRNAPH-II dans les eaux usées brutes et traitées de ces cinq STEP oscillaient entre  $\sim 10^6$ - $10^8$  et  $\sim 10^4$ - $10^7$  copies de génome/L, respectivement. Les différences d'abattements observées entre les STEP peuvent être expliquées par les capacités (eq-ha) et les types de traitement mis en œuvre.

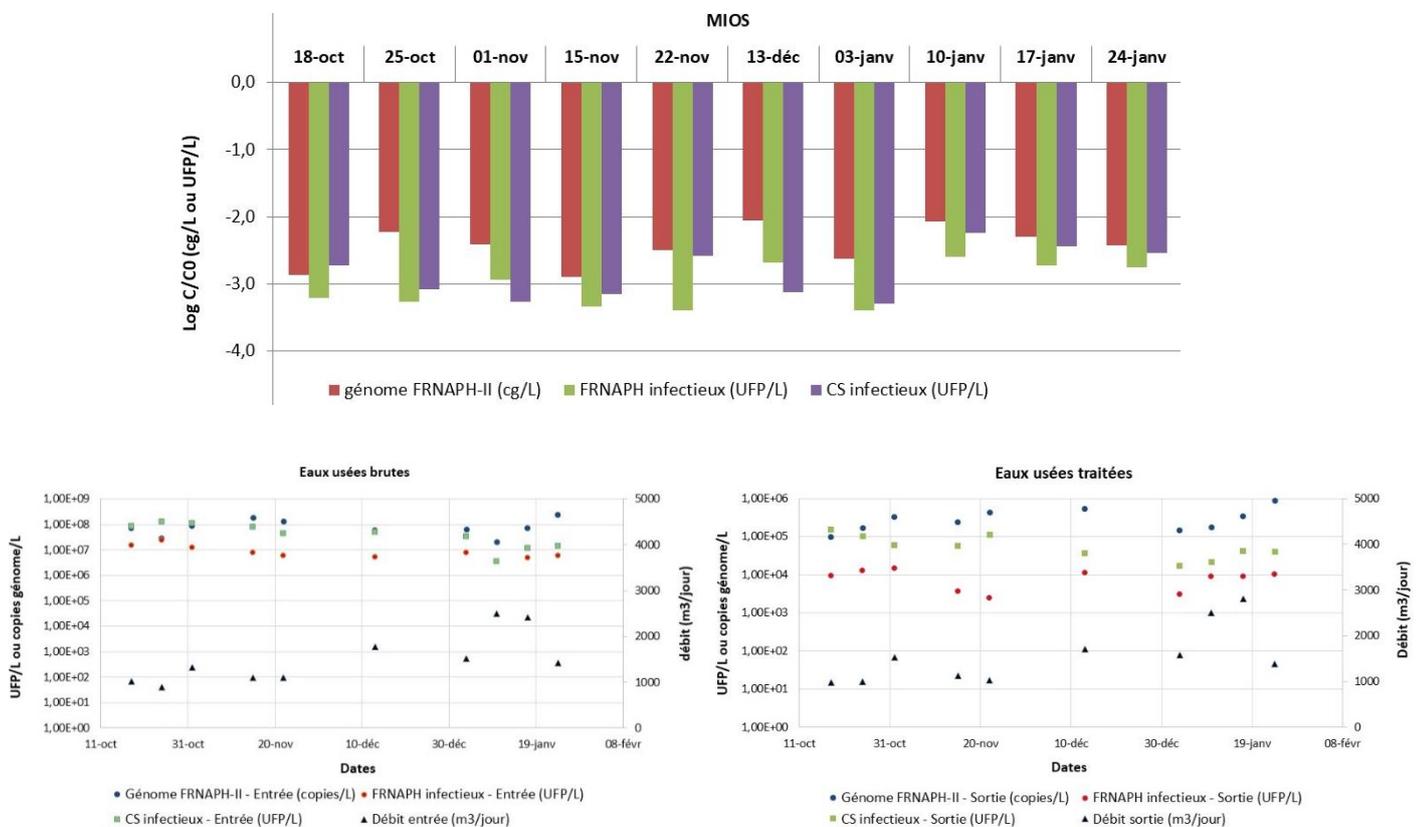
Les concentrations en CS infectieux totaux, compris entre  $\sim 10^6$  et  $10^7$  UFP/L, étaient toujours supérieures d'environ 1,0 Log<sub>10</sub> à celles des FRNAPH infectieux totaux (*i.e.*  $\sim 10^5$ - $10^6$  UFP/L) dans les eaux usées brutes. Dans les rejets d'eaux usées, les teneurs étaient plus fluctuantes car elles dépendaient des capacités et des types de traitement inhérents à chaque STEP. Ces résultats sont en accord avec la

littérature puisque les CS infectieux sont connus pour être **plus abondants** et **plus résistants** que les FRNAPH infectieux dans ces environnements spécifiques (Lucena et al., 2003).

Dans leur ensemble, les résultats de cette étude ont permis de montrer :

- des abattements plus faibles au niveau des stations de Biganos et La Teste (entre 0,5 et 1,5 Log<sub>10</sub>) par comparaison à celles de Cazaux, Mios et Marcheprime (entre 1,0 et 3,5 Log<sub>10</sub>) pour les génomes de SARS-CoV-2 et de FRNAPH-II mais aussi pour les FRNAPH et CS infectieux. Ces différences peuvent en partie être expliquées par le **type de traitement** appliqué dans ces STEP (*i.e.* cultures fixées pour Biganos et La Teste *versus* boues activées pour les trois autres stations).
- des **comportements assez homogènes** au cours du temps pour chaque STEP, avec des abattements en génome viral (FRNAPH-II) et en particules infectieuses (FRNAPH et CS) plutôt similaires. Des différences d'abattements supérieures à 1,0 Log<sub>10</sub> ont cependant été observées sur Marcheprime entre le 21 avril et le 14 mai 2020, aussi bien pour le génome de FRNAPH-II que pour les phages fécaux infectieux. Ces différences pourraient être expliquées par la sensibilité de cette station aux intempéries particulièrement intenses ayant eu lieu le 10 et 11 mai 2020 (*i.e.* évènement classé centennal sur tout notre territoire avec état de catastrophe naturelle).
- des abattements en particules infectieuses la plupart du temps supérieurs à ceux observés pour le génome viral, en prenant les FRNAPH comme référentiel. Néanmoins, des abattements plus faibles en FRNAPH infectieux par rapport au génome de FRNAPH-II ont été observés sur Mios.

Une **étude complémentaire** a été menée entre octobre 2021 et janvier 2022 pour améliorer les connaissances sur le comportement de cette STEP de Mios en termes d'élimination des FRNAPH (infectieux et génome) et des CS infectieux. Les abattements et les concentrations en FRNAPH et CS ont été déterminés pour 10 dates de prélèvements à partir des eaux usées brutes et traitées (**Figure 2bis**).

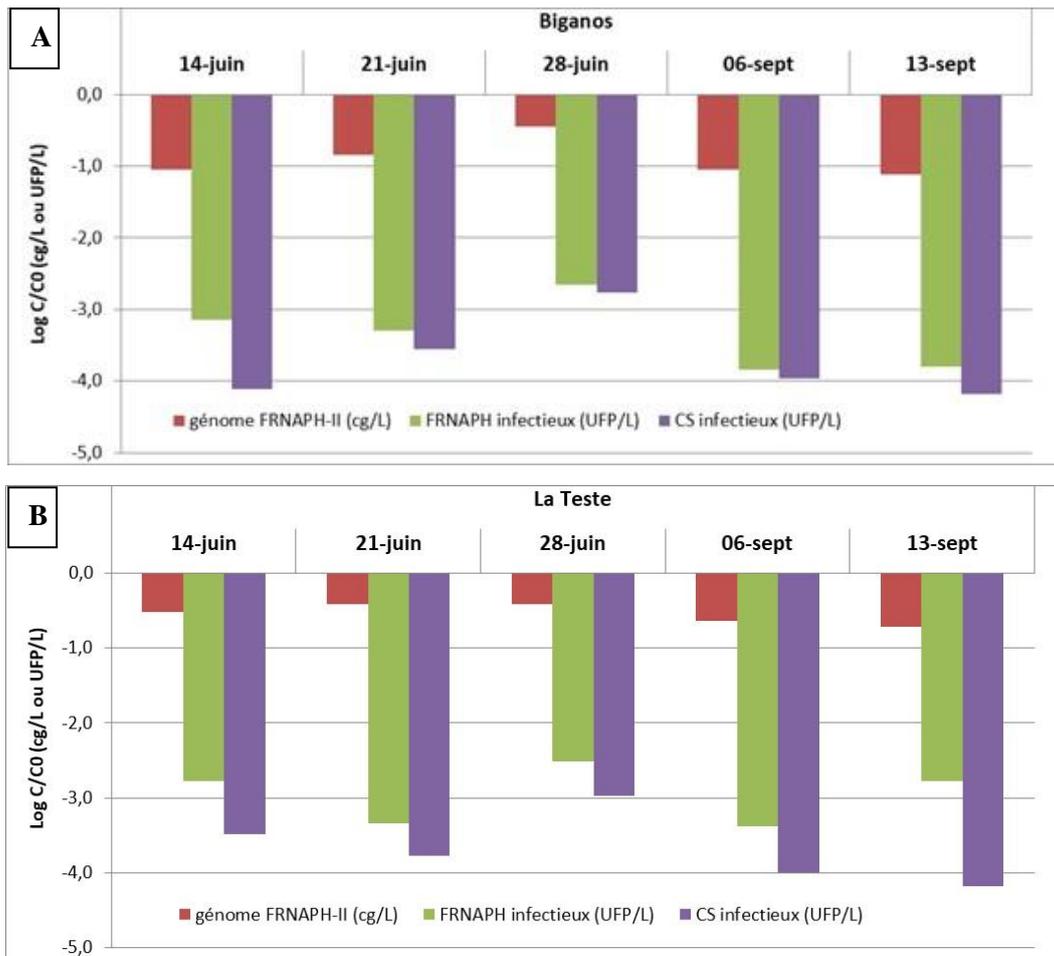


**Figure 2bis : abattements (Log C/C<sub>0</sub>) et concentrations en génomes de FRNAPH-II et en phages fécaux infectieux (FRNAPH et CS) au niveau de la station d'épuration de Mios.**

Les résultats de cette étude complémentaire ont permis d'apporter des précisions sur le comportement de cette station vis-à-vis de l'élimination des virus entériques en prenant les CS et FRNAPH comme indicateurs. Comme pour les autres stations étudiées et en accord avec les données bibliographiques (**Figure 2**), il a tout d'abord été vérifié que le génome des FRNAPH-II a des abattements plus faibles que les FRNAPH infectieux. Ensuite, il a été montré que les concentrations en FRNAPH (infectieux et génome) et CS infectieux dans les eaux usées brutes sont plutôt stables au cours du temps et conformes aux données de la littérature. En revanche, les concentrations de ces mêmes phages fécaux dans les eaux usées traitées sont plus hétérogènes au cours du temps que celles observées en entrée de station. Enfin, cette STEP montre des performances virucides satisfaisantes avec des abattements en phages infectieux similaires et homogènes entre octobre et décembre 2021 (*i.e.* 2,5 à 3,0 Log). Ces abattements sont légèrement plus faibles en janvier 2022 (*i.e.* 2,0 à 2,5 Log). Les abattements en génomes de FRNAPH sont moins homogènes pendant la durée de l'étude (compris entre 2 et 3,0 Log) et donc moins précis pour étudier les performances des STEP. L'impact du débit mériterait d'être exploré pour bien conclure sur son impact.

A ce jour, aucune étude publiée n'a comparé le **comportement du génome du SARS-CoV-2** avec ceux des **phages fécaux** (infectieux et génome) **dans les eaux usées brutes et traitées**. Cette étude a permis d'apporter des informations utiles pour i) estimer en **conditions sécurisantes l'efficacité des STEP** vis-à-vis de l'élimination des virus entériques d'origine hydrique en utilisant les FRNAPH et CS comme indicateurs et, ii) déterminer si des **traitements supplémentaires** appliqués aux eaux usées pourraient être introduits pour améliorer l'efficacité des traitements des eaux usées.

Au regard des faibles abattements obtenus pour les STEP de Biganos et La Teste entre avril et mai 2020, une étude supplémentaire a été conduite entre le 14 juin et le 13 septembre 2021 pour évaluer les performances virucides et le comportement de ces deux stations suite à l'installation d'un nouveau **dispositif de traitement par les UV**. Les doses d'UV<sub>254nm</sub> appliquées sur ces deux STEP étaient comprises entre **10 et 30 mJ/cm<sup>2</sup>**. Les analyses en FRNAPH (infectieux et génome) et CS infectieux en entrée et sortie de station d'épuration ont permis de déterminer les abattements (**Log C/C<sub>0</sub>**) à partir de cinq points prélevés à des intervalles de temps réguliers. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3**.



cg/L : copies de génome/L.

**Figure 3 : abattements (Log C/C<sub>0</sub>) en génomes de FRNAPH-II et en phages fécaux infectieux (FRNAPH et CS) dans les STEP de Biganos [A] et La Teste [B] entre juin et septembre 2021.**

Brièvement, les concentrations en génomes de FRNAPH-II dans les eaux usées brutes et traitées des stations de Biganos et La Teste entre juin et septembre 2021 étaient similaires à celles retrouvées pendant la période avril – mai 2020 (*i.e.*  $\sim 10^7$ - $10^8$  copies de génome/L en entrée de station ;  $\sim 10^6$ - $10^7$  copies de génome/L en sortie de station). Là encore, les teneurs en CS infectieux (*i.e.*  $\sim 10^6$ - $10^7$  UFP/L) étaient supérieures d'environ 1,0 Log<sub>10</sub> à celles des FRNAPH infectieux (*i.e.*  $\sim 10^5$ - $10^6$  UFP/L) dans les eaux usées brutes. Dans les eaux usées traitées, les mêmes tendances étaient observées. Ces résultats confirment donc bien que les CS sont plus abondants et plus résistants que les FRNAPH dans ces environnements hydriques. Par comparaison aux résultats de la **figure 2**, cette étude complémentaire a permis de montrer :

- **un gain** significatif dans les abattements en CS et FRNAPH infectieux au niveau des stations de Biganos et La Teste, de l'ordre de **2,0 à 3,0 Log<sub>10</sub>** supplémentaires. Cette amélioration notable en termes d'élimination des particules virales infectieuses au cours du traitement des eaux usées est principalement liée à l'introduction d'un **nouveau dispositif de traitement par les UV** sur ces deux stations. A l'inverse, les **abattements en génome de FRNAPH-II** restent toujours **inférieurs à 1,0 Log<sub>10</sub>** pour les deux périodes étudiées (*i.e.* avril-mai 2020 et juin-septembre 2021). Ces résultats sont en accord avec les données de littérature concernant l'efficacité virucide des traitements par les UV en fonction de la dose et du temps de contact appliqué (Hijnen et al., 2006). Ils sont également en phase avec les mécanismes d'inactivation virale provoqués par les UV (*i.e.* sensibilité des nucléotides de type uraciles) et le fait que ce traitement affecte principalement l'intégrité du génome

mais sans empêcher la détection de la petite région du génome amplifiée par RT-qPCR (Rockey et al., 2020; Simonet and Gantzer, 2006; Wigginton et al., 2012).

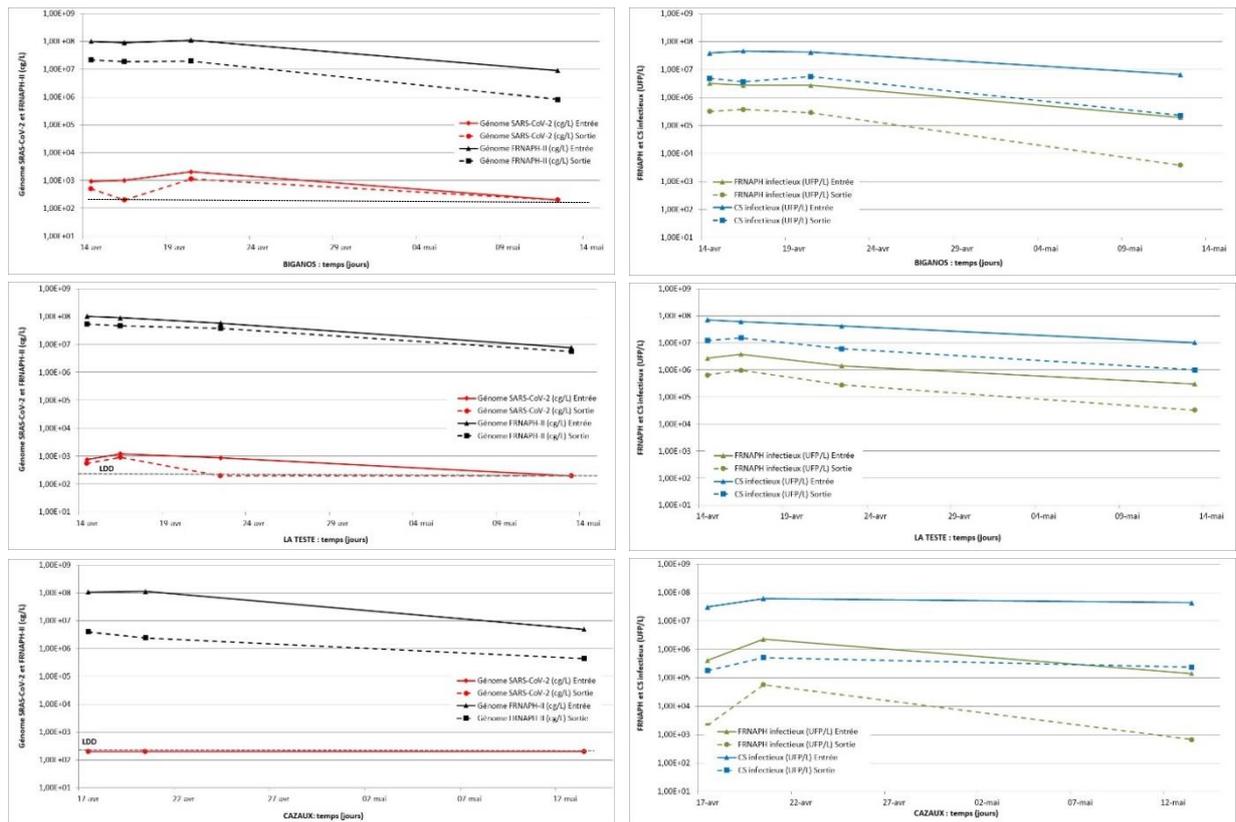
- un **comportement particulièrement homogène et similaire** au cours du temps pour ces deux STEP pendant la période étudiée, avec des abattements plutôt équivalents en génome viral (FRNAPH-II) et en particules infectieuses (FRNAPH et CS) (sauf pour le point du 28 juin 2021).
- des abattements en particules infectieuses cette fois très largement supérieurs à ceux observés pour le génome viral, en prenant les FRNAPH comme référentiel (*i.e.*  $> 2,0 \text{ Log}_{10}$ ). Ce résultat est intimement lié à l'effet induit par les UV au cours du traitement des eaux usées sur ces deux stations. Entre avril et mai 2020, les différences d'abattements entre FRNAPH infectieux et génome des FRNAPH-II n'étaient pas aussi importantes car aucun traitement UV n'était appliqué (**Figure 2**).

Les CS et FRNAPH sont fréquemment proposés comme **indicateurs de la pollution virale** dans les eaux depuis de nombreuses années (Jofre et al., 2016 ; McMinn et al., 2017). Comme décrit par Hartard et al. (2015) et observé ici pour les FRNAPH, le génome viral persiste plus longtemps que ses propres particules infectieuses dans les eaux usées. Ces résultats renforcent ainsi le fait que l'évaluation des performances des STEP doit être établie sur **la base des particules infectieuses *stricto sensu* pour ne pas sous-estimer l'efficacité des traitements**, surtout lorsque des traitements de désinfection comme les UV sont appliquées (Simonet and Gantzer, 2006; Wigginton et al., 2012; Young et al., 2020). Ainsi, il a été mis en évidence que les cinq STEP étudiées possèdent des performances qui leurs sont propres vis-à-vis de l'élimination des virus entériques d'origine hydrique. En avril et mai 2020, elles étaient significativement meilleures sur les STEP de Cazaux, Mios et Marcheprime par comparaison à celles de Biganos et La Teste. Après installation d'un nouveau traitement par les UV sur les STEP de Biganos et La Teste, l'élimination des FRNAPH et CS infectieux atteignaient des niveaux supérieurs aux STEP de Cazaux, Mios et Marcheprime avec des abattements régulièrement supérieurs à  $3,0 \text{ Log}_{10}$ . Ce résultat souligne la **plus-value indiscutable de ce nouveau dispositif de traitement par les UV** pour éliminer les particules virales lors du traitement des eaux usées.

Même s'il aurait été souhaitable de détecter plus fréquemment le SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes et traitées pour gagner en robustesse lors de la première vague épidémique de 2020, un comportement similaire entre le génome du SARS-CoV-2 et le génome du FRNAPH-II a été observé au cours du traitement des eaux usées sur deux stations (différence  $< 0,5 \text{ Log}_{10}$ ).

La détection ponctuelle du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées traitées à des niveaux autour de la LDQ (*i.e.* 1 000 copies/L) sur les STEP de Biganos et La Teste en avril 2020 **ne signifie pas que des particules infectieuses de SARS-CoV-2 ont été disséminées dans l'environnement**. Tout d'abord, il est bien établi que le génome viral persiste plus longtemps que les virus infectieux dans les eaux usées. Ceci a été récemment renforcé par le fait que la survie du SARS-CoV-2 infectieux dans les eaux usées brutes est particulièrement faible à 20°C (Varbanov et al., 2021). Au regard des abattements significatifs en phages fécaux infectieux obtenus sur ces STEP et de la survie largement supérieure des virus nus (*i.e.* FRNAPH et CS) par rapport aux virus enveloppés (*i.e.* SARS-CoV-2) dans l'environnement et les eaux usées (Aboubakr et al., 2020 ; Mohan et al., 2021 ; Varbanov et al., 2021), il est possible d'affirmer que ces STEP possèdent des **performances suffisantes et sécurisantes** pour éliminer les virus entériques d'origine hydrique (incluant le SARS-CoV-2). L'intérêt d'utiliser les **phages fécaux infectieux** pour évaluer le **comportement des STEP** et leur **efficacité dans des conditions sécurisantes** vis-à-vis des virus entériques est ici clairement apporté.

Enfin, ces résultats ont été présentés sous forme de **suites des concentrations** du génome viral (SARS-CoV-2 et FRNAPH-II) et des phages fécaux infectieux (CS et FRNAPH) dans les eaux usées brutes et traitées entre avril et mai 2020 (**Figure 4**).



**Figure 4 : évolutions au cours du temps des teneurs en génome viral (SARS-CoV-2 et FRNAPH-II) et en phages fécaux infectieux (FRNAPH et CS) dans les eaux usées brutes et traitées des STEP de Biganos, La Teste et Cazaux entre avril et mai 2020.**

Brièvement, les résultats montrent un certain parallélisme entre les teneurs retrouvées en entrée et en sortie de STEP, confirmant cette **homogénéité dans les fonctionnements des trois stations** où cette représentation était possible. Pour les stations de Mios et Marchepime, le nombre de points de prélèvements était insuffisant. Ces résultats montrent aussi l'abondance plus élevée des CS infectieux par rapport aux FRNAPH infectieux ( $\sim 1,0 \text{ Log}_{10}$ ) dans les eaux usées brutes et traitées. En se basant sur les FRNAPH uniquement, il est aussi possible d'observer une persistance supérieure du génome viral par rapport aux particules infectieuses (de l'ordre de 1,0 à 2,0  $\text{Log}_{10}$ ). Enfin, les concentrations légèrement plus faibles en FRNAPH (infectieux et génome) et CS infectieux en mai 2020 par rapport à avril 2020 sont expliquées par le **phénomène de pluie diluvienne** occasionné le 11 mai 2020.

## V.2. ACTION 2 : SURVEILLANCE EPIDEMIOLOGIQUE DU SARS-CoV-2 DANS LES EAUX USEES BRUTES AU NIVEAU DU BASSIN D'ARCACHON

Dans le cadre de la surveillance épidémiologique du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes initiée par le réseau OBEPINE en mars 2020, le SIBA et ELOA faisaient partie des précurseurs en France dans la mise en place de cette surveillance locale au niveau des communes entourant le bassin d'Arcachon. Pour rappel, la mise en place d'une surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées est recommandée par l'UE (Journal Officiel de l'Union Européenne, 2021).

Cette présente étude a débuté le **14 avril 2020** et se poursuivra *a minima* jusqu'à la **fin de l'année 2021**. Entre le démarrage de ce suivi et le 08 octobre 2021, **281 échantillons** ont été analysés à partir de plusieurs STEP et différents points de collecte (**Tableau 1**).

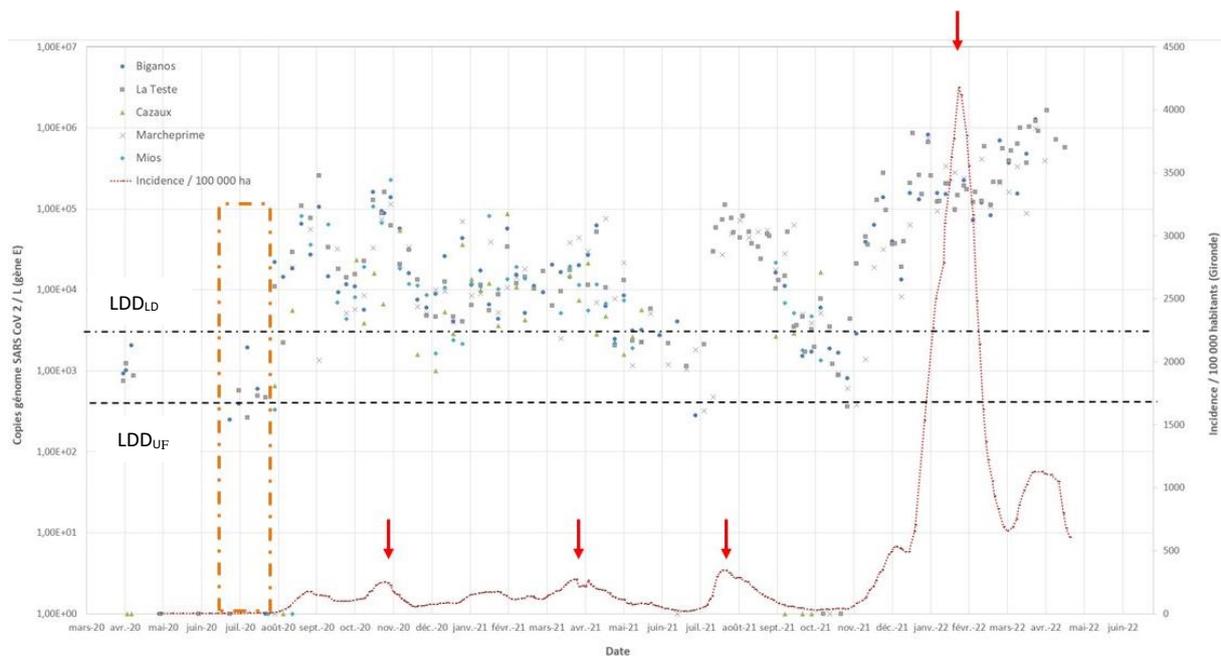
**Tableau 1 : répartition des analyses en génomes de SARS-CoV-2 dans les eaux usées effectuées au niveau du bassin d'Arcachon entre avril 2020 et avril 2022.**

STEP	Nombre éch analysés
La Teste	132 (dont 40 financées par Obepine)
Biganos	86
Marcheprime	79
Mios	43
Cazaux	36
Autres : Jane de Boy, Règue verte, Audenge, ZI, puit Wharf, Smurfit)	9
<b>Total</b>	<b>385</b>

En ciblant une région spécifique codant le gène E du génome du SARS-CoV-2, les concentrations hebdomadaires en SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes des cinq STEP principales (i.e. Biganos, La Teste, Marcheprime, Mios et Cazaux) entre avril 2020 et avril 2022 sont présentées sur la **Figure 5**. Le taux d'incidence en Gironde, correspondant au nombre de personnes infectées rapporté à la taille de la population pour 100 000 habitants, est également présenté. Ces données ont été récupérées sur le site <https://www.gouvernement.fr/info-coronavirus/carte-et-donnees>. Le **fichier excel consolidé** contenant les graphiques et l'ensemble des données de surveillance du SARS-CoV-2 sur les différentes stations étaient transmis chaque semaine au SIBA.

En 2020, ces résultats étaient transférés au LCPME (membre du ccos du réseau OBEPINE) pour consolider les données sur le territoire national et avoir un aperçu global sur la circulation du virus.

Entre janvier 2021 et avril 2022, les résultats ont été transférés puis modélisés par le réseau OBEPINE sur la base du gène E du génome du SARS-CoV-2, ce qui a permis de générer plus de **200 rapports** qui ont été diffusés de manière hebdomadaires au SIBA, à ACTALIA, aux autorités sanitaires (ARS Nouvelle Aquitaine) et aux élus locaux. Ces rapports modélisés sont en accès libre sur le site du réseau OBEPINE (<https://www.reseau-obepine.fr/>). D'ailleurs, ces cinq STEP principales font partie depuis janvier 2021 des 200 stations d'épuration suivies de manière bihebdomadaire par le réseau OBEPINE. Des exemples de rapports modélisés OBEPINE des stations de La Teste, Biganos et Marcheprime datant du 30 avril 2022 sont présentés dans l'**Annexe 1**.



*LDD<sub>UF</sub>* ; limite de détection pour la méthode d'ultrafiltration ; *LDD<sub>LD</sub>* : limite de détection pour la méthode de lyse directe.  
*Flèche rouge* : pics épidémiques du SARS-CoV-2 observés dans la population française.

**Figure 5 : teneurs en génomes de SARS-CoV-2 dans les cinq STEP du bassin d'Arcachon, comparées au taux d'incidence dans le département de la Gironde entre avril 2020 et avril 2022.**

Comme démontrée précédemment par des études pionnières sur le sujet (Medema et al., 2020 ; Wurtzer et al., 2020) puis largement appliquée dans de nombreux pays à travers le monde, la surveillance locale de la circulation du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes entre avril 2020 et avril 2022 au niveau du bassin d'Arcachon vient renforcer l'intérêt de ce type d'approche. Cet **indicateur « SARS-CoV-2 dans les eaux usées »** présente les mêmes avantages et inconvénients que ceux déjà rapporté régulièrement par la communauté scientifique.

Les avantages de cette approche sont de :

1. suivre les **tendances de circulation locale (à la hausse ou à la baisse) du virus** dans les populations rattachées à un réseau de collecte et de les corrélérer avec le taux d'incidence. Ce phénomène s'observe bien sur la **Figure 5** entre septembre 2020 et avril 2022.
2. anticiper sur les **résurgences locales du SARS-CoV-2** quand le virus ne circule pas ou peu dans les populations. Comme observé sur la **Figure 5** après la sortie du premier confinement en France entre juin et août 2020, le génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes est détecté avant l'augmentation du taux d'incidence. Ce phénomène s'explique par le fait que cet indicateur tient compte des individus infectés (symptomatiques et asymptomatiques) et excréteurs du virus dans les selles qui vont ensuite se retrouver dans les eaux usées urbaines.
3. contrôler localement **l'efficacité des stratégies de vaccination** et de constituer un **véritable indicateur** du suivi de la circulation du virus dans un contexte de réduction des tests de dépistage du SARS-CoV-2 à l'échelle de l'individu. Cet aspect est visualisable sur la **Figure 5** entre mai 2021 et octobre 2021 (variant Delta) et entre janvier et avril 2022 (variant Omicron) mais les données restent difficiles à interpréter. Ici, il est en effet nécessaire d'intégrer i) la couverture vaccinale dans une population donnée, ii) les restrictions sanitaires en vigueur qui limitent la circulation du virus et, iii) l'impact de la vaccination sur les niveaux d'excrétion du SARS-CoV-2 dans les selles humaines. Tout cet ensemble est exploré par la communauté scientifique pour, *in fine*, utiliser durablement cet indicateur pour l'application des **mesures préventives ou des restrictions sanitaires** pour limiter la circulation du virus dans les populations.

A l'inverse, les limites de cette approche sont de :

1. ne pas pouvoir **relier** la concentration en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées avec un nombre établi de personnes infectées car i) toutes les personnes atteintes de la Covid-19 (symptomatiques et asymptomatiques) ne sont pas excrétrices de virus dans les selles et, ii) la durée d'excrétion de la charge virale dans les selles est variable d'un individu à l'autre.
2. ne pas disposer de **méthodes harmonisées** au niveau européen concernant la recherche quantitative du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Sous l'impulsion du réseau **Sum'Eau** piloté par le LHN et l'AFNOR, des groupes de travail d'experts ont été constitués pour mettre en place et valider des protocoles d'extraction et de quantification harmonisés du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées. Actalia fait partie des groupes de travail dédiés à l'extraction et à la détection du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées.
3. ne pas **discriminer les particules infectieuses des particules non infectieuses du SARS-CoV-2** car seul le génome viral est détecté dans ces échantillons d'eaux usées.
4. avoir des **limites de détection qui restent encore élevées** (autour de 1 000 copies de génome/L), rendant parfois complexe l'interprétation des résultats négatifs ou ceux situés autour de cette limite de détection. L'amélioration des méthodes d'extraction du génome viral constitue un enjeu prioritaire pour abaisser cette limite de détection et gagner en robustesse. Différentes stratégies sont actuellement en train d'être investiguées dans le cadre d'un projet inhérent au réseau OBEPINE (dans lequel ACTALIA participe).
5. ne pas pouvoir identifier de manière fiable et précoce les **variants considérés comme préoccupants par l'OMS** dans les eaux usées car i) la quantité de génome viral est souvent limitante, ii) les génomes peuvent être dégradés ou incomplets et, iii) une large diversité de séquences virales est présente dans les eaux usées. De nombreuses approches ont été publiées mais aucune d'entre elles ne fait à ce jour l'unanimité. A ce jour, il est bien plus aisé et rapide d'identifier un variant dans un prélèvement naso-pharyngé car les méthodes sont adaptées et les séquences virales sont facilement disponibles au sein des laboratoires hospitalo-universitaires.

Enfin, il est important de souligner que l'**importance de la dernière vague épidémique** (janvier 2022) due au **variant Omicron** en termes de nombre de cas rapportés pour 100 000 habitants est expliquée par i) sa contagiosité supérieure au variant Delta, ii) l'échappement à l'immunité collective en raison du fort taux de mutation observé sur la région codant pour la protéine « Spike » de ce dernier variant et, iii) à l'abaissement des mesures de restriction appliquées par le gouvernement.

Dans le cadre du réseau Obépine et en collaboration avec Eau de Paris et le LCPME, Actalia a publié un **article scientifique** dans la revue internationale « *Science of the Total Environment* » concernant la **dynamique de circulation des deux sous variants Omicron (BA.1 et BA.2) dans plusieurs stations d'épuration françaises intégrées au réseau, dont celle de La Teste**. Le SIBA est cité dans les remerciements car il a participé à la collecte et aux financements d'une partie de cette étude.

## VI. CONCLUSION GENERALE

Les objectifs de ce projet consistaient dans une **première action** à évaluer dans des conditions sécurisantes les performances de différentes stations d'épuration au niveau du bassin d'Arcachon vis-à-vis de l'élimination des virus entériques d'origine hydrique. Il s'agissait aussi d'évaluer la dispersion potentielle du SARS-CoV-2 dans les eaux usées traitées. Dans une **seconde action**, l'objectif reposait sur le suivi local de la circulation du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes de plusieurs stations d'épuration entourant le bassin d'Arcachon.

En utilisant les **bactériophages fécaux (FRNAPH et CS) comme indicateurs**, cette première action a permis d'évaluer en conditions sécurisantes l'efficacité des systèmes de traitement des eaux usées vis-à-vis de l'élimination des virus entériques. Sur la base des abattements en FRNAPH et CS infectieux,

les performances des STEP suivaient la séquence suivante entre avril et mai 2020 : Mios > Marcheprime ≥ Cazaux > Biganos ≥ La Teste. Pour améliorer le traitement des eaux usées sur les stations de Biganos et La Teste, un **nouveau dispositif de traitement par les UV** a été installé en 2021. En reproduisant cette étude entre juin et septembre 2021 pour ces deux stations, il a été montré des abattements en phages fécaux infectieux très satisfaisants avec des gains supérieurs à 2,0-3,0 Log<sub>10</sub> par rapport à la précédente évaluation menée en 2020. Une étude complémentaire a également été menée sur la station de Mios pour suivre son comportement et ses performances à éliminer les virus entériques entre octobre 2021 et janvier 2022.

Ensuite, le **génom**e de SARS-CoV-2 dans les eaux usées traitées a été détecté de manière ponctuelle fin avril 2020 au niveau des stations de Biganos et La Teste mais aussi au niveau des points « ZI » et « puits du Wharf », avec des teneurs oscillant autour de la limite de quantification (*i.e.* 1 000 copies de génome/L). Cette **faible occurrence en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées traitées**, associée à une faible survie du virus infectieux dans cet environnement hydrique, permet de conclure sur une très faible probabilité de dissémination du SARS-CoV-2 infectieux dans le milieu.

Dans la seconde action, la **surveillance épidémiologique de la circulation du SARS-CoV-2 dans les populations** en quantifiant une région codant le gène E de son génome viral dans les eaux usées brutes de différentes STEP au niveau du Bassin d’Arcachon a été effectuée entre avril 2020 et avril 2022. Ce suivi hebdomadaire de 24 mois a permis d’analyser pas moins de **385 échantillons** durant cette période. Les résultats ont contribué à renforcer l’intérêt de cet **indicateur** dans les eaux usées tout en rappelant les avantages et les inconvénients de cette approche. Les résultats de cette surveillance locale du virus dans le bassin d’Arcachon ont été intégralement transférés au réseau OBEPINE et les cinq stations majeures de cette action font partie depuis janvier 2021 du maillage national des 200 stations d’épuration suivies de manière bihebdomadaire par le réseau OBEPINE. La surveillance du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes continuera d’être suivie **mensuellement** au niveau de la station de Marcheprime.

Par ailleurs, Actalia (et donc indirectement le SIBA) ont collaboré avec le réseau OBEPINE pour suivre la dynamique de circulation du **variant Omicron** dans plusieurs stations d’épuration françaises intégrées au réseau, dont celle de La Teste. Une publication scientifique a été acceptée dans la revue internationale « *Science of the Total Environment* » (Wurtzer et al., *Monitoring of SARS-CoV-2 variant dynamics in wastewater by digital RT-PCR : from Alpha to Omicron 2 BA.2 VOC*).

Lien vers la publication : <https://medrxiv.org/cgi/content/short/2022.04.04.22273320v1>

Les **perspectives** de ce projet seront discutées en septembre 2022 où il est prévu d’aborder :

- le suivi des performances de Mios et Marcheprime après installation d’un traitement UV-C,
- le suivi des performances de Cazaux et de l’impact de la désinfection par l’acide performique.

## VII. REMERCIEMENTS

Les partenaires de ce présent projet remercient le LCPME, et notamment le Professeur Christophe Gantzer et la Maître de Conférence Isabelle Bertrand, pour le transfert des méthodes d’extraction et de quantification du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes et traitées. Le LCPME a également apporté son expertise scientifique au projet *via* l’**Unité Mixte Technologique (UMT) ACTIA VIROcontrol**, agréée par le Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation (<https://www.actia-asso.eu/projets/virocontrol-2>).

Les partenaires du projet remercient également le réseau OBEPINE pour leur expertise, le développement des protocoles d’extraction et de quantification du génome du SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes, l’organisation des essais inter-laboratoires et la consolidation des données sur l’occurrence en génome de SARS-CoV-2 dans les eaux usées brutes à l’échelle nationale.

## VIII. REFERENCES

- Aboubakr, H.A., Sharafeldin, T.A., and Goyal, S.M. (2020). Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review. *Transbound. Emerg. Dis.*
- Bertrand, I., Schijven, J.F., Sánchez, G., Wyn-Jones, P., Ottoson, J., Morin, T., Muscillo, M., Verani, M., Nasser, A., de Roda Husman, A.M., et al. (2012). The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J. Appl. Microbiol.* *112*, 1059–1074.
- Corman, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brünink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Eurosurveillance* *25*.
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Morris, D.H., Holbrook, M.G., Gamble, A., Williamson, B.N., Tamin, A., Harcourt, J.L., Thornburg, N.J., Gerber, S.I., et al. (2020). Aerosol and surface stability of HCoV-19 (SARS-CoV-2) compared to SARS-CoV-1. *MedRxiv*.
- Foladori, P., Cutrupi, F., Segata, N., Manara, S., Pinto, F., Malpei, F., Bruni, L., and La Rosa, G. (2020). SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review. *Sci. Total Environ.* *743*, 140444.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., and Gantzer, C. (2015). Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. *Appl. Environ. Microbiol.* *81*, 6505–6515.
- Hijnen, W. a. M., Beerendonk, E.F., and Medema, G.J. (2006). Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.* *40*, 3–22.
- ISO 10705-1 (2001). Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 1: Enumeration of F-specific RNA bacteriophages. *Int. Organ. Stand. Geneva Switz.* 19.
- ISO 10705-2 (2001). Water quality — Detection and enumeration of bacteriophages — Part 2: Enumeration of somatic coliphages. *Int. Organ. Stand. Geneva Switz.* 16.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A., and Muniesa, M. (2016). Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water* *8*, 199.
- Journal Officiel de l'Union Européenne (2021). Recommandation (UE) 2021/472 concernant une approche commune pour la mise en place d'une surveillance systématique de la présence du SARS-CoV-2 et de ses variants dans les eaux usées de l'Union européenne 17 mars 2021.
- Liu, J., Xiao, Y., Shen, Y., Shi, C., Chen, Y., Shi, P., Gao, Y., Wang, Y., and Lu, B. (2020). Detection of SARS-CoV-2 by RT-PCR in anal from patients who have recovered from coronavirus disease 2019. *J. Med. Virol.* *92*, 1769–1771.
- Lucena, F., Méndez, X., Morón, A., Calderón, E., Campos, C., Guerrero, A., Cárdenas, M., Gantzer, C., Shwartzbrood, L., Skrabber, S., et al. (2003). Occurrence and densities of bacteriophages proposed as indicators and bacterial indicators in river waters from Europe and South America. *J. Appl. Microbiol.* *94*, 808–815.
- McMinn, B.R., Ashbolt, N.J., and Korajkic, A. (2017). Bacteriophages as indicators of fecal pollution and enteric virus removal. *Lett. Appl. Microbiol.* *65*, 11–26.
- Medema, G., Been, F., Heijnen, L., and Petterson, S. (2020). Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: Opportunities and challenges. *Curr. Opin. Environ. Sci. Health* *17*, 49–71.
- Mocé-Llivina, L., Muniesa, M., Pimenta-Vale, H., Lucena, F., and Jofre, J. (2003). Survival of Bacterial Indicator Species and Bacteriophages after Thermal Treatment of Sludge and Sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* *69*, 1452–1456.

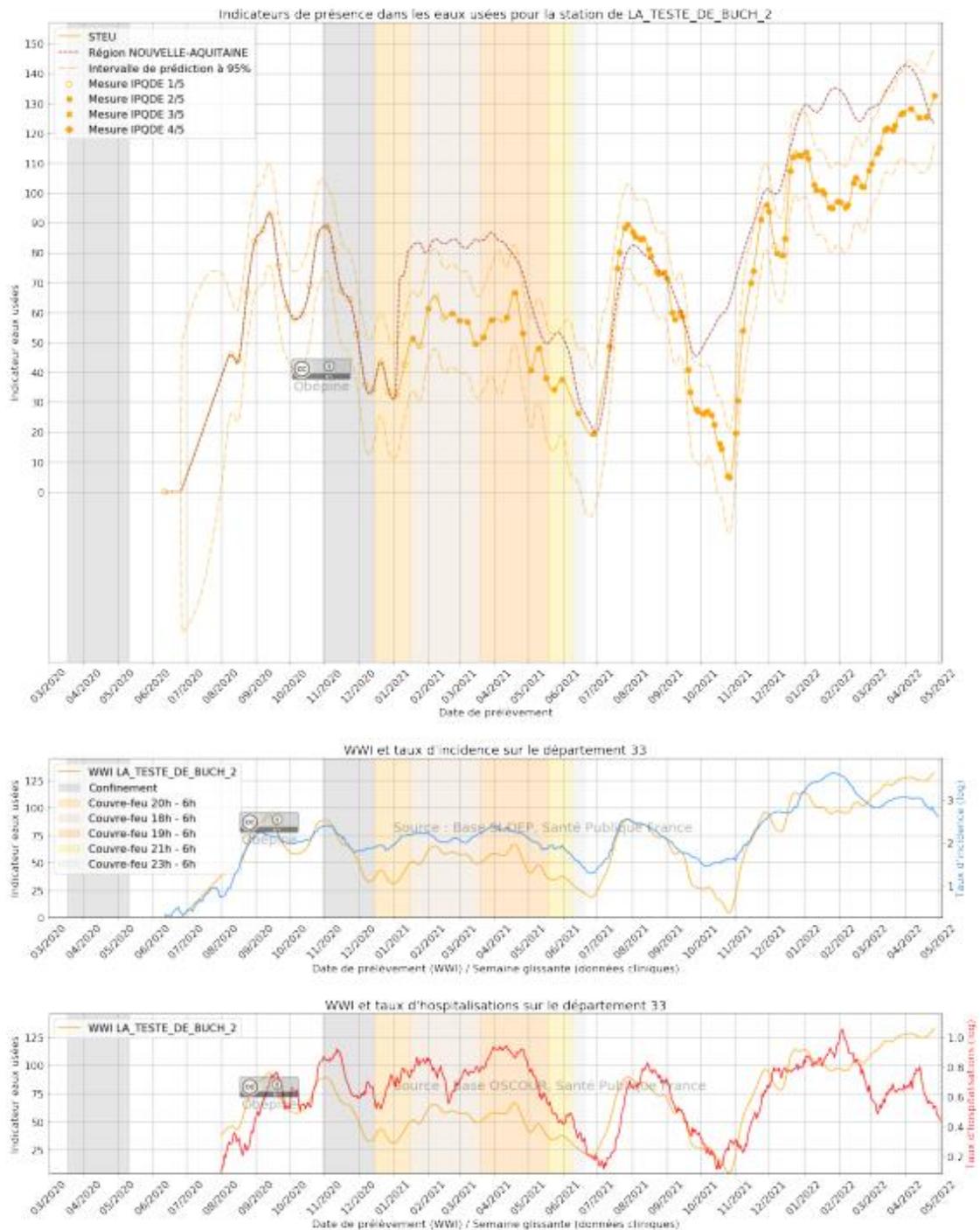
- Mohan, S.V., Hemalatha, M., Kopperi, H., Ranjith, I., and Kumar, A.K. (2021). SARS-CoV-2 in environmental perspective: Occurrence, persistence, surveillance, inactivation and challenges. *Chem. Eng. J. Lausanne Switz.* 1996 405, 126893.
- NF EN ISO 15216-1 (2017). Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 1: Method for quantification. *Int. Organ. Stand. Geneva Switz.* 63.
- Rockey, N., Young, S., Kohn, T., Pecson, B., Wobus, C.E., Raskin, L., and Wigginton, K.R. (2020). UV Disinfection of Human Norovirus: Evaluating Infectivity Using a Genome-Wide PCR-Based Approach. *Environ. Sci. Technol.* 54, 2851–2858.
- Sidhu, J.P.S., Sena, K., Hodgers, L., Palmer, A., and Toze, S. (2018). Comparative enteric viruses and coliphage removal during wastewater treatment processes in a sub-tropical environment. *Sci. Total Environ.* 616–617, 669–677.
- Simonet, J., and Gantzer, C. (2006). Inactivation of Poliovirus 1 and F-Specific RNA Phages and Degradation of Their Genomes by UV Irradiation at 254 Nanometers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7671–7677.
- Varbanov, M., Bertrand, I., Philippot, S., Retourney, C., Gardette, M., Hartard, C., Jeulin, H., Duval, R.E., Loret, J.-F., Schvoerer, E., et al. (2021). Somatic coliphages are conservative indicators of SARS-CoV-2 inactivation during heat and alkaline pH treatments. *Sci. Total Environ.* 797, 149112.
- Wigginton, K.R., Pecson, B.M., Sigstam, T., Bosshard, F., and Kohn, T. (2012). Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.* 46, 12069–12078.
- Wolf, S., Hewitt, J., and Greening, G.E. (2010). Viral multiplex quantitative PCR assays for tracking sources of fecal contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1388–1394.
- Wurtzer, S., Marechal, V., Mouchel, J.-M., Maday, Y., Teyssou, R., Richard, E., Almayrac, J.L., and Moulin, L. (2020). Evaluation of lockdown impact on SARS-CoV-2 dynamics through viral genome quantification in Paris wastewaters (*Epidemiology*).
- Young, S., Torrey, J., Bachmann, V., and Kohn, T. (2020). Relationship Between Inactivation and Genome Damage of Human Enteroviruses Upon Treatment by UV254, Free Chlorine, and Ozone. *Food Environ. Virol.* 12, 20–27.
- Zhang, Y., Chen, C., Song, Y., Zhu, S., Wang, D., Zhang, H., Han, G., Weng, Y., Xu, J., Xu, J., et al. (2020). Excretion of SARS-CoV-2 through faecal specimens. *Emerg. Microbes Infect.* 1–28.
- Zhang, Y., Cen, M., Hu, M., Du, L., Hu, W., Kim, J.J., and Dai, N. (2021). Prevalence and Persistent Shedding of Fecal SARS-CoV-2 RNA in Patients With COVID-19 Infection: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin. Transl. Gastroenterol.* 12, e00343.

## IX. ANNEXE 1

Rapports modélisés transmis par le réseau OBEPINE chaque semaine au SIBA, aux autorités sanitaires (ARS Nouvelle Aquitaine) et aux élus locaux.

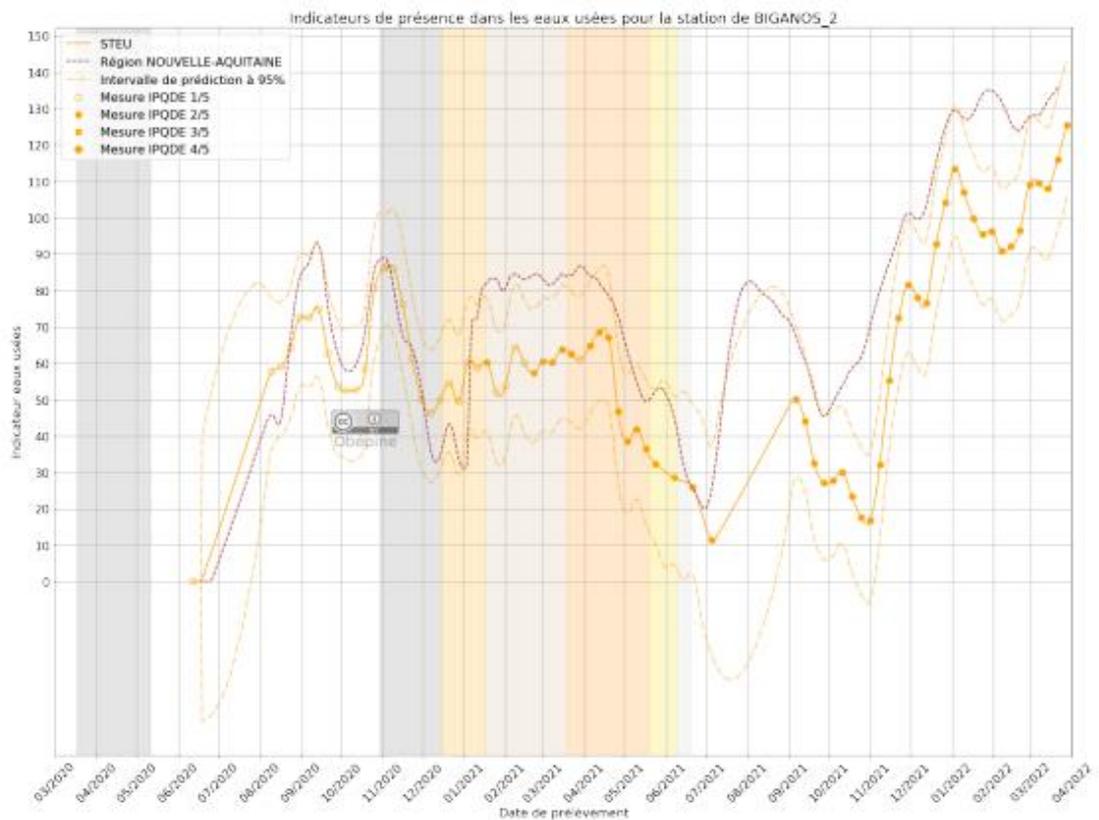
### Cas 1 : extrait du rapport OBEPINE concernant La Teste

## 3 Résultats d'analyses sur l'ensemble de l'historique



## Cas 2 : extrait du rapport OBEPINE concernant Biganos

### 3 Résultats d'analyses sur l'ensemble de l'historique



## Cas 3 : extrait du rapport OBEPINE concernant Marcheprime

### 3 Résultats d'analyses sur l'ensemble de l'historique

