

Virologie et Station d'épuration

**SURVEILLANCE DE LA QUALITE VIROLOGIQUE DES EAUX
ET DES HUITRES AU NIVEAU DU BASSIN D'ARCACHON**

Rapport intermédiaire (période 2021-2022)

Juillet 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

Sommaire

I.	INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	1
I.1.	Contexte.....	1
I.2.	Les norovirus humains	2
I.3.	Réservoirs primaires et secondaires	3
I.4.	Vulnérabilité des mollusques bivalves vivants vis-à-vis des virus entériques	4
I.5.	Réglementation en vigueur.....	5
I.6.	Méthodes de détection des virus entériques dans les coquillages et l'eau.....	7
I.6.1.	Détection du génome des norovirus dans les aliments	7
I.6.2.	Apport des bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs des norovirus.....	7
I.7.	Apport des dreissènes pour améliorer la surveillance virale des eaux	10
II.	OBJECTIFS	12
III.	MATERIELS ET METHODES	13
III.1.	Zone d'étude et échantillonnage.....	13
III.2.	Détection et quantification du génome des norovirus dans les eaux et les coquillages.....	14
III.3.	Quantification des phages ARN F-spécifiques infectieux totaux dans les eaux et les coquillages.....	15
III.4.	Analyses statistiques.....	16
IV.	RESULTATS ET DISCUSSION	17
IV.1.	Contrôle de l'empreinte « eau usée traitée » (station de Biganos)	17
IV.2.	Surveillance des norovirus et des phages ARN F-spécifiques dans les huîtres et les dreissènes	18
V.	CONCLUSION INTERMEDIAIRE ET PERSPECTIVES	20
VI.	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	21
VII.	ANNEXE 1.....	25

I. INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. CONTEXTE

Les virus entériques pathogènes véhiculés par l'eau et les aliments, et notamment les **norovirus humains (NoV)** responsables des gastro-entérites aiguës, sont fréquemment impliqués dans les toxi-infections alimentaires (TIAC) en Europe et aux USA (CDC, 2022; EFSA and ECDC, 2022). Depuis 2010, les TIAC d'origine virale représentent **au moins 9,8% et 35%** de l'ensemble des épidémies alimentaires rapportées en Europe et aux USA, respectivement. En 2014, la proportion de TIAC causées par ces virus était de 20,4%, les plaçant en 1^{ère} position des agents pathogènes répertoriés (EFSA, 2015). Selon les années, les NoV oscillent entre la 1^{ère} et 4^{ème} position des agents étiologiques. Enfin, les NoV sont souvent les pathogènes les plus impliqués en nombre de cas annuels suite à des épisodes de TIAC (EFSA and ECDC, 2022). **Entre 2006 et 2015 en France, entre 50 et 100 TIAC virales** suspectées ou confirmées (impliquant surtout les NoV) ont été déclarées chaque année (Santé Publique France, 2021). La **figure 1** décrit les proportions d'épidémies alimentaires liées aux principaux microorganismes pathogènes en Europe entre 2010 et 2020.

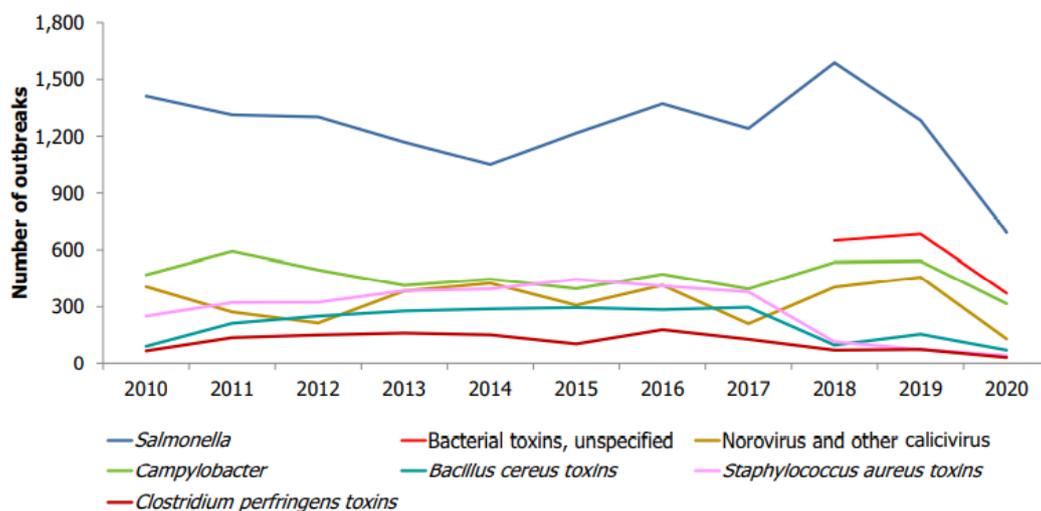


Figure 1 : nombre d'épidémies alimentaires causées par agent étiologique chaque année entre 2010 et 2020 dans les Etats Membres de l'UE (EFSA and ECDC, 2022).

Il est désormais bien établi que les TIAC liées à la consommation de coquillages vivants (*e.g.* huîtres, moules, coques, palourdes) ou de végétaux frais ou surgelés (*e.g.* fruits rouges, salades, herbes aromatiques) sont majoritairement causées par les virus entériques pathogènes, surtout les NoV (CDC, 2022; EFSA and ECDC, 2022). C'est ainsi que le risque viral dans les aliments ou l'eau n'est plus considéré comme un risque émergent mais comme un **risque avéré** au regard des données épidémiologiques, des données de surveillance et des alertes sanitaires diffusées par Santé Publique France ou le réseau Européen « *Rapid Alert System for Food and Feed* » (RASFF).

Depuis 2013, des méthodes standardisées pour la **recherche qualitative ou quantitative du génome des NoV (GI et GII) dans les aliments à risque** (*i.e.* coquillages, végétaux frais et congelés, eau) ont été publiées (NF EN ISO 15216-1, 2017; NF EN ISO 15216-2, 2019). Cependant, elles présentent **l'inconvénient de ne pas apporter d'information sur le caractère infectieux des virus** lorsque le génome de ces virus est détecté dans un aliment.

Au niveau réglementaire, aucun critère n'est établi à ce jour en Europe concernant la gestion des NoV dans les aliments à risque. Il existe cependant une **instruction technique** actualisée chaque année concernant la gestion du risque à NoV en lien avec la consommation de coquillages (DGAL, 2021).

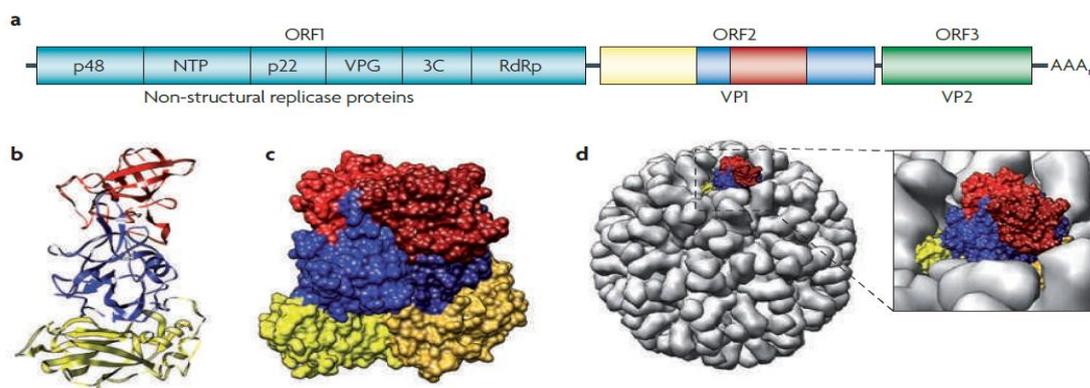
A ce jour, le **Bassin d’Arcachon** n’a enregistré qu’un seul épisode de fermeture administrative pour cause de TIAC à NoV dans les coquillages dans le cadre de l’instruction technique de la DGAL. C’était en février 2021. Par comparaison aux autres zones conchylicoles du littoral français, cette zone est considérée comme particulièrement peu vulnérable vis-à-vis du risque à NoV dans les coquillages bivalves vivants. Vigilant sur les problématiques que peuvent rencontrer les professions conchylicoles en lien avec la qualité de l’eau, le SIBA effectue depuis 2012 un travail de **surveillance** et d’**acquisition de connaissances** sur les NoV au niveau du Bassin d’Arcachon et des stations d’épuration entourant ce Bassin et dont il est maître d’ouvrage. Ces données sont disponibles [ici](#) en « *open access* ».

I.2. LES NOROVIRUS HUMAINS

Les NoV, appartenant à la famille des *Caliciviridae*, sont responsables d’environ 20% de toutes les gastro-entérites aiguës à travers le monde, surtout l’hiver (Ahmed et al., 2014). Sur la base de leur séquence génomique, ils sont classés en 10 génogroupes parmi lesquels cinq génogroupes (GI, GII, GIV, GVIII et GIX) peuvent infecter l’Homme. Les NoV sont surtout représentés par les génogroupes GI et GII, eux-mêmes divisés en 9 et 27 génotypes, respectivement (Chhabra et al., 2019).

Les NoV sont la principale cause de gastro-entérite aiguë chez l’Homme dans le monde avec un nombre de **cas médian de 699 millions** et un nombre de décès médian de 277 000 (Kirk et al., 2015). A l’échelle mondiale, les coûts annuels des infections à NoV sont estimés par l’OMS à 4,2 milliards de \$ pour les coûts directs et à 60,3 milliards de \$ pour les coûts indirects (Bartsch et al., 2016).

Les NoV sont des virus nus d’environ 40 nm de diamètre possédant une capsidie icosaédrique de symétrie T=3 dans lequel se trouve un acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de polarité positive d’environ 7 500 nucléotides (Chhabra et al., 2019). Son génome est composé de trois cadres ouverts de lecture (« *Open Reading Frames* » ou ORF). L’ORF1 code des protéines non structurales tandis que les ORF2 et ORF3 codent les protéines de capsidie majeure (VP1) et mineure (VP2), respectivement (**Figure 2**).



a) Génome des NoV constitué de trois ORF. b) Structure d’un monomère de la protéine VP1 avec le domaine S (jaune), le sous-domaine P1 (bleu) et le sous-domaine P2 (rouge). c) Deux monomères de la protéine VP1 formant un dimère et permettant l’exposition du sous-domaine P2 sur la face externe de la capsidie. d) Capsidie complète après auto-assemblage des 90 dimères de la protéine VP1 et de quelques copies de la protéine VP2.

Figure 2 : organisation du génome et structure de la capsidie des NoV (Donaldson et al., 2010).

La capsidie est composée de 180 copies de VP1 assemblées en 90 dimères, et de quelques copies de VP2. La protéine VP1 est organisée en deux domaines majeurs : i) le domaine S (« *Shell* »), région la plus conservée et située sur la face interne de la capsidie et, ii) le domaine P (« *Protruding* ») lui-même divisé en deux sous-domaines P1 et P2 (Hardy, 2005). Le sous-domaine P2, région hypervariable présente sur la face externe de la capsidie, est impliqué dans les mécanismes de reconnaissance de la cellule hôte (*i.e.* entérocytes) et de certains ligands comme les **Histo-Blood Group Antigens (HBGA)**.

Le **récepteur des NoV** au niveau de la cellule hôte de l'Homme reste inconnu à ce jour mais il a récemment été montré que l'infection des entérocytes par les NoV se limitait à l'intestin grêle (*i.e.* iléon et jéjunum) (Ettayebi et al., 2021). Enfin, le rôle des HBGA dans le processus d'infection des NoV au niveau de la cellule hôte est mal décrit. Ils sont à ce jour considérés comme des **facteurs d'attachement** spécifiques favorisant l'infection des NoV chez l'Homme (Ettayebi et al., 2016; Haga et al., 2020).

Le **NoV GII.4** est le géotype le plus prévalent à travers le monde puisqu'il représente **environ 70% des cas recensés chaque année** depuis 2002 (van Beek et al., 2018). Les personnes infectées excrètent de fortes concentrations en NoV *via* les selles et les vomissures, comprises **entre 10⁶ et 10⁹ copies de génome / gramme** pendant environ 4 à 8 semaines (Atmar et al., 2008). La dose infectieuse pour l'Homme (DI₅₀) n'est pas clairement établie à ce jour mais des études récentes semblent indiquer qu'elle pourrait se situer **entre 1 200 et 2 800 équivalents-génomés de NoV** (Atmar et al., 2014; Ettayebi et al., 2021). Sachant que le ratio génome viral / virus infectieux est au moins de dix, il est probable que cette DI₅₀ estimée par des outils de biologie moléculaire soit surestimée car elle est généralement de l'ordre de **100 virus infectieux** pour les autres virus entériques pathogènes cultivables en laboratoire. Ainsi, une forte excrétion virale dans l'environnement associée à une DI₅₀ relativement faible contribuent à **promouvoir la transmission des NoV à la population humaine**. A l'extérieur de l'hôte humain, les NoV n'ont aucun moyen de se répliquer. Pour que le pouvoir pathogène s'exprime, il est indispensable que les virus ingérés possèdent à la fois une capsidite et un génome viral intègres. Si tel est le cas, les virus sont considérés comme infectieux.

I.3. RESERVOIRS PRIMAIRES ET SECONDAIRES

Il existe toute une diversité de virus entériques pathogènes d'origine hydrique appartenant à différentes familles, tels que les *Caliciviridae* (NoV), les *Picornaviridae* (entérovirus, VHA), les *Hepeviridae* (virus de l'hépatite E), les *Adenoviridae* (adénovirus), les *Astroviridae* (astrovirus) ou les *Reoviridae* (rotavirus). L'Homme constitue le **réservoir primaire** de ces virus entériques. Ils se transmettent à l'Homme par **voie féco-orale directe** (*i.e.* par contact rapproché avec une personne infectée) ou **indirecte** (*i.e.* par ingestion d'aliments ou d'eau contaminés ou par contact avec une surface souillée). Pour les NoV, l'analyse de 5 036 données épidémiologiques entre 2001 et 2006 dans 11 Etats Membres de l'UE montrait que la **transmission était directe dans 88% des cas et indirecte dans 12% des cas** (dont 10% pour les aliments et 2% pour l'eau) (Kroneman et al., 2008).

En plus d'être retrouvés en forte proportion dans les selles des individus infectés pendant plusieurs semaines, les NoV sont considérés comme ayant une **bonne capacité de survie dans l'environnement** car ce sont des **virus nus** dépourvus d'enveloppe lipidique (Cook et al., 2016; Seitz et al., 2011). La fréquence des épidémies alimentaires impliquant les NoV chaque année vient renforcer cette survie notable dans l'environnement (EFSA and ECDC, 2022). Ainsi, ce haut niveau d'excrétion dans les selles, associé à leur persistance dans l'environnement, permet une diffusion large de ces virus qui sont rapidement retrouvés dans les eaux usées, les eaux de ruissellement et les décharges solides associées aux activités humaines.

L'eau constitue le réservoir secondaire majeur en particules virales. La réduction des NoV au cours du traitement des eaux usées est hétérogène (Bosch, 2007). En effet, les performances des stations d'épuration à retenir et/ou à inactiver les virus entériques sont tributaires des traitements mis en œuvre. L'occurrence en NoV dans les masses d'eau douces (surface et souterraine) et côtières est bien documentée (Fout et al., 2017; Iaconelli et al., 2017). La contamination de ces eaux par les NoV peut parfois être significative pendant la période hivernale. Elle est d'autant plus accentuée que l'intégrité des réseaux et l'efficacité des systèmes d'assainissement collectifs et individuels sont défaillants. De manière exceptionnelle, elle peut même être importante en cas de débordements ou de « *by-pass* » des

stations d'épuration lors d'épisodes pluvieux importants (Hata et al., 2014). Les **amendements biologiques non hygiénisés** utilisés pour la fertilisation des sols agricoles peuvent aussi être une source de contamination des végétaux dans certains cas particuliers.

Enfin, la **contamination virale des aliments par manuportage** à partir d'individus infectés et excréteurs de virus infectieux est bien établie (Hardstaff et al., 2018; Koopmans and Duizer, 2004). Aux États-Unis, les maladies alimentaires liées aux NoV sont fréquemment associées à la consommation de plats nécessitant de nombreuses étapes de manipulation. Les aliments crus sont évidemment préférentiellement incriminés et la contamination par les employés est souvent identifiée (CDC, 2011). Enfin, **toutes les surfaces inertes** en contact avec des individus excréteurs de virus et des aliments sont aussi considérées comme des sources potentielles de contamination (D'Souza et al., 2006).

I.4. VULNERABILITE DES MOLLUSQUES BIVALVES VIVANTS VIS-A-VIS DES VIRUS ENTERIQUES

D'une manière générale, n'importe quel aliment est susceptible d'être contaminé par des individus infectés lors de leur manipulation si les pratiques d'hygiène sont insuffisantes. Il existe aussi de **nombreuses voies de contamination des aliments par l'eau** (Carducci et al., 2006; Richards, 2001). Cependant, certaines catégories d'aliments sont plus vulnérables que d'autres en raison d'une plus forte exposition à une pollution virale d'origine hydrique ainsi qu'aux modes de production et de consommation des denrées.

Les aliments les plus fréquemment impliqués dans les TIAC à NoV sont **les aliments crus et/ou faiblement transformés**, en particulier les **coquillages bivalves vivants** (e.g. huîtres, moules), les **végétaux frais et surgelés** (e.g. salades, fruits à baies) et **l'eau de boisson** (EFSA, 2013). Un schéma conceptuel, proposé par l'Anses en 2007 et toujours d'actualité (**Figure 3**), décrit l'exposition des aliments à risque vis-à-vis d'une contamination par les NoV (AFSSA, 2007).

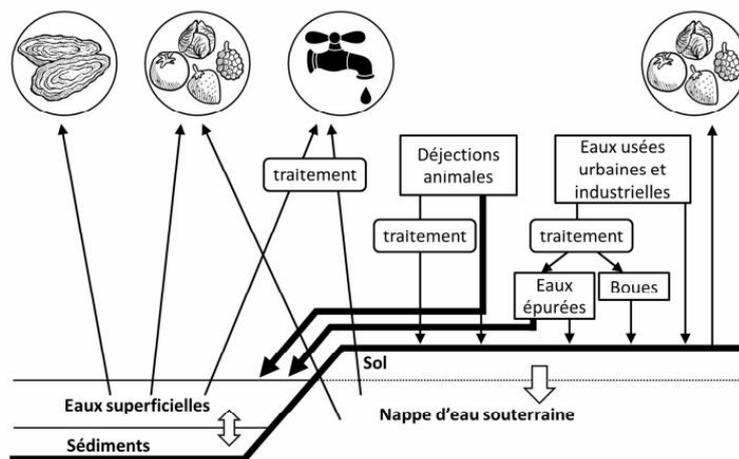


Figure 3 : exposition des aliments à une contamination virale par l'environnement (AFSSA, 2007).

Le lien entre maladie alimentaire et consommation de coquillages est établi depuis plus d'un siècle (Richards, 1988). Les mollusques bivalves filtreurs (e.g. huîtres, moules, palourdes, coques) sont particulièrement exposés à la contamination fécale du milieu naturel. De par la filtration de grands volumes d'eau, ils ont la capacité d'accumuler dans leurs tissus les virus entériques présents dans le milieu (Burkhardt and Calci, 2000). Il a même été décrit une **accumulation spécifique des NoV dans les glandes digestives d'huîtres** via l'interaction avec des ligands de types pseudo-HBGA (Le Guyader et al., 2006a; Tian et al., 2007). Il n'est donc pas surprenant que ces aliments, souvent consommés crus, soient régulièrement à l'origine de TIAC à NoV.

La contamination de ces mollusques bivalves a généralement lieu lors de leur élevage. Ces zones conchylicoles côtières peuvent en effet être influencées par une pollution fécale, en particulier lors de **rejets d'eaux usées brutes** par les stations d'épuration avoisinantes (Campos et al., 2015). D'autres événements indésirables plus ponctuels sont parfois rapportés, comme par exemple la vidange des eaux usées de bateaux à proximité des zones d'élevage (Berg et al., 2000).

La littérature regorge de description de TIAC à NoV suite à la consommation de coquillages. Entre 1980 et 2012, une méta-analyse des données indiquait que les NoV étaient à l'origine de 83,7% des épidémies alimentaires liées aux coquillages (Bellou et al., 2013). En France, les NoV étaient la première cause de TIAC liées à la consommation de coquillages entre 1996 et 2010 (Vaillant et al., 2012). Lors de **l'hiver 2019-2020, 197 TIAC à NoV dans les huîtres ont été déclarées en France**, causant 1 121 cas de gastro-entérites aiguës (*données DGAL, 2021*). Le RASFF a également signalé 57 TIAC à NoV avec 265 malades le même hiver, surtout au Danemark, en Suède, à Malte et en Finlande.

I.5. REGLEMENTATION EN VIGUEUR

A ce jour, **aucun critère réglementaire n'est établi concernant la gestion des NoV dans les aliments et l'eau.** Ceci étant, ces virus entrent parfaitement dans le cadre du **règlement CE n°178/2002**, établissant les principes généraux de la législation alimentaire, qui stipule dans l'article 14 que nulle denrée ne doit être mise sur le marché si elle est considérée comme dangereuse pour la santé humaine (Parlement Européen, 2002). Aussi, le **règlement CE 2073/2005** relatif aux critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires précise que : « *il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées* » (Parlement Européen, 2005).

D'une manière générale, le danger viral n'est pris en compte que de manière indirecte à travers l'utilisation **d'indicateurs bactériens de pollution fécale** tels qu'*Escherichia coli*. Sa recherche est intégrée dans différentes réglementations, que ce soit dans le règlement CE 2073/2005 (Parlement Européen, 2005), ou dans ceux relatifs à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (Commission Européenne, 1998; Ministère de la Santé et des Solidarités, 2007). Néanmoins, ***E. coli* est connue pour avoir une survie très inférieure à celle des virus nus dans l'environnement et vis-à-vis des traitements de désinfection.** Il est donc clair que la présence d'*E. coli* peut traduire un risque de présence de NoV mais son absence ne le garantit malheureusement pas. La consommation de coquillages commercialisés ayant conduit à des TIAC virales tout en respectant la réglementation en vigueur illustre parfaitement les limites de cet indicateur bactérien (Le Guyader et al., 2006b; Lowther et al., 2010). Ces données épidémiologiques récurrentes ont donc amené la communauté scientifique à conclure **qu'*E. coli* n'est pas un indicateur adapté** pour estimer la pollution virale dans les aliments.

Aujourd'hui, la contamination des coquillages par les NoV reste difficile à appréhender par les autorités de gestion et la filière conchylicole en Europe. Elle est régie depuis 2017 par le **Règlement UE 2015/2285** modifiant l'Annexe II du **Règlement CE 854/2004** (Commission Européenne, 2015; Parlement Européen, 2004a). Cette législation assure le classement des zones conchylicoles selon les teneurs en *E. coli* dans les chairs et liquides intervalvaires (CLI) des coquillages bivalves (**Figure 4**).

Classification Européenne	<i>E.coli</i> pour 100 g de CLI
Zone A	80% < 230 <i>E. coli</i> / 100 g CLI Aucun > 700 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone B	90% < 4 600 <i>E. coli</i> / 100 g CLI Aucun > 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone C	100% < 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI
Zone non classée	> 46 000 <i>E. coli</i> / 100 g CLI

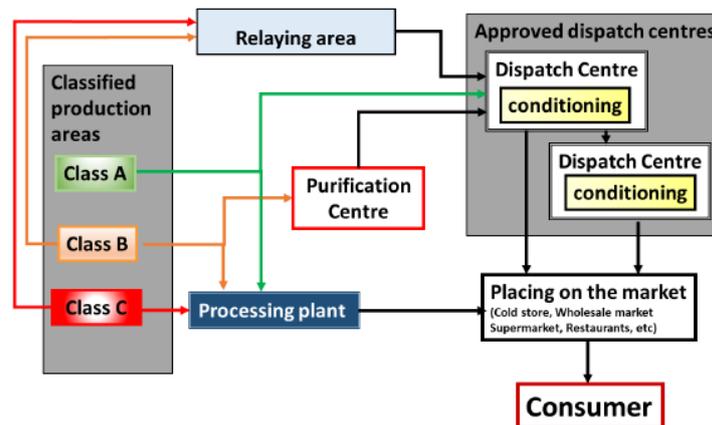


Figure 4 : gestion des coquillages selon leur zone avant commercialisation (EFSA, 2016).

Ainsi, les coquillages élevés et récoltés en zone A peuvent directement être mis sur le marché. Tandis que ceux récoltés dans les zones B ou C doivent subir un traitement préalable pour réduire leur niveau de contamination avant commercialisation. Il peut s'agir d'une purification par immersion en eau propre pendant une durée déterminée et/ou d'un reparcage dans une zone de qualité sanitaire satisfaisante (pour la zone B), ou d'un traitement thermique (pour la zone C). Enfin, la vente de coquillages issus des zones non classées est interdite. En Europe, environ 40% des zones conchylicoles sont classées en zone A, 50% en zone B et 5% en zone C (EFSA, 2011). Cette répartition indique donc que la majorité des coquillages sont soumis à une étape de purification ou de reparcage avant leur mise sur le marché. En France, cette répartition est similaire puisque 45% (n=167), 49% (n=183) et 1% (n=3) des zones sont classées en A, B, et C, respectivement (www.atlas-sanitaire-coquillages.fr).

Le **règlement UE 2019/627** relatif à la gestion des zones de production de coquillages prévoit leur fermeture si des éléments laissent penser qu'il y a un risque à consommer les coquillages qui en sont issus : « Lorsque [...] la santé humaine est mise en péril d'une autre façon, les autorités compétentes ferment la zone de production ou de reparcage classée concernée, empêchant ainsi la récolte des mollusques bivalves vivants. » (Commission Européenne, 2019). Dans ce contexte, une **instruction technique actualisée de la DGAL** est publiée chaque année en France depuis 2013 concernant la gestion du risque à NoV en lien avec la consommation de coquillages (DGAL, 2021). Elle décrit les mesures de gestion relatives aux fermetures et réouvertures des zones de production en cas de TIAC à NoV suspectée dans les coquillages. Une **fermeture administrative de la zone de production peut être instaurée pendant 28 jours** à partir de la date à laquelle les coquillages sont réputés dangereux. La réouverture de la zone est conditionnée par l'absence de tout signal d'alerte durant ces 28 jours. Des mesures de retraits et rappels de lots identifiés comme dangereux sont aussi appliquées.

Suite aux **254 épidémies à NoV dans les huîtres ayant eu lieu en Europe lors de l'hiver 2019-2020** (dont 197 en France avec la fermeture administrative de 33 zones conchylicoles françaises) et au nombre important de notifications à NoV dans les coquillages émis par le RASFF ces dernières années (*données*

DGAL, 2021), la majorité des Etats Membres de l'UE se sont positionnés en 2020 **en faveur d'un critère réglementaire en NoV dans les coquillages bivalves au sein du règlement CE 853/2004 (projet de révision de l'Annexe III du Règlement 853/2004)** (Parlement Européen, 2004b). Plus précisément, il est évoqué la possibilité d'imposer la **recherche du génome des NoV dans 10% des lots** de mollusques bivalves vivants **entre novembre et avril, avec une limite fixée à 500 copies de génome / g CLI**. Des autocontrôles dans les plans de maîtrise sanitaire des entreprises sont aussi évoqués. Notons ici que ce seuil à 500 copies / g CLI ne tient pas compte du caractère infectieux des NoV *stricto sensu*. A ce jour, les discussions sont toujours en cours entre les Etats Membres.

I.6. METHODES DE DETECTION DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES COQUILLAGES ET L'EAU

I.6.1. Détection du génome des norovirus dans les aliments

Dans le but d'établir des systèmes harmonisés de surveillance des NoV dans les aliments, le **groupe de travail TC275/WG6/TAG4 du Comité Européen de Normalisation (CEN)** a élaboré pendant près de 10 ans des procédures consensuelles d'extraction et de détection du génome des NoV par RT-PCR en temps réel (RT-qPCR) dans les aliments à risque. Depuis 2013, des **méthodes normalisées** sont disponibles pour la recherche qualitative ou quantitative du génome des NoV dans les aliments à risque (NF EN ISO 15216-1, 2017; NF EN ISO 15216-2, 2019). Des contrôles de performance (*i.e.* rendements d'extraction des virus, inhibition de la RT-qPCR) ont été intégrés à ces méthodes pour valider les critères d'acceptabilité. Le choix d'une détection du génome viral par RT-qPCR est lié au fait qu'aucune méthode suffisamment robuste et sensible n'est disponible en routine pour détecter les NoV infectieux. Aujourd'hui, ces méthodes ISO ont **l'avantage** de pouvoir être utilisées de **manière uniforme** par les laboratoires d'analyse en Europe, ce qui permet de comparer les données de surveillance ou de prévalence dans les aliments.

A l'inverse, ces méthodes ISO ont **l'inconvénient de ne pas apporter d'information sur le caractère infectieux des NoV** lorsque leur génome est détecté dans les aliments ou l'eau dans les approches prospectives (*e.g.* autocontrôles, plans de surveillance). Il est en effet bien démontré dans la littérature que le **génome viral** de la plupart des virus nus entériques d'origine hydrique, incluant les NoV, **est largement plus persistant que la particule infectieuse correspondante** (Gassilloud et al., 2003; Randazzo et al., 2018). Ce biais majeur a pour conséquence d'entraîner le **retrait potentiellement injustifié de lots du marché par application du principe de précaution** dès lors que du génome viral est détecté, alors même que le risque sanitaire pour le consommateur n'est pas prouvé. Un résultat positif ne peut donc en aucun cas témoigner de l'intégrité de la capsid, ni même de celle du génome (seules quelques centaines de bases sont détectées), et ne renseigne donc pas sur le caractère infectieux du virus. Il faut aussi rappeler que l'absence de détection de génome viral dans les aliments ou l'eau ne garantit pas l'absence de particules virales infectieuses en raison de la **faible sensibilité** de ces méthodes ISO liée à la faible prise d'essai pour réaliser la RT-qPCR (quelques μL). Cela se traduit d'ailleurs souvent par l'impossibilité de détecter le génome des NoV dans des restes de repas pourtant incriminés dans des TIAC (Le Guyader et al., 2006b; Lowther et al., 2010). **L'utilisation de cette norme ISO en routine pour la gestion du danger à NoV prête donc à discussion puisqu'elle ne garantit ni l'absence ni la présence de virus infectieux**. Pour résumer, elle peut donc aussi bien **surestimer** que **sous-estimer** le danger viral dans les coquillages et l'eau.

I.6.2. Apport des bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs des norovirus

Les marqueurs d'un danger infectieux sont utilisés depuis plus d'un siècle au travers des indicateurs bactériens. Cependant, ils ne sont pas adaptés pour estimer la contamination virale des aliments en raison de la plus grande persistance des virus par rapport aux bactéries dans l'environnement (Hartard, 2017;

Harwood et al., 2005). Face à l'absence de système fiable pour préciser le caractère infectieux des NoV dans les aliments et leur environnement, l'option de définir un **indicateur de nature virale** a rapidement émergé. Pour être pertinent, cet indicateur doit i) présenter une origine entérique humaine, ii) posséder des caractéristiques structurales proches des NoV et, iii) être *a minima* aussi résistant que ce virus dans l'environnement. Depuis de nombreuses années, les bactériophages fécaux sont proposés comme indicateurs, et notamment les **bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH)**. Leur recherche est d'ailleurs envisagée ou déjà incluse dans la réglementation de différents pays concernant la **surveillance des eaux souterraines** (US EPA, 2006), des **eaux récréatives** (US EPA, 2015) ou de la **qualité microbiologique des coquillages** aux USA et en Australie (ASQAAC, 2016; FDA, 2015).

Les FRNAPH, appartenant à la famille des *Leviviridae*, sont naturellement présents dans le tractus gastro-intestinal des animaux à sang chaud. Ils possèdent une capsidie icosaédrique de symétrie T=3 et un génome à ARN simple brin de polarité positive de 3 500 à 4 200 nucléotides. Au sein des genres *Levivirus* et *Allolevivirus*, les FRNAPH sont classés en quatre génogroupes. Le genre *Levivirus* est composé des génogroupes I et II (FRNAPH-I et -II), tandis que le genre *Allolevivirus* par les génogroupes III et IV (FRNAPH-III et -IV). Les FRNAPH-II et -III ont plutôt une **origine humaine** alors que les FRNAPH-I et -IV ont plutôt une **origine animale**. Dans l'environnement et vis-à-vis des traitements de désinfection, il est bien démontré que la **survie des génogroupes infectieux** suit la séquence suivante : FRNAPH-I > FRNAPH-II > FRNAPH-III > FRNAPH-IV. Les FRNAPH-IV sont d'ailleurs très rarement détectés dans l'environnement (Hartard, 2017).

Bien que détectés dans les selles humaines à des fréquences faibles (< 26%) (Havelaar et al., 1990; Schaper et al., 2002), les **FRNAPH sont présents en abondance dans les eaux usées brutes** à des niveaux compris entre 10^6 et 10^8 UFP/L (Hartard et al., 2015; Havelaar et al., 1990). Ils sont ensuite retrouvés dans les rejets d'eaux usées et les eaux continentales à des concentrations inférieures à 10^5 UFP/L (Lucena et al., 2006; McMinn et al., 2017). Cette dichotomie entre les concentrations en FRNAPH dans les eaux usées et selles humaines n'est pas encore expliquée à ce jour. Une **étude clinique** est en cours de réalisation par l'UMT Actia VIROcontrol (partenariat entre Actalia et le LCPME depuis 2012, agréé par le Ministère de l'Agriculture) pour redéfinir la prévalence en FRNAPH infectieux dans **100 selles humaines** provenant d'individus sains. Il est d'ailleurs peu probable que les FRNAPH puissent se multiplier dans l'environnement (Hartard, 2017; Jofre et al., 2016). Dans les eaux environnementales, une **corrélation positive entre FRNAPH infectieux et virus entériques infectieux** a été démontrée pour la première fois en 1993 (Havelaar et al., 1993). Par la suite, plusieurs travaux sont venus renforcer cette corrélation (Barrios et al., 2018; Flannery et al., 2013).

L'utilisation de ces FRNAPH comme indicateur du danger viral dans les aliments présente donc un réel intérêt pour les **aliments influencés par une pollution fécale d'origine urbaine** comme les coquillages bivalves. Flannery et al. (2009) ont été parmi les premiers à suggérer **l'intérêt des FRNAPH pour estimer la contamination des huîtres par les NoV**. Depuis, l'apport des FRNAPH pour évaluer le danger à NoV dans les coquillages a été très bien documenté (Hodgson et al., 2017). Ces mêmes auteurs décrivent les FRNAPH comme de bons candidats car :

1. Les FRNAPH ont une structure similaire à celle des NoV : virus nus, taille similaire, capsidie protéique icosaédrique de symétrie T=3, génome à ARN à polarité positive (**Figure 5**).
2. Les FRNAPH-II et -III sont plutôt spécifiques d'une pollution fécale d'origine humaine.
3. Dans les huîtres, la persistance des FRNAPH est plus importante que celle d'*E. coli*.
4. A la différence des NoV, les FRNAPH infectieux peuvent être quantifiés par des méthodes normées (ISO 10705-1, 2001), ou bien rapidement détectés dans les huîtres (Hartard et al., 2017).

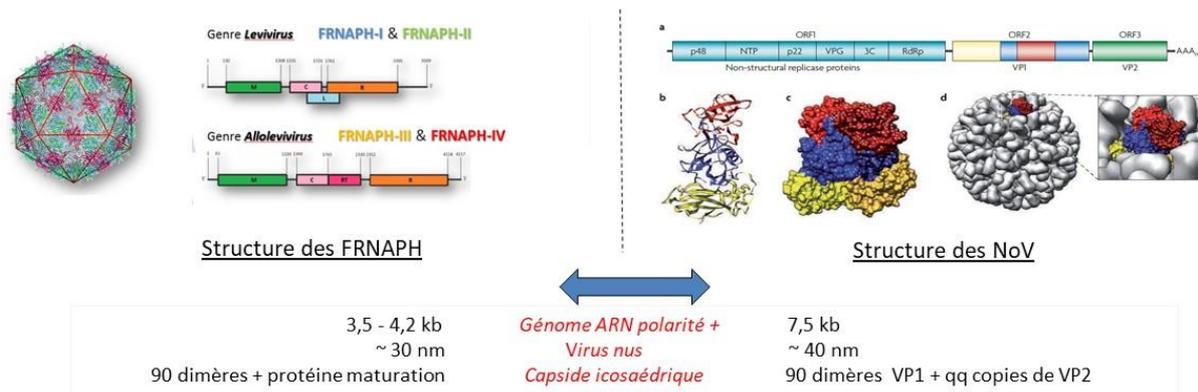


Figure 5 : structures des FRNAPH et des NoV (Dent et al., 2013; Donaldson et al., 2010).

En dépit de tous ces avantages et de ces démonstrations, les FRNAPH étaient rarement utilisés avant 2016 pour évaluer la qualité virologique des eaux et des aliments. Alors que certains auteurs montraient une corrélation positive entre FRNAPH et NoV dans des aliments (Goblick et al., 2011; Lowther et al., 2008), d'autres montraient une absence de corrélation (Crocì et al., 2000; Formiga-Cruz et al., 2003). Cette dichotomie s'explique simplement par le fait que toutes ces études **comparaient le génome des NoV et les FRNAPH infectieux**. Or, il est aujourd'hui bien établi que le génome d'un virus persiste plus longtemps dans l'environnement que ses propres particules infectieuses. Ainsi, pour les études décrivant une corrélation positive, les résultats s'expliquent par une **pollution fécale récente**, cohérente avec la présence de FRNAPH encore infectieux. Alors que dans celles décrivant une absence de corrélation, les résultats s'expliquent par une **pollution fécale ancienne**, le temps passé ayant progressivement entraîné l'inactivation des FRNAPH infectieux. Dans les deux types de pollution fécale (récente ou ancienne), le génome des NoV a pu être retrouvé. Aucune de ces études n'avait cependant comparé la persistance du génome des NoV avec celle des FRNAPH. Ainsi, la capacité des FRNAPH à indiquer une pollution virale, indépendamment du caractère récent ou ancien de cette pollution, nécessite de comparer exclusivement la **persistance des génomes des FRNAPH et des NoV** dans les aliments et leur environnement.

Les travaux de l'UMT Actia VIROcontrol ont remis au **centre du débat l'intérêt des FRNAPH pour évaluer le danger à NoV dans les coquillages**. Tout d'abord, une corrélation significative entre les génomes des FRNAPH-II et ceux des NoV dans 111 lots d'huîtres en Europe ($p < 10^{-4}$) a été démontrée (Hartard et al., 2016, 2018). Cette corrélation positive a aussi été observée lors de la dépuración des huîtres en bassin d'immersion dans différentes conditions (Hartard et al., 2018; Leduc et al., 2020). Il a ainsi été montré i) une corrélation significative entre la présence et l'élimination des génomes de FRNAPH-II et des NoV dans les huîtres et, ii) l'absence de corrélation entre le génome des FRNAPH et les FRNAPH infectieux, confirmant que la présence du génome viral ne renseigne pas sur le caractère infectieux des virus. En 2020, une étude financée par le **Comité National de la Conchyliculture** est venue renforcer l'intérêt des FRNAPH sur le terrain. En effet, il a été montré que les génomes de FRNAPH-II et de NoV avaient un comportement similaire i) dans des huîtres naturellement contaminées sur une zone conchylicole et, ii) dans des huîtres dépourvues de virus avant leur introduction dans deux zones conchylicoles fréquemment influencées par une pollution fécale (Boudaud, 2020). Il a aussi été montré que la fermeture administrative d'une zone conchylicole n'excluait pas une re-contamination de celle-ci par les NoV après sa réouverture. Enfin, il a encore été observé une absence de corrélation entre le génome des FRNAPH-II et ses propres particules infectieuses.

Ensuite, une **corrélation positive entre la présence de FRNAPH infectieux avec celle des NoV infectieux a été partiellement démontrée à partir de 15 restes de repas d'huîtres incriminés dans des TIAC à NoV**. A chaque fois, les FRNAPH infectieux ont été détectés dans ces échantillons,

supportant l'hypothèse d'une corrélation positive entre FRNAPH infectieux et NoV infectieux (*données non publiées*). La démonstration *a minima* d'une survie supérieure ou égale des FRNAPH-II infectieux par rapport aux NoV infectieux doit cependant être apportée pour **valider de manière indiscutable** cet indicateur pour l'estimation du danger à NoV dans les coquillages bivalves vivants.

Les résultats obtenus par le CEFAS (UK) ont également souligné l'intérêt des FRNAPH-II infectieux pour prédire la présence de NoV infectieux dans les huîtres. Lowther et al. (2019) ont confirmé une corrélation positive entre les génomes de FRNAPH-II et ceux des NoV dans **630 lots d'huîtres**. Ils ont aussi observé la présence systématique de FRNAPH infectieux dans **9 restes de repas d'huîtres** suspectés dans des TIAC à NoV. Younger et al. (2020) ont de leur côté montré des cinétiques d'élimination des génomes de FRNAPH-II et de NoV faibles et similaires dans les huîtres au cours de leur dépuración. Enfin, une étude australienne récente est allée encore plus loin en tentant de préciser des **niveaux de référence en FRNAPH infectieux dans les huîtres** élevées dans des zones conchylicoles influencées par une pollution fécale d'origine humaine (Torok et al., 2021).

Pour conclure, il est important de garder à l'esprit que **l'intérêt des FRNAPH pour estimer le danger à NoV dans les aliments n'est pas applicable dans toutes les situations**. En effet, si la contamination des aliments est **d'origine manuportée (ce qui n'est pas le cas des coquillages !)**, les FRNAPH peuvent être absents des denrées contaminées par les NoV si l'individu n'est pas excréteur de FRNAPH au même moment. **Cela constitue la seule et unique limite de cette approche**, précédemment rapportée par Woods et al. (2016).

I.7. APPORT DES DREISSENES POUR AMELIORER LA SURVEILLANCE VIRALE DES EAUX

La recherche directe des virus entériques pathogènes dans les eaux de surface continentales et côtières **reste encore aujourd'hui très délicate** notamment parce qu'elle repose sur un prélèvement ponctuel, une faible prise d'essai (de 100 mL à 2 L), une variabilité temporelle inhérente à la dynamique de la matrice eau et des faibles concentrations en virus en dehors des pics épidémiques ponctuels. C'est la raison pour laquelle des indicateurs de pollution fécale humaine de nature virale comme les FRNAPH sont proposés car ils sont abondants dans les environnements hydriques.

L'occurrence et la distribution des différentes charges virales dans les écosystèmes aquatiques dépendent de nombreux facteurs environnementaux liés aux conditions hydro-climatiques (Fauvel et al., 2016, 2017). Dans un objectif de surveillance de la qualité des masses d'eau (grande échelle spatiale et comparaison inter-sites), ces conditions hydro-climatiques peuvent rendre délicate l'interprétation des résultats issus de mesures ponctuelles n'intégrant pas les fortes variabilités spatiales et temporelles en virus. Cette difficulté est particulièrement vraie lorsque les virus sont présents en faibles proportions dans les eaux. Pour lever ces verrous, il est donc primordial de disposer de méthodologies permettant une **détection plus sensible de la charge virale** et une **meilleure intégration** dans le temps et l'espace de cette charge virale dans les masses d'eau continentales et côtières.

Dans ce contexte, les capacités d'accumulation des NoV et de son indicateur FRNAPH par des **organismes invertébrés** comme les mollusques bivalves vivants peut se révéler être une stratégie payante pour la **surveillance active de la pollution virale des masses d'eaux**. Plusieurs études récentes ont montré l'intérêt de la moule d'eau douce (*i.e. Dreissena polymorpha*) mais aussi de mollusques bivalves marins (*i.e. Mytilus edulis, Crassostrea gigas*) dans le cadre du diagnostic *in situ* de la qualité microbiologique des milieux aquatiques (Capizzi-Banas et al., 2021; Desdouits et al., 2021; Kerambrun et al., 2016). Ces espèces sentinelles ont en effet l'avantage d'être facile à utiliser sur le terrain *via* des approches actives basées sur leur **encagement (Figure 6)**.



Figure 6 : *D. polymorpha* utilisable pour la surveillance *in situ* de la qualité des masses d'eau douce.

Dans le cadre de l'UMT Actia VIROcontrol (Capizzi-Banas et al., 2021), il a notamment été montré en conditions contrôlées la capacité de la dreissène i) à accumuler les FRNAPH et à refléter le niveau de contamination de l'eau en moins de 24 h et, ii) à retenir la charge virale dans ses tissus mous beaucoup plus longtemps que dans l'eau. Le constat que la dreissène est rapidement capable de se mettre à l'équilibre avec les teneurs en microorganismes (*i.e.* *E. coli*, virus entériques) retrouvés dans le milieu est aussi rapporté dans la littérature (Bighiu et al., 2019; Mezzanotte et al., 2016).

Les capacités de la dreissène pour **détecter de manière sensible et intégrée** des épisodes éventuels de contamination virale dans les cours d'eaux influençant les zones conchylicoles peuvent donc être particulièrement pertinentes pour identifier les origines de la pollution. Des études en cours menées dans le cadre de l'UMT Actia VIROcontrol tente de définir **un modèle toxico-cinétique** pour prédire les cinétiques d'accumulation et de dépuration des NoV et des FRNAPH dans la dreissène en fonction de la charge virale et la température de l'eau. Cette modélisation est classiquement utilisée en écotoxicologie pour décrire l'accumulation de contaminants chimiques par les invertébrés (Lopes et al., 2020). Cette approche aboutie permettra de préciser au cours du temps la variation de la concentration virale interne résultant de processus variables d'accumulation (*e.g.* absorption par voie dissoute et/ou alimentaire) et de dépuration de ces mollusques bivalves. Le déploiement de ces espèces sentinelles *in situ* et sur différents sites en France peut œuvrer pour une meilleure surveillance de la qualité virologique des milieux hydriques.

Il est important de souligner que la dreissène est une **espèce invasive** et que son introduction dans le milieu récepteur est interdite par les autorités de gestion lorsqu'elle n'est pas naturellement présente. Pour s'affranchir de cette limite, il suffit de ne sélectionner que les **individus mâles** avant leur introduction dans l'environnement par encagement car ces derniers ne peuvent pas se reproduire.

II. OBJECTIFS

Cette étude s'inscrit dans la suite logique des objectifs définis dans le projet initial amorcé en 2020 avec le SIBA concernant l'**amélioration des connaissances relatives au danger à NoV dans les eaux et les zones de production ostréicoles du Bassin d'Arcachon**. Plus largement, cette étude s'intègre parfaitement dans le travail conduit depuis 2012 par le SIBA visant à i) surveiller les NoV dans les coquillages et son environnement au niveau du Bassin d'Arcachon et, ii) enrichir les connaissances sur la circulation des NoV dans ce territoire. Les résultats acquis par Actalia entre septembre 2020 et avril 2021 ont d'ailleurs été incrémenté dans le rapport annuel consolidé du SIBA « *Norovirus – Les acquis sur le Bassin d'Arcachon, 2022* » disponible [ici](#).

Lors de la saison hivernale 2021-2022, les NoV (génom) et les FRNAPH infectieux ont été recherchés une fois par mois dans plusieurs matrices différentes que sont :

- **huîtres sauvages** au niveau de la zone intra-Bassin, utilisées comme outil intégrateur de la contamination virale.
- **eaux usées traitées** en sortie de la station de Biganos (avant traitement UV) pour avoir une « empreinte générale » de la qualité virologique des eaux traitées sur le territoire, élargi à titre d'indicateur épidémique.
- **eaux de rivière** provenant de La Leyre (principal affluent du Bassin d'Arcachon) et du ruisseau de Lacanau (se déversant dans La Leyre), en utilisant des **dreissènes mâles** préalablement encagées et stabulées comme outil intégrateur de la contamination virale.

Le suivi de la contamination virale dans les eaux douces continentales a été réalisé en collaboration avec l'**UMR-I 02 SEBIO** qui possède une expertise reconnue sur les mécanismes et les interactions entre stress de l'environnement et des espèces sentinelles comme *Dresseina polymorpha*, mais également sur la biosurveillance active et passive des milieux aquatiques. SEBIO est intervenu en qualité de sous-traitant d'ACTALIA dans le cadre de cette étude.

Enfin, il est prévu de renouveler cette étude de surveillance selon la même méthodologie expérimentale lors de la prochaine période hivernale entre novembre 2022 et avril 2023, en intégrant ces suivis à ceux du réseau REMPLAR, opéré par le SIBA avec le soutien de l'Agence de l'eau Adour Garonne et en lien avec le programme d'actions issu du profil de vulnérabilité des eaux conchylicoles du Bassin d'Arcachon

A terme, l'ambition de ce projet est de pouvoir préciser les niveaux de circulation des NoV au niveau du Bassin d'Arcachon, de hiérarchiser les potentielles origines de pollution virale et de mieux appréhender le danger à NoV en utilisant les FRNAPH infectieux comme indicateurs dans les eaux et les coquillages.

III. MATERIELS ET METHODES

III.1. ZONE D'ETUDE ET ECHANTILLONNAGE

La zone d'étude de ce projet se situe au niveau du Bassin d'Arcachon, en analysant une fois par mois entre novembre 2021 et avril 2022 des huîtres sauvages, des eaux usées traitées et des eaux de surface. Les points ciblés ont été définies et validés par le SIBA afin d'améliorer les connaissances sur la circulation des NoV et le danger associé au niveau de la zone intra-Bassin (**Figure 7**).

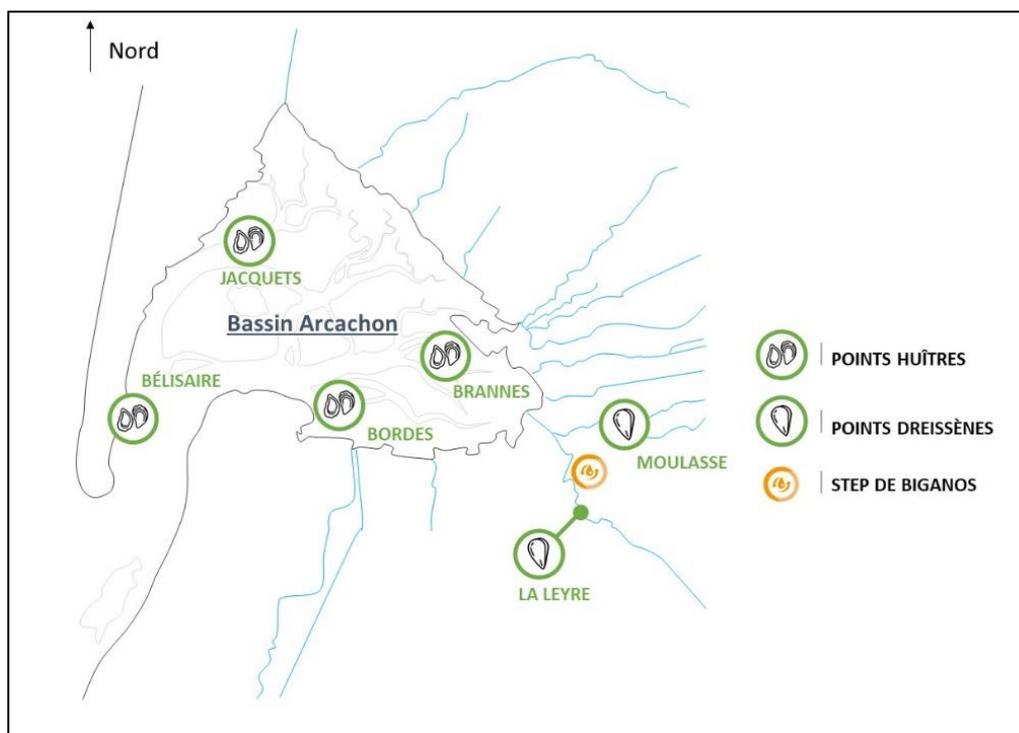


Figure 7 : sites de prélèvements des quatre points huîtres, des deux points dreissènes et de l'eau usée traitée de la station de Biganos.

Les **eaux usées traitées** de la station de Biganos ont été collectées avant traitement UV par le SIBA. Le rejet de cette station rejoint le milieu océanique via un collecteur de plus de 15 km mais le prélèvement 24h permet d'avoir une « empreinte » générale de la qualité virologique des eaux traitées. La station de Biganos utilise un fonctionnement en cultures fixées et possède une capacité de traitement de 135 000 équivalents - habitants.

Les **huîtres sauvages** ont été collectées par le SIBA sur **quatre points** distincts que sont « Jacquets », « Bélisaire », « Bordes » et « Brannes ». Les zones ostréicoles intra-Bassin où se trouvent ces points sont tous classés en **zone A** d'après le Règlement UE 2015/2285 (Commission Européenne, 2015; Parlement Européen, 2004a).

Enfin, les **eaux de surface continentales** ont été analysées au niveau de deux points que sont « La Leyre » et « Moulasse ». Le point « Moulasse » est situé au niveau du ruisseau de Lacanau, récupérant notamment les eaux usées traitées de la station de Marcheprime *via* le ruisseau du Biard. Les eaux usées traitées de la station de Mios rejoignent une zone de rejet végétalisée à proximité de La Leyre. En lien avec l'**UMR-I 02 SEBIO**, des dreissènes préalablement stabulées et encagées ont été introduites au niveau de ces deux points pendant une durée de **14 à 21 jours**. La **figure 8** représente la procédure simplifiée d'introduction de ces espèces sentinelles sur les deux points « eaux ». La **DREAL Aquitaine** a été informée de l'introduction des dreissènes dans le milieu dans le cadre de cette étude expérimentale.

Les dreissènes étant une espèce invasive et non naturellement présente dans ce territoire, toutes les précautions ont été prises avant leur introduction dans le milieu. Il a notamment été décidé de ne sélectionner que les **individus mâles** pour éviter leur dissémination dans le milieu récepteur en cas de perte.

La qualité de l'eau a été préalablement contrôlée en amont pour s'assurer de la bonne survie des dreissènes dans cet écosystème. Les dreissènes mâles stabulées ont été élevées par SEBIO et envoyées chaque mois au SIBA. SEBIO a pris soin de former le SIBA lors de la première introduction des dreissènes mâles par encagement dans le milieu récepteur.



Figure 8 : procédure simplifiée d'introduction des dreissènes dans le milieu récepteur.

Tous les échantillons ont été envoyés par transporteur froid du SIBA vers Actalia dans les 24h suivant les prélèvements. Les dreissènes étaient placées dans des bidons d'eaux du milieu récepteur pour assurer leur survie lors du transport.

III.2. DETECTION ET QUANTIFICATION DU GENOME DES NOROVIRUS DANS LES EAUX ET LES COQUILLAGES

La détection et la **quantification du génome des NoV** dans les **eaux traitées** de Biganos a été réalisée en s'inspirant de la norme NF EN ISO 15216-1 (2017) appliquées aux eaux embouteillées et de la méthode publiée par Perrin et al. (2015). 250 mL d'échantillon d'eau ont tout d'abord été filtrées sur une membrane électropositive de 0,45 μm de diamètre (Zetapor). Ensuite, une lyse directe de la membrane a été effectuée par ajout de 10 mL de tampon de lyse d'isothiocyanate de guanidine 5M pendant 20 min sous agitation. Enfin, une purification des génomes viraux de cet extrait de lyse, sous un volume final de 55 μL , a été réalisée en utilisant le système Nuclisens (Biomérieux) en suivant les recommandations du fournisseur. Une étape de concentration de l'extrait d'ARN viral purifié a été employée pour abaisser la limite de détection, au moyen du « *RNA clean & Concentrator 5w* » (Ozyme).

Les génomes des NoV GI et GII ont été quantifiés par RT-qPCR en utilisant les systèmes de détection (amorces et sondes) et la procédure décrite dans la norme NF EN ISO 15216-1 (2017). Comme décrit dans cette même norme ISO, un virus témoin de processus (*i.e.* entérovirus bovin, ECBO) a été introduit en quantité connue en début d'analyse pour déterminer les rendements d'extraction de la méthode. Les résultats étaient considérés comme valides lorsque le rendement d'extraction était supérieur à 1,0% comme recommandé dans la norme ISO 15216-1 (2017). Les **limites de détection et de quantification théoriques** de la méthode sont respectivement de 30 et 150 copies/L. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

Les **génomes de NoV dans les mollusques bivalves** (huîtres et dreissènes) ont été détectés et quantifiés en appliquant la norme ISO 15216-1 (2017). Pour les huîtres, $2,00 \pm 0,05$ g de tissus digestifs d'huîtres calibre 3 ont été analysés à partir de la dissection de 20 individus vivants. Elles ont été conduites sous accréditation COFRAC pour les huîtres (accréditation n°1-6246 ; portée disponible sur www.cofrac.fr). Pour les dreissènes, $1,72 \pm 0,34$ g de tissus digestifs de dreissènes ont été analysés à partir de la dissection de 50 individus vivants. Une plus grande dispersion dans la prise d'essai est ici observée car le nombre et la taille d'individus variait d'une analyse à l'autre. Ensuite, les génomes viraux ont été extraits, purifiés et quantifiés en suivant la procédure décrite dans la norme ISO 15216-1 (2017). Le virus témoin de processus ECBO a été introduit en quantité connue en début d'analyse pour déterminer les rendements d'extraction de la méthode. Les résultats étaient considérés comme valides lorsque le rendement d'extraction était supérieur à 1,0% comme recommandé dans la norme ISO 15216-1 (2017). Les **limites de détection et de quantification théoriques** de la méthode sont respectivement de 40 et 200 copies/g de glandes digestives. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

III.3. QUANTIFICATION DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES INFECTIEUX TOTAUX DANS LES EAUX ET LES COQUILLAGES

Les FRNAPH infectieux totaux dans les eaux usées traitées ont été conduits à partir d'une prise d'essai de 1,5 mL. Ils ont été quantifiés en utilisant les méthodes décrites par Hartard et al. (2015) et par la norme ISO 10705-(1) (2001). La **limite de détection théorique** est de 667 phages infectieux (Unité Formant Plage, UFP) par litre d'eaux usées pour les FRNAPH. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

La quantification des **FRNAPH infectieux totaux** par culture a été effectuée dans les huîtres et dans les dreissènes en utilisant la méthode décrite par Hartard et al. (2018) associée à l'ISO 10705-1 (2001). Cette méthode est maîtrisée depuis de nombreuses années par les partenaires de l'UMT Actia VIROcontrol (Actalia et LCPME). Les mêmes prises d'essai que celles utilisées pour quantifier le génome de NoV ont été utilisées (*i.e.* $2,00 \pm 0,05$ g de glandes digestives d'huîtres à partir de 20 individus vivants, et entre $1,72 \pm 0,34$ g de glandes digestives de dreissènes à partir de 50 individus vivants). La **limite de détection théorique** de la méthode est de 1 UFP/g. Pour chaque échantillon, les analyses ont été réalisées en duplicat.

Des témoins positifs et négatifs ont été introduits lors de la réalisation de chaque analyse (eau et coquillages bivalves), pour contrôler les performances et la reproductibilité de la méthode de quantification des FRNAPH infectieux.

III.4. ANALYSES STATISTIQUES

A l'aide du logiciel XLSTAT 2022 (Addinsoft (2022, <https://www.xlstat.com/fr>), des **analyses statistiques** seront réalisées en fin de projet ou lorsque suffisamment de données seront accumulées pour préciser si des différences significatives sont observables au cours du temps pour un même site et entre les différents sites étudiés concernant les teneurs en génome de NoV et en FRNAPH infectieux.

Dans un premier temps, il convient de tester la **normalité des données** à l'aide du test de Shapiro-Wilk et du Q-Q plot. L'homogénéité des **variances** entre les échantillons doit également être évaluée grâce au test de Levene. Si les données suivent une loi normale et que les variances sont homogènes ($p > 0.05$), des tests **paramétriques** sont appliqués. Dans le cas où les deux conditions précédentes ne sont pas respectées ($p < 0.05$), il convient d'appliquer des tests **non paramétriques**.

Afin de choisir le test statistique le plus adapté, il est ensuite nécessaire de déterminer si les données à comparer sont **indépendantes** ou **appariées**. Pour des données **indépendantes** ayant des variances homogènes et suivant une loi normale, le t-test est utilisé pour comparer deux échantillons. L'ANOVA est utilisée pour la comparaison de plusieurs échantillons. Les tests non paramétriques équivalents sont le test de Mann-Whitney pour deux échantillons et le test de Kruskal-Wallis pour plusieurs échantillons. Afin de comparer deux échantillons **appariés** ayant une distribution normale et des variances homogènes, le t-test est utilisé pour des échantillons appariés. Pour plusieurs échantillons, il convient d'utiliser une ANOVA à mesures répétées. Lorsque les conditions de normalité et d'homogénéité des variances ne sont pas respectées, le test de Wilcoxon est utilisé pour comparer deux échantillons appariés et le test de Friedman pour comparer plusieurs échantillons appariés.

Pour l'ensemble des tests statistiques appliqués, le **seuil α est fixé à 0.05**. Le **tableau 1** résume le choix des tests statistiques à appliquer en fonction de chacune des situations.

Tableau 1 : choix du test statistique à appliquer en fonction des données générées.

		Comparaison de deux échantillons	Comparaison de n échantillons
Données indépendantes	Distribution normale + homogénéité variances	t-test	ANOVA
	Pas de distribution normale	test de Mann-Whitney	test de Kruskal-Wallis
Données appariées	Distribution normale + homogénéité variances	t-test	ANOVA à mesures répétées
	Pas de distribution normale	test de Wilcoxon	test de Friedman

IV. RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1. CONTROLE DE L'EMPREINTE « EAU USEE TRAITEE » (STATION DE BIGANOS)

Les concentrations en génome de NoV et en FRNAPH infectieux dans les **eaux usées traitées** de la station de Biganos, avant traitement UV, ont été déterminées une fois par mois entre novembre 2021 et avril 2022 pour avoir un aperçu de la dissémination de ce virus entérique pathogène et de son indicateur viral dans le milieu récepteur. Les résultats sont présentés sur la **figure 9**. Il est important de rappeler ici que les eaux usées traitées de cette station d'épuration, au même titre que celles de La Teste et de Cazaux, ne sont pas rejetées dans la zone intra-Bassin. En effet, l'intégralité de ces eaux usées traitées se rejettent en mer au niveau du point « Wharf », situé plus au sud du Bassin.

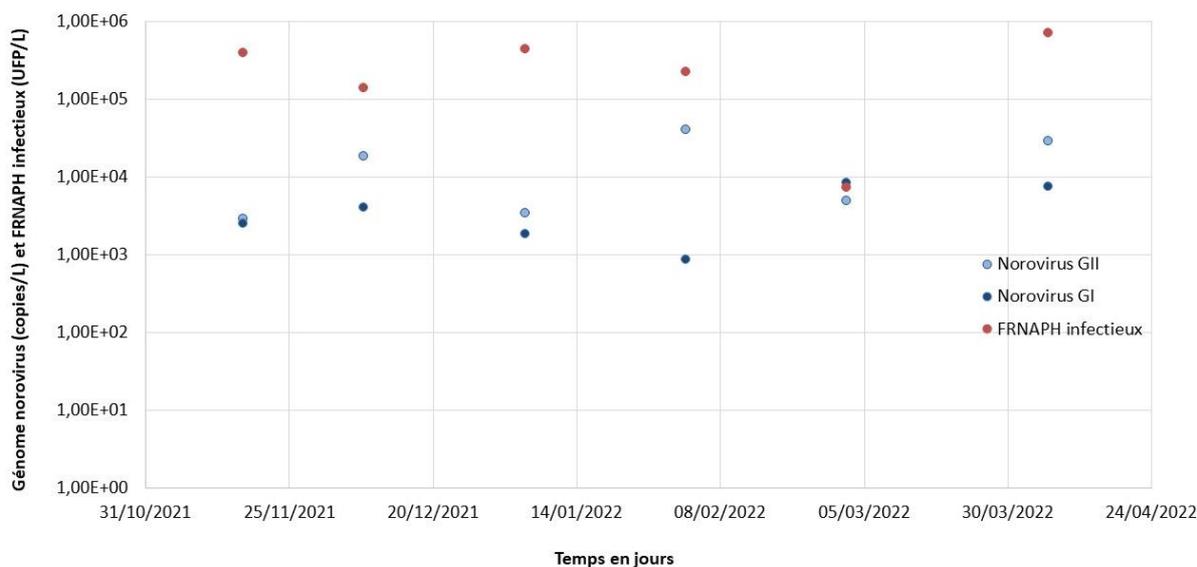


Figure 9 : teneurs en génomes de NoV et en FRNAPH infectieux dans les eaux usées traitées de Biganos avant traitement UV entre nov. 2021 et avr. 2022.

Entre novembre 2021 et avril 2022, correspondant à la période saisonnière des gastro-entérite aiguës, les concentrations en génome de NoV (GI et GII) dans les eaux usées traitées oscillaient entre $8,81 \cdot 10^2$ et $4,06 \cdot 10^4$ copies/L. Les teneurs sont relativement **stables au cours du temps** puisque les moyennes étaient respectivement de $4,25 \cdot 10^3 \pm 3,15 \cdot 10^3$ et $1,66 \cdot 10^4 \pm 1,57 \cdot 10^4$ copies/L pour les NoV GI et GII. Il n'est pas surprenant de retrouver environ **0,5 Log₁₀** de plus en génome de NoV GII puisque ce génogroupe est beaucoup plus prévalent dans les populations humaines, en particulier le NoV GII.4 (van Beek et al., 2018). Les rendements d'extraction sont satisfaisants car supérieurs à 6,1% pour 83% des échantillons analysés (5/6). Un seul échantillon présentait un rendement d'extraction inférieur à 1% (*i.e.* nov. 2021).

A l'exception de l'échantillon analysé en mars 2022 (*i.e.* $7,42 \cdot 10^3$ UFP/L), les concentrations en FRNAPH infectieux dans les eaux usées traitées étaient également **stables au cours du temps**, comprises entre $1,42 \cdot 10^5$ et $7,19 \cdot 10^5$ UFP/L. La concentration moyenne était de $3,22 \cdot 10^5 \pm 2,52 \cdot 10^5$ UFP/L. Ces données sont en accord avec les données de la littérature concernant l'occurrence la concentration en FRNAPH infectieux dans les rejets d'eaux usées (Hartard, 2017). Les résultats bruts sont disponibles dans l'**Annexe 1**.

A ce stade du projet, il est nécessaire de **poursuivre ce travail de surveillance** pour évaluer la prévalence et les teneurs en génome de NoV et en FRNAPH infectieux dans les rejets d'eaux usées pour appréhender l'**empreinte « eau usée traitée »** au niveau de cette zone d'étude. Avec l'aide du SIBA,

ces résultats seront confrontés aux acquis obtenus depuis 2012 par le SIBA, en particulier concernant la variabilité relative à la qualité virologique des eaux et des coquillages au niveau du bassin d'Arcachon. C'est la raison pour laquelle ce suivi mensuel sera de nouveau réalisé lors de la prochaine période hivernale entre novembre 2022 et avril 2023.

IV.2. SURVEILLANCE DES NOROVIRUS ET DES PHAGES ARN F-SPECIFIQUES DANS LES HUITRES ET LES DREISSENES

Les génomes de NoV sont très faiblement détectés dans les huîtres sauvages au niveau des 4 points étudiés (*i.e.* Bordes, Branne, Bélisaire, Jacquets) entre novembre 2021 et avril 2022 (**Annexe 1**). Il en va de même dans les deux points « eau douces » étudiés en utilisant les dreissenés comme outil intégrateur. Brièvement pour les NoV, seuls deux échantillons d'huîtres ont été détectés positifs en génome viral et à des niveaux inférieurs à la limite de quantification (*i.e.* point « Branne » les 05/01/2022 et 02/02/2022). Par ailleurs, le génome des NoV n'a jamais été détecté dans les dreissenés introduites dans les deux points « eau douces ». Ces résultats soulignent que le Bassin d'Arcachon et son affluent (*i.e.* La Leyre) étaient **très peu influencés par une pollution virale pendant cette période hivernale 2021-2022**, ce qui est en cohérence avec le suivi effectué par le SIBA depuis 2012 mais aussi le fait qu'une seule TIAC à NoV dans les huîtres ait été enregistrée lors des deux dernières décennies.

Les **rendements d'extraction** en génome viral ont également été déterminés pour chaque échantillon analysé. Ils oscillent entre 5,0 et 100% pour les huîtres et entre 0,2 et 2,8% pour les dreissenés. Bien que ces deux espèces soient des mollusques bivalves et que la même méthodologie a été appliquée pour extraire les génomes viraux au moyen de la norme NF EN 15216-1 (2017), il apparaît évident que des optimisations méthodologiques mériteraient d'être engagées dans les dreissenés pour améliorer les rendements d'extraction et donc la détection des NoV.

Les données en FRNAPH infectieux sont également renseignées dans l'annexe 1. Les concentrations retrouvées dans les 4 points « huîtres » et les deux points « dreissenés » sont présentées sur la **figure 10**.

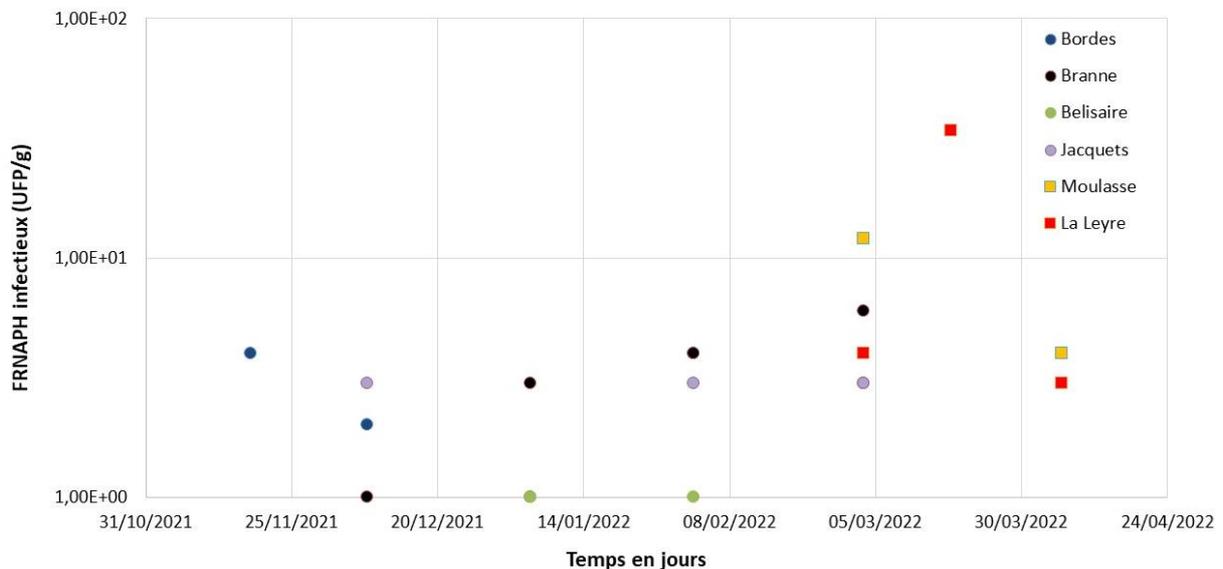


Figure 10 : teneurs en FRNAPH infectieux dans les huîtres (Bordes, Branne, Bélisaire, Jacquets) et les dreissenés (La Leyre, Moulasse) entre nov. 2021 et avr. 2022.

Comme décrit dans l'introduction bibliographique, les FRNAPH infectieux sont décrits comme des indicateurs pertinent du danger à NoV dans les mollusques bivalves influencés par une pollution virale d'origine hydrique (Hartard et al., 2016, 2018).

Brièvement dans les huîtres, les FRNAPH sont détectés dans **62,5%** des échantillons (n=15/24). Les teneurs retrouvées sont faibles (< 6 UFP/g). Même si la représentativité des échantillons est limitée (6 échantillons analysés / site de prélèvement), le **site de Bélisaire** semblerait moins influencé que les trois autres car les FRNAPH infectieux ont été détecté dans 33% des échantillons (n=2/6). Par comparaison aux autres sites, la fréquence de détection en FRNAPH infectieux est supérieure à 66% (n>4/6). Là encore, il est nécessaire de poursuivre cette étude lors de l'hiver 2022-2023 pour apporter plus de robustesse dans les interprétations. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus lors de l'hiver 2020-2021 et le suivi de la qualité virologique effectué par Actalia (données disponibles dans le rapport du SIBA « *Norovirus – Les acquis sur le Bassin d’Arcachon, 2022* »). Les huîtres étaient en effet très peu impactées par une pollution virale (NoV, FRNAPH) et le site de Bélisaire était le moins influencé par une pollution virale. Le génome de NoV et les FRNAPH infectieux n’avaient jamais été détectés dans les eaux durant cette même période.

C’est la raison pour laquelle des **dreissènes** ont été immergées sur les deux points « eau douce » au niveau de « La Leyre » et « Moulasse » pour **améliorer la sensibilité de détection des particules virales** dans les eaux de surface et apporter un caractère intégrateur *via* ces espèces sentinelles. Les concentrations en FRNAPH infectieux sont présentées sur la **figure 10** et les données rapportées dans l’**Annexe 1**. La durée d’immersion des dreissènes dans le milieu récepteur est également décrite dans cette même annexe. Les FRNAPH infectieux ont toujours été détectés entre novembre 2021 et avril 2022. Deux échantillons présentaient des concentrations supérieures à 10 UFP/g (*i.e.* Moulasse en février 2022 et La Leyre en mars 2022).

A ce jour, il est trop tôt pour conclure concernant l’impact de rejets d’eaux traitées émanant de stations d’épuration *via* la nappe et/ou La Leyre car trop peu d’échantillons de dreissènes ont été analysés à ce jour. La poursuite de cette étude lors de l’hiver 2022-2023 apportera des éléments plus tangibles pour améliorer les connaissances sur la circulation de ces virus entériques et sur l’impact de ces cours d’eau au niveau de la zone intra-Bassin.

Le **caractère intégrateur** des dreissènes et leur capacité à concentrer / éliminer la pollution virale dans ses tissus digestifs au cours du temps nécessitera aussi d’être mieux appréhendés pour relier les concentrations en particules virales dans les eaux douces et les dreissènes. Ces aspects sont en cours d’investigations dans le cadre de l’UMT Actia VIROcontrol avec ses partenaires LCPME et SEBIO.

V. CONCLUSION INTERMEDIAIRE ET PERSPECTIVES

Les résultats de cette étude obtenus lors de l'hiver 2021-2022 viennent renforcer les acquis et les connaissances du SIBA dans le cadre de la surveillance de la qualité virologique des eaux et des huîtres au niveau du Bassin d'Arcachon.

Même si le nombre d'échantillons analysés mensuellement pendant cette période d'étude reste faible, il en résulte néanmoins que la **zone intra-Bassin est faiblement exposée à la pollution virale par les NoV**.

A la différence du génome des NoV qui sont très peu détectés dans les huîtres et les dreissènes, l'utilisation des **FRNAPH infectieux** comme indicateurs du danger à NoV dans les mollusques bivalves apporte une réelle **plus-value** dans la mesure où ils sont détectés fréquemment et à des niveaux différents en fonction des points de prélèvements pendant cette période hivernale 2021-2022.

L'accumulation de données sur des périodes hivernales répétées permettra sans nul doute de **hiérarchiser** les points huîtres dans la zone intra-Bassin et de mieux comprendre l'impact (ou non) des rejets des stations d'épuration en utilisant les dreissènes comme outil intégrateur de la pollution virale dans les masses d'eaux douces influençant la zone intra-Bassin.

Les **perspectives** qui seront données à cette étude de surveillance de la qualité virologique des eaux et des coquillages lors de l'hiver 2022-2023 seront préalablement discutées et validées avec le SIBA. Ce sera notamment l'occasion de discuter du maintien des points de prélèvements, de la fréquence des échantillonnages, de la durée d'exposition des dreissènes dans le milieu récepteur, ou encore le suivi de l'empreinte eaux usées traitées (e.g. Biganos, Mios, Marcheprime)

VI. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFSSA (2007). Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. Coord Sci. Rédactionnelle C Bultel Grimault 446. .
- Ahmed, S.M., Hall, A.J., Robinson, A.E., Verhoef, L., Premkumar, P., Parashar, U.D., Koopmans, M., and Lopman, B.A. (2014). Global prevalence of norovirus in cases of gastroenteritis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect. Dis.* *14*, 725–730. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70767-4](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70767-4).
- ASQAAC (2016). Australian Shellfish Quality Assurance Program, Operations Manual. 49. .
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., and Graham, D.Y. (2008). Norwalk Virus Shedding after Experimental Human Infection. *Emerg. Infect. Dis.* *14*, 1553–1557. <https://doi.org/10.3201/eid1410.080117>.
- Atmar, R.L., Opekun, A.R., Gilger, M.A., Estes, M.K., Crawford, S.E., Neill, F.H., Ramani, S., Hill, H., Ferreira, J., and Graham, D.Y. (2014). Determination of the 50% human infectious dose for Norwalk virus. *J. Infect. Dis.* *209*, 1016–1022. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit620>.
- Barrios, M.E., Blanco Fernández, M.D., Cammarata, R.V., Torres, C., and Mbayed, V.A. (2018). Viral tools for detection of fecal contamination and microbial source tracking in wastewater from food industries and domestic sewage. *J. Virol. Methods* *262*, 79–88. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.10.002>.
- Bartsch, S.M., Lopman, B.A., Ozawa, S., Hall, A.J., and Lee, B.Y. (2016). Global Economic Burden of Norovirus Gastroenteritis. *PLoS ONE* *11*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151219>.
- van Beek, J., de Graaf, M., Al-Hello, H., Allen, D.J., Ambert-Balay, K., Botteldoorn, N., Brytting, M., Buesa, J., Cabrerizo, M., Chan, M., et al. (2018). Molecular surveillance of norovirus, 2005-16: an epidemiological analysis of data collected from the NoroNet network. *Lancet Infect. Dis.* *18*, 545–553. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(18\)30059-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30059-8).
- Bellou, M., Kokkinos, P., and Vantarakis, A. (2013). Shellfish-borne viral outbreaks: a systematic review. *Food Environ. Virol.* *5*, 13–23. <https://doi.org/10.1007/s12560-012-9097-6>.
- Berg, D.E., Kohn, M.A., Farley, T.A., and McFarland, L.M. (2000). Multi-state outbreaks of acute gastroenteritis traced to fecal-contaminated oysters harvested in Louisiana. *J. Infect. Dis.* *181 Suppl 2*, S381-386. <https://doi.org/10.1086/315581>.
- Bighiu, M.A., Norman Haldén, A., Goedkoop, W., and Ottoson, J. (2019). Assessing microbial contamination and antibiotic resistant bacteria using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Sci. Total Environ.* *650*, 2141–2149. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.314>.
- Bosch, A (2007). *Human Viruses in Water*, Volume 17 - 1st Edition.
- Boudaud, N. (2020). Suivi de la qualité virologique (norovirus et phages ARN F-spécifiques) dans les huîtres : application terrain sur des zones de production. *ACTALIA* *22*. .
- Burkhardt, W., and Calci, K.R. (2000). Selective accumulation may account for shellfish-associated viral illness. *Appl. Environ. Microbiol.* *66*, 1375–1378. <https://doi.org/10.1128/aem.66.4.1375-1378.2000>.
- Campos, C., Avant, J., Gustar, N., Lowther, J., Powell, A., Stockley, L., and Lees, D. (2015). Fate of Human Noroviruses in Shellfish and Water Impacted by Frequent Sewage Pollution Events. *Environ. Sci. Technol.* *49*, 8377–8385. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b01268>.
- Capizzi-Banas, S., Palos Ladeiro, M., Bastien, F., Bonnard, I., Boudaud, N., Gantzer, C., and Geffard, A. (2021). The Utility of *Dreissena polymorpha* for Assessing the Viral Contamination of Rivers by Measuring the Accumulation of F-Specific RNA Bacteriophages. *Water* *13*, 904. <https://doi.org/10.3390/w13070904>.
- Carducci, A., Verani, M., Battistini, R., Pizzi, F., Rovini, E., Andreoli, E., and Casini, B. (2006). Epidemiological surveillance of human enteric viruses by monitoring of different environmental matrices. *Water Sci. Technol.* *54*, 239–244. <https://doi.org/10.2166/wst.2006.475>.
- CDC (2011). Updated norovirus outbreak management and disease prevention guidelines.
- CDC (2022). <https://www.cdc.gov/norovirus/trends-outbreaks/index.html>.
- Chhabra, P., de Graaf, M., Parra, G.I., Chan, M.C.-W., Green, K., Martella, V., Wang, Q., White, P.A., Katayama, K., Vennema, H., et al. (2019). Updated classification of norovirus genogroups and genotypes. *J. Gen. Virol.* *100*, 1393–1406. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001318>.
- Commission Européenne (1998). Directive 98/83/CE du Conseil du 3 novembre 1998 relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine. *J Union Eur L330*, 1–30. .
- Commission Européenne (2015). Règlement UE 2015/2285 de la commission du 30 janvier 2015 modifiant l'annexe II du règlement CE N° 854/2004 du Parlement Européen. *J Union Eur L323*, 2–4. .
- Commission Européenne (2019). Règlement d'exécution (UE) 2019/627 de la Commission du 15 mars 2019 établissant des modalités uniformes pour la réalisation des contrôles officiels en ce qui concerne les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine conformément au règlement (UE) 2017/625 du Parlement européen et du Conseil et modifiant le règlement (CE) no 2074/2005 de la Commission en ce qui concerne les contrôles officiels. *J Union Eur L 131/51*, 1–51. .
- Cook, N., Knight, A., and Richards, G.P. (2016). Persistence and Elimination of Human Norovirus in Food and on Food Contact Surfaces: A Critical Review. *J. Food Prot.* *79*, 1273–1294. <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-15-570>.
- Croci, L., De Medici, D., Scalfaro, C., Fiore, A., Divizia, M., Donia, D., Cosentino, A.M., Moretti, P., and Costantini, G. (2000). Determination of enteroviruses, hepatitis A virus, bacteriophages and *Escherichia coli* in Adriatic Sea mussels. *J. Appl. Microbiol.* *88*, 293–298. .

Dent, K.C., Thompson, R., Barker, A.M., Hiscox, J.A., Barr, J.N., Stockley, P.G., and Ranson, N.A. (2013). The Asymmetric Structure of an Icosahedral Virus Bound to Its Receptor Suggests a Mechanism for Genome Release. *Structure* 21, 1225–1234. <https://doi.org/10.1016/j.str.2013.05.012>.

Desdouits, M., Piquet, J.-C., Wacrenier, C., Le Menec, C., Parnaudeau, S., Jousse, S., Rocq, S., Bigault, L., Contrant, M., Garry, P., et al. (2021). Can shellfish be used to monitor SARS-CoV-2 in the coastal environment? *Sci. Total Environ.* 778, 146270. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.146270>.

DGAL (2020). Instruction Technique - Gestion du risque norovirus en lien avec la consommation des coquillages. Instr. Tech. DGAL-SDSSA-2020-785 30. .

Donaldson, E.F., Lindesmith, L.C., Lobue, A.D., and Baric, R.S. (2010). Viral shape-shifting: norovirus evasion of the human immune system. *Nat. Rev. Microbiol.* 8, 231–241. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2296>.

D’Souza, D.H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., and Jaykus, L. (2006). Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *Int. J. Food Microbiol.* 108, 84–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.024>.

EFSA (2011). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA J.* 9, 2190. .

EFSA (2013). Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations. *EFSA Panel Biol. Hazards BIOHAZ* 11.

EFSA (2015). The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2014. *EFSA J.* 13, 191. .

EFSA (2016). Technical specifications for a European baseline survey of norovirus in oysters. *EFSA J.* 14, 62. .

EFSA and ECDC (2022). The European Union One Health 2020 Zoonoses Report. *EFSA J.* 19(12): 6971.

Ettayebi, K., Crawford, S.E., Murakami, K., Broughman, J.R., Karandikar, U., Tenge, V.R., Neill, F.H., Blutt, S.E., Zeng, X.-L., Qu, L., et al. (2016). Replication of Human Noroviruses in Stem Cell-Derived Human Enteroids. *Science* 353, 1387–1393. <https://doi.org/10.1126/science.aaf5211>.

Ettayebi, K., Tenge, V.R., Cortes-Penfield, N.W., Crawford, S.E., Neill, F.H., Zeng, X.-L., Yu, X., Ayyar, B.V., Burrin, D., Ramani, S., et al. (2021). New Insights and Enhanced Human Norovirus Cultivation in Human Intestinal Enteroids. *MSphere* 6. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01136-20>.

Fauvel, B., Cauchie, H.-M., Gantzer, C., and Ogorzaly, L. (2016). Contribution of hydrological data to the understanding of the spatio-temporal dynamics of F-specific RNA bacteriophages in river water during rainfall-runoff events. *Water Res.* 94, 328–340. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2016.02.057>.

Fauvel, B., Gantzer, C., Cauchie, H.-M., and Ogorzaly, L. (2017). In Situ Dynamics of F-Specific RNA Bacteriophages in a Small River: New Way to Assess Viral Propagation in Water Quality Studies. *Food Environ. Virol.* 9, 89–102. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9266-0>.

FDA (2015). National Shellfish Sanitation Program (NSSP) - Guide for the control of molluscan shellfish 2015. 456. .

Flannery, J., Keaveney, S., and Doré, W. (2009). Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. *J. Food Prot.* 72, 2358–2362. .

Flannery, J., Keaveney, S., Rajko-Nenow, P., O’Flaherty, V., and Doré, W. (2013). Norovirus and FRNA bacteriophage determined by RT-qPCR and infectious FRNA bacteriophage in wastewater and oysters. *Water Res.* 47, 5222–5231. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.008>.

Formiga-Cruz, M., Allard, A.K., Conden-Hansson, A.-C., Henshilwood, K., Hernroth, B.E., Jofre, J., Lees, D.N., Lucena, F., Papapetropoulou, M., Rangdale, R.E., et al. (2003). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 1556–1563. .

Fout, G.S., Borchardt, M.A., Kieke, B.A., and Karim, M.R. (2017). Human virus and microbial indicator occurrence in public-supply groundwater systems: meta-analysis of 12 international studies. *Hydrogeol. J.* 25, 903–919. <https://doi.org/10.1007/s10040-017-1581-5>.

Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., and Gantzer, C. (2003). Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 3965–3969. .

Goblick, G.N., Anbarchian, J.M., Woods, J., Burkhardt, W., and Calci, K. (2011). Evaluating the Dilution of Wastewater Treatment Plant Effluent and Viral Impacts on Shellfish Growing Areas in Mobile Bay, Alabama. *J. Shellfish Res.* 30, 979–987. <https://doi.org/10.2983/035.030.0341>.

Haga, K., Ettayebi, K., Tenge, V.R., Karandikar, U.C., Lewis, M.A., Lin, S.-C., Neill, F.H., Ayyar, B.V., Zeng, X.-L., Larson, G., et al. (2020). Genetic Manipulation of Human Intestinal Enteroids Demonstrates the Necessity of a Functional Fucosyltransferase 2 Gene for Secretor-Dependent Human Norovirus Infection. *MBio* 11. <https://doi.org/10.1128/mBio.00251-20>.

Hardstaff, J.L., Clough, H.E., Lutje, V., McIntyre, K.M., Harris, J.P., Garner, P., and O’Brien, S.J. (2018). Foodborne and Food-Handler Norovirus Outbreaks: A Systematic Review. *Foodborne Pathog. Dis.* 15, 589–597. <https://doi.org/10.1089/fpd.2018.2452>.

Hardy, M.E. (2005). Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol. Lett.* 253, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.08.031>.

Hartard, C. (2017). Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires. Thèse Universitaire BioSE - Univ. Lorraine 223p.

- 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. <https://doi.org/10.1128/AEM.01905-15>.
- Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., and Gantzer, C. (2016). Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 5709–5719. <https://doi.org/10.1128/AEM.01528-16>.
- Hartard, C., Banas, S., Rivet, R., Boudaud, N., and Gantzer, C. (2017). Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. *Food Microbiol.* *63*, 248–254. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.12.002>.
- Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N., and Gantzer, C. (2018). F-Specific RNA Bacteriophages, Especially Members of Subgroup II, Should Be Reconsidered as Good Indicators of Viral Pollution of Oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* *84*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01866-17>.
- Harwood, V.J., Levine, A.D., Scott, T.M., Chivukula, V., Lukasik, J., Farrah, S.R., and Rose, J.B. (2005). Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl. Environ. Microbiol.* *71*, 3163–3170. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.6.3163-3170.2005>.
- Hata, A., Katayama, H., Kojima, K., Sano, S., Kasuga, I., Kitajima, M., and Furumai, H. (2014). Effects of rainfall events on the occurrence and detection efficiency of viruses in river water impacted by combined sewer overflows. *Sci. Total Environ.* *468–469*, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.08.093>.
- Havelaar, A.H., Pot-Hogbeem, W.M., Furuse, K., Pot, R., and Hormann, M.P. (1990). F-specific RNA bacteriophages and sensitive host strains in faeces and wastewater of human and animal origin. *J. Appl. Bacteriol.* *69*, 30–37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02908.x>.
- Havelaar, A.H., van Olphen, M., and Drost, Y.C. (1993). F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl. Environ. Microbiol.* *59*, 2956–2962. <https://doi.org/10.1128/AEM.59.9.2956-2962.1993>.
- Hodgson, K.R., Torok, V.A., and Turnbull, A.R. (2017). Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. *Food Microbiol.* *65*, 284–293. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.003>.
- Iaconelli, M., Muscillo, M., Della Libera, S., Fratini, M., Meucci, L., De Ceglia, M., Giacosa, D., and La Rosa, G. (2017). One-year Surveillance of Human Enteric Viruses in Raw and Treated Wastewaters, Downstream River Waters, and Drinking Waters. *Food Environ. Virol.* *9*, 79–88. <https://doi.org/10.1007/s12560-016-9263-3>.
- 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*.
- 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.
- Karst, S.M. (2010). Pathogenesis of noroviruses, emerging RNA viruses. *Viruses* *2*, 748–781.
- Kerambrun, E., Palos Ladeiro, M., Bigot-Clivot, A., Dedouge-Geffard, O., Dupuis, E., Villena, I., Aubert, D., and Geffard, A. (2016). Zebra mussel as a new tool to show evidence of freshwater contamination by waterborne *Toxoplasma gondii*. *J. Appl. Microbiol.* *120*, 498–508. <https://doi.org/10.1111/jam.12999>.
- Kirk, M.D., Pires, S.M., Black, R.E., Caipo, M., Crump, J.A., Devleeschauwer, B., Döpfer, D., Fazil, A., Fischer-Walker, C.L., Hald, T., et al. (2015). World Health Organization Estimates of the Global and Regional Disease Burden of 22 Foodborne Bacterial, Protozoal, and Viral Diseases, 2010: A Data Synthesis. *PLoS Med.* *12*, e1001921. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001921>.
- Koopmans, M., and Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.* *90*, 23–41.
- Kroneman, A., Verhoef, L., Harris, J., Vennema, H., Duizer, E., van Duynhoven, Y., Gray, J., Iturriza, M., Böttiger, B., Falkenhorst, G., et al. (2008). Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J. Clin. Microbiol.* *46*, 2959–2965. <https://doi.org/10.1128/JCM.00499-08>.
- Le Guyader, F., Loisy, F., Atmar, R.L., Hutson, A.M., Estes, M.K., Ruvoën-Clouet, N., Pommepuy, M., and Le Pendu, J. (2006a). Norwalk virus-specific binding to oyster digestive tissues. *Emerg. Infect. Dis.* *12*, 931–936.
- Le Guyader, F.S., Bon, F., DeMedici, D., Parnaudeau, S., Bertone, A., Crudeli, S., Doyle, A., Zidane, M., Suffredini, E., Kohli, E., et al. (2006b). Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.* *44*, 3878–3882. <https://doi.org/10.1128/JCM.01327-06>.
- Leduc, A., Leclerc, M., Challant, J., Loutreul, J., Robin, M., Maul, A., Majou, D., Boudaud, N., and Gantzer, C. (2020). F-Specific RNA Bacteriophages Model the Behavior of Human Noroviruses during Purification of Oysters: the Main Mechanism Is Probably Inactivation Rather than Release. *Appl. Environ. Microbiol.* *86*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00526-20>.
- Lopes, C., Chaumot, A., Xuereb, B., Coulaud, R., Jubeaux, G., Quéau, H., François, A., and Geffard, O. (2020). In Situ Reproductive Bioassay with Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea): Part 2-Evaluating the Relevance of Using a Molt Cycle Temperature-Dependent Model as a Reference to Assess Toxicity in Freshwater Monitoring. *Environ. Toxicol. Chem.* *39*, 678–691. <https://doi.org/10.1002/etc.4656>.
- Lowther, J.A., Henshilwood, K., and Lees, D.N. (2008). Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food Prot.* *71*, 1427–1433.
- Lowther, J.A., Avant, J.M., Gizynski, K., Rangdale, R.E., and Lees, D.N. (2010). Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J. Food Prot.* *73*, 305–311.

- Lowther, J.A., Cross, L., Stapleton, T., Gustar, N.E., Walker, D.I., Sills, M., Treagus, S., Pollington, V., and Lees, D.N. (2019). Use of F-Specific RNA Bacteriophage to Estimate Infectious Norovirus Levels in Oysters. *Food Environ. Virol.* *11*, 247–258. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09383-3>.
- Lucena, F., Ribas, F., Duran, A.E., Skraber, S., Gantzer, C., Campos, C., Morón, A., Calderón, E., and Jofre, J. (2006). Occurrence of bacterial indicators and bacteriophages infecting enteric bacteria in groundwater in different geographical areas. *J. Appl. Microbiol.* *101*, 96–102. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02907.x>.
- 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. <https://doi.org/10.1111/lam.12736>.
- Mezzanotte, V., Marazzi, F., Bissa, M., Pacchioni, S., Binelli, A., Parolini, M., Magni, S., Ruggeri, F.M., De Giuli Morghen, C., Zanotto, C., et al. (2016). Removal of enteric viruses and *Escherichia coli* from municipal treated effluent by zebra mussels. *Sci. Total Environ.* *539*, 395–400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.09.007>.
- Ministère de la Santé et des Solidarités (2007). Arrêté du 11 janvier 2007 relatif aux limites et références de qualité des eaux brutes et des eaux destinées à la consommation humaine mentionnées aux articles R. 1321-2, R. 1321-3, R. 1321-7 et R. 1321-38 du code de la santé publique. *J Répub. Fr.* *31* 2180.
- 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*. .
- NF EN ISO 15216-2 (2019). Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR -- Part 2: Method for qualitative detection. *Int. Organ. Stand. Geneva Switz.* *28*.
- Parlement Européen (2002). Règlement (CE) N° 178/2002 du Parlement Européen et du Conseil du 28 janvier 2002 établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l’Autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. *J Union Eur* *2002R0178*, 1–42. .
- Parlement Européen (2004a). Règlement CE N° 854/2004 du Parlement Européen et du conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d’organisation des contrôles officiels concernant les produits d’origine animale destinés à la consommation humaine. *J Union Eur* *L226/83*, 1–45. .
- Parlement Européen (2004b). Règlement (CE) n° 853/2004 du Parlement Européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant des règles spécifiques d’hygiène applicables aux denrées alimentaires d’origine animale. *J Union Eur* *L226/22*, 1–61. .
- Parlement Européen (2005). Règlement (CE) n°2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *J Union Eur* *L338*, 1–34. .
- Perrin, A., Loutreul, J., Boudaud, N., Bertrand, I., and Gantzer, C. (2015). Rapid, simple and efficient method for detection of viral genomes on raspberries. *J. Virol. Methods* *224*, 95–101. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2015.08.005>.
- Randazzo, W., Piqueras, J., Rodríguez-Díaz, J., Aznar, R., and Sánchez, G. (2018). Improving efficiency of viability-qPCR for selective detection of infectious HAV in food and water samples. *J. Appl. Microbiol.* *124*, 958–964. <https://doi.org/10.1111/jam.13519>.
- Richards, G.P. (1988). Microbial Purification of Shellfish: A Review of Depuration and Relaying. *J. Food Prot.* *51*, 218–251. <https://doi.org/10.4315/0362-028X-51.3.218>.
- Richards, G.P. (2001). Enteric virus contamination of foods through industrial practices: a primer on intervention strategies. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* *27*, 117–125. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.7000095>.
- Santé Publique France (2021). Surveillance des toxi-infections alimentaires collectives. Données de la déclaration obligatoire, 2019. *12*. .
- Schaper, M., Jofre, J., Uys, M., and Grabow, W.O.K. (2002). Distribution of genotypes of F-specific RNA bacteriophages in human and non-human sources of faecal pollution in South Africa and Spain. *J. Appl. Microbiol.* *92*, 657–667. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2002.01600.x>.
- Seitz, S.R., Leon, J.S., Schwab, K.J., Lyon, G.M., Dowd, M., McDaniels, M., Abdulhafid, G., Fernandez, M.L., Lindesmith, L.C., Baric, R.S., et al. (2011). Norovirus infectivity in humans and persistence in water. *Appl. Environ. Microbiol.* *77*, 6884–6888. <https://doi.org/10.1128/AEM.05806-11>.
- Tian, P., Engelbrektsen, A.L., Jiang, X., Zhong, W., and Mandrell, R.E. (2007). Norovirus recognizes histo-blood group antigens on gastrointestinal cells of clams, mussels, and oysters: a possible mechanism of bioaccumulation. *J. Food Prot.* *70*, 2140–2147. <https://doi.org/10.4315/0362-028x-70.9.2140>.
- Torok, V.A., Hodgson, K.R., Jolley, J., and Turnbull, A. (2021). Investigation of F-RNA Bacteriophage as a Tool in Re-Opening Australian Oyster Growing Areas Following Sewage Spills. *Food Environ. Virol.* doi: 10.1007/s12560-021-09462-4. <https://doi.org/10.1007/s12560-021-09462-4>.
- US EPA (2006). National Primary Drinking Water Regulations: Ground Water Rule. (EPA-HQ-OW-2002- 0061).
- US EPA (2015). Review of Coliphages As Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality (820-R-15-098).
- Vaillant, V., Jourdan-Da Silva, N., Quilici, M-L., Couturier, E., Le Guyader, S., Delmas, G., and Le Saux, J-C. (2012). Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bull Epidemiol Santé Anim* *50*, 42–46.
- Woods, J.W., Calci, K.R., Marchant-Tambone, J.G., and Burkhardt, W. (2016). Detection and molecular characterization of norovirus from oysters implicated in outbreaks in the US. *Food Microbiol.* *59*, 76–84. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.05.009>.
- Younger, A.D., Neish, A., Walker, D.I., Jenkins, K.L., Lowther, J.A., Stapleton, T.A., and Alves, M.T. (2020). Strategies to reduce norovirus (NoV) contamination from oysters under depuration conditions. *Food Chem. Toxicol.* *143*, 111509. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2020.111509>.

VII. ANNEXE 1

Tableau A : concentrations en génomes de NoV et FRNAPH infectieux dans les huîtres entre nov. 2021 et avril 2022.

Analyses huîtres						
n°	Tag ech	Date réception	FRNAPH infectieux (UFP/g)	Norovirus GI (copies/g)	Norovirus GII (copies/g)	Rendement extraction
1	BORDES	18/11/2021	4	non détecté	non détecté	94%
2	BRANNE	18/11/2021	non détecté	non détecté	non détecté	96%
3	BELISAIRE	18/11/2021	non détecté	non détecté	non détecté	66%
4	LES JACQUETS	18/11/2021	non détecté	non détecté	non détecté	100%
5	BORDES	08/12/2021	2	non détecté	non détecté	12%
6	BRANNE	08/12/2021	1	non détecté	non détecté	20%
7	BELISAIRE	08/12/2021	non détecté	non détecté	non détecté	11%
8	LES JACQUETS	08/12/2021	3	non détecté	non détecté	20%
9	BORDES	05/01/2022	1	non détecté	non détecté	31%
10	BRANNE	05/01/2022	3	non détecté	< LQ (60)	27%
11	BELISAIRE	05/01/2022	1	non détecté	non détecté	30%
12	LES JACQUETS	05/01/2022	non détecté	non détecté	non détecté	24%
13	BORDES	02/02/2022	4	non détecté	non détecté	26%
14	BRANNE	02/02/2022	4	non détecté	< LQ (78)	23%
15	BELISAIRE	02/02/2022	1	non détecté	non détecté	53%
16	LES JACQUETS	02/02/2022	3	non détecté	non détecté	25%
17	BORDES	03/03/2022	3	non détecté	non détecté	26%
18	BRANNE	03/03/2022	6	non détecté	non détecté	23%
19	BELISAIRE	03/03/2022	non détecté	non détecté	non détecté	36%
20	LES JACQUETS	03/03/2022	3	non détecté	non détecté	76%
21	BORDES	06/04/2022	non détecté	non détecté	non détecté	15%
22	BRANNE	06/04/2022	non détecté	non détecté	non détecté	5%
23	BELISAIRE	06/04/2022	non détecté	non détecté	non détecté	22%
24	LES JACQUETS	06/04/2022	3	non détecté	non détecté	20%

Tableau B : concentrations en génomes de NoV et FRNAPH infectieux dans les dreissènes entre nov. 2021 et avril 2022.

Analyses eaux douces (dreissènes)								
n°	Tag ech	Date Réception	Site étudié	FRNAPH infectieux (UFP/g)	Norovirus GI (copies/g)	Norovirus GII (copies/g)	Rendement extraction	Durée incubation milieu récepteur
1	ENKI 0605	03/03/2022	Moullasse	12	non détecté	non détecté	0,4%	21 jours
2	ENKI 0711	03/03/2022	La Leyre	4	non détecté	non détecté	2,3%	21 jours
3	Lamotte	18/03/2022	La Leyre	34	non détecté	non détecté	0,2%	14 jours
4	Moullasse	18/03/2022	Moullasse	NR	NA	NA	NA	NA
5	Moullasse	06/04/2022	Moullasse	4	non détecté	non détecté	0,7%	18 jours
6	La Leyre	06/04/2022	La Leyre	3	non détecté	non détecté	2,8%	18 jours

Tableau C : concentrations en génomes de NoV et FRNAPH infectieux dans les eaux usées traitées de Biganos (avant traitement UV) entre nov. 2021 et avril 2022.

Analyses Biganos - eau traitée avant traitement UV							
n°	Date Réception	lots	Site étudié	FRNAPH infectieux (UFP/g)	Norovirus GI (copies/g)	Norovirus GII (copies/g)	Rendement extraction
1	17/11/2021		Biganos	3,97E+05	2,52E+03	2,92E+03	0,2%
2	08/12/2021		Biganos	1,42E+05	4,10E+03	1,84E+04	20,2%
3	05/01/2022		Biganos	4,40E+05	1,88E+03	3,50E+03	30,6%
4	02/02/2022		Biganos	2,26E+05	8,81E+02	4,06E+04	54,4%
5	02/03/2022		Biganos	7,42E+03	8,59E+03	4,99E+03	100%
6	06/04/2022		Biganos	7,19E+05	7,56E+03	2,92E+04	6,11%