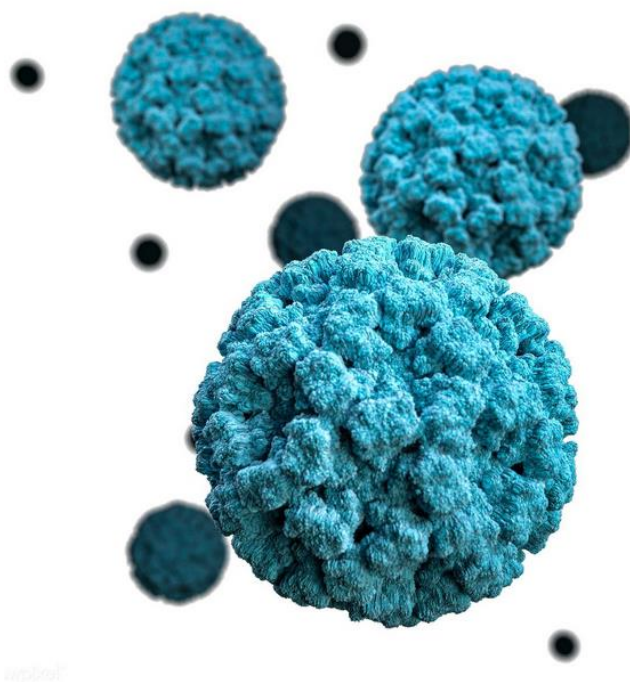




# Norovirus : Les acquis sur le Bassin d'Arcachon

*Janvier 2022*



*Travaux en partie réalisés dans le cadre du Pôle de recherche SIBA-ELOA  
Rapport rédigé par le SIBA avec la contribution du laboratoire Actalia*

## AVANT-PROPOS

A ce jour (janvier 2022), le Bassin d’Arcachon n’enregistre qu’un seul épisode de fermeture sanitaire pour cause de toxi-infections alimentaires collectives (TIAC), par consommation de coquillages contaminés par des norovirus, survenu très récemment en février 2021.

A contrario, ces épisodes sont réguliers sur d’autres zones littorales françaises, entraînant des arrêts de commercialisation très préjudiciables aux entreprises, par exemple durant l’hiver 2019-2020 avec 33 zones de production fermées sur l’ensemble du littoral français, suite à 197 TIAC rapportées.

Vigilant sur les problématiques que peuvent rencontrer les professions conchylicoles en lien avec la qualité de l’eau, le SIBA investigate ce sujet depuis 2012 afin d’acquérir pour le Bassin d’Arcachon, des connaissances et compétences sur ces norovirus, ponctuellement incriminés dans des épisodes de TIAC après consommation de coquillages.

En 2012, le Bassin d’Arcachon avait été jugé peu vulnérable vis-à-vis d’une contamination des coquillages par les norovirus alors que les pouvoirs publics et organisations professionnelles s’intéressaient à ce sujet et aux causes de fermetures administratives récurrentes sur la zone de production de l’Etang de Thau<sup>1</sup>. Le manque de connaissances et données pour le Bassin d’Arcachon avait toutefois interpellé le SIBA. Aucune recherche de norovirus n’avait été faite, ni dans les eaux résiduaires, ni dans l’environnement. A savoir, et c’est encore le cas aujourd’hui, que le réseau de contrôle microbiologique des coquillages dans les zones de production se base sur le critère *E.Coli* (bactérie).

Le SIBA engage alors à cette époque un travail bibliographique sur le comportement des norovirus dans les systèmes d’assainissement des eaux usées, la capacité à en mesurer les niveaux sur les eaux brutes et traitées suivant les types de traitements réalisés.

S’en suivent des séries d’analyses sur le système d’assainissement collectif des eaux usées et dans différentes matrices du Bassin d’Arcachon et de ses tributaires.

Les limites des méthodes rendent complexes les interprétations jusqu’alors partagées au sein d’un groupe de travail local associant notamment le comité conchylicole. Ce constat est confirmé par une récente étude européenne sur la prévalence en génomes de norovirus dans les zones de production et les établissements d’expédition d’huîtres creuses, publiée en 2019 par l’EFSA et objet de débats au sein des instances de l’union européenne<sup>2</sup>. En effet, les méthodes ISO disponibles présentent l’inconvénient de ne pas apporter d’information sur le

---

<sup>1</sup> Rapport interministériel 2013 - <https://cgedd.documentation.developpement-durable.gouv.fr/notice?id=Affaires-0006979>

<sup>2</sup> <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2019.5762> et [https://aac-europe.org/images/jdownloads/Recommandation\\_du\\_CCA\\_Norovirus\\_2.pdf](https://aac-europe.org/images/jdownloads/Recommandation_du_CCA_Norovirus_2.pdf)

caractère infectieux des NoV lorsque le génome de ces virus est détecté dans un aliment ou dans l’eau (NF EN ISO 15216-1, 2017).

Le SIBA livre ici une synthèse des travaux et résultats qui a vocation à être partagée et discutée avec les acteurs concernés. Les interprétations restent prudentes et nécessairement évolutives au gré des recherches en cours sur le sujet.

## SOMMAIRE

AVANT-PROPOS.....	2
I. Qu’est-ce que les norovirus ?.....	5
A. Les norovirus, principaux responsables des épidémies de gastroentérite...5	
B. Leur possible présence dans les eaux marines.....	7
1. De l’homme au milieu .....	7
2. Du milieu au coquillage.....	8
C. Règlementation et surveillance des productions conchylicoles.....	9
1. Une surveillance microbiologique basée sur le critère <i>E.coli</i> .....	9
2. La gestion du risque NoV en discussion .....	12
II. Méthodes d’analyses des norovirus.....	14
III. Empreinte des norovirus dans le système d’assainissement des eaux usées du Bassin d’Arcachon.....	19
1. Présentation du système d’assainissement collectif des eaux usées du Bassin d’Arcachon.....	19
2. Les campagnes d’analyses réalisées .....	21
3. Présentation des résultats.....	23
IV. Empreinte des norovirus dans l’environnement du Bassin d’Arcachon et ses tributaires.....	28
1. Des investigations pour comprendre.....	28
2. Le Bassin d’Arcachon présente-il une empreinte en norovirus ?.....	29
3. D’où provient cette empreinte génomique intra-bassin : Investigations dans les tributaires.....	38
V. Discussion.....	49
VI. Bibliographie recensée.....	52

## I. Qu’est-ce que les norovirus ?

### A. Les norovirus, principaux responsables des épidémies de gastroentérite

Les norovirus (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 des virus nus d’environ 40 nm de diamètre possédant une capsid e icosaédrique de symétrie T=3 dans lequel se trouve un acide ribonucléique (ARN) monocaténaire de polarité positive d’environ 7 400 à 7 700 nucléotides (Chhabra et al., 2019).

Le NoV GII.4 est le génotype 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  $10^6$  et  $10^9$  copies de génome / gramme pendant environ 4 à 8 semaines (Atmar et al., 2008).

La dose infectieuse pour l’Homme ( $DI_{50}$ ) 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-génomes de NoV (Atmar et al., 2014; Ettayebi et al., 2021). Sachant que le ratio génome / virus infectieux est au moins de dix, il est probable que cette  $DI_{50}$  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  $DI_{50}$  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 capsid e et un génome viral intègres. Si tel est le cas, les virus sont considérés comme infectieux. Le Tableau 1 récapitule les principales caractéristiques des NoV.

**Tableau 1.** Caractéristiques principales des norovirus (Extrait de Collet 2012). (GEA = Gastroentérite aiguë)

Famille / genre	Groupes infectant l’homme	Caractéristiques	Aspects cliniques	Dose infectieuse (DI)	Séroprévalence
Caliciviridae / Norovirus	GI GII dont GII.4 majoritaire en France et dans le monde	ARN simple brin <u>Difficilement cultivable in vitro ou in vivo</u> Liaison spécifique aux tissus digestifs de l’huître	-Incubation : 1 à 2 jours pour GEA -Symptômes : 2-3 jours -Touche tous les âges	DI : environs 10 virions 10 <sup>7</sup> à 10 <sup>10</sup> virions par g de selles excrétées sur 7 à 10 jours chez une personne atteinte	Première cause de gastroentérite d’origine virale tous âges confondus

Les pics de gastroentérites (GEA) dues à ces virus se situent généralement pendant la période hivernale entre les mois de novembre et mars (Mounts *et al.* 2000 ; Chikhi-Brachet *et al.* 2002, cités par Fiori 2004). Ce phénomène multifactoriel (INVS 2012, Collet 2012), semble lié aux températures généralement plus faibles et à l’humidité qui favorise la survie des virus, des espaces plus confinés et moins aérés favorisant la transmission par aérosols.

Les NoV 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) .

L’analyse de 5 036 données épidémiologiques entre 2001 et 2006 dans 11 Etats Membres de l’UE montrait que la transmission des NoV 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).

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 (Bellou *et al.*, 2013; EFSA, 2013; Moreira and Bondelind, 2017; Naseri *et al.*, 2019; Randazzo and Sánchez, 2020).

Depuis 2010, les épidémies liées aux virus entériques représentent au moins 9,8% et 35% de l’ensemble des TIAC rapportées en Europe et aux USA, respectivement (CDC, 2021; EFSA and ECDC, 2021).

En France, 9% des TIAC (Toxi Infections Alimentaires Collectives) rapportées en 2013 étaient liées à une consommation de coquillages (InVS, 2013). Selon les données de TIAC à coquillages pour les années 1996 à 2010, les NoV sont la première cause identifiée et représentent 31% des cas dont l’origine est précisée, devant les phycotoxines diarrhéiques (DSP, Diarrheic Shellfish Poisoning,) (Vaillant *et al.*, 2012).

Lors de l’hiver 2019-2020, 197 TIAC à NoV dans les huîtres ont été déclarées en France, causant 1121 cas de gastro-entérites aiguës (*données DGAL, 2021*). Le RASFF a également signalé 57 TIAC à NoV avec 265 malades le même hiver, principalement au Danemark, en Suède, à Malte et en Finlande.

La majorité des épidémies de gastroentérites aiguës (GAE) liées à la consommation de coquillages concerne les huîtres (Thomas *et al.* 2011).

La contamination de ces mollusques bivalves par les NoV a généralement lieu lors de leur élevage. Ces zones conchylicoles côtières peuvent en effet être influencées par une pollution fécale d’origine humaine (Campos *et al.*, 2015; Hassard *et al.*, 2017; Huppertz *et al.*, 2008). Elle peut être significative pendant la période hivernale d’épidémies de gastro-entérites et peut s’amplifier en cas de saturation du réseau d’assainissement des eaux usées et déversements vers le milieu naturel.

Enfin, 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; Campos and Lees, 2014).

## B. Leur possible présence dans les eaux marines

### 1. De l’homme au milieu

Les NoV, comme les autres virus entériques, se retrouvent de manière commune dans le réseau d’assainissement des eaux usées et au niveau des stations d’épuration. Le profil de présence des virus entériques (dont les NoV) semble être indépendant du type de population, de la taille de la station et du mode de traitement appliqué (Hewitt *et al.* 2011 ; Da Silva *et al.* 2007). Pour Hewitt *et al.* (2011), les NoV sont susceptibles d’être présents dans tout effluent non désinfecté. Ces éléments font l’objet du chapitre III dans le présent document.

L’assainissement autonome ne constitue pas une source prégnante de dispersion des NoV dans l’environnement. Ainsi, l’ANSES (2010) a conclu que si les dispositifs d’assainissement autonomes « *sont correctement réalisés et entretenus et si les épandages sont correctement dimensionnés, du point de vue microbiologique les abattements de microorganismes par l’assainissement non collectif sont supérieurs à ceux obtenus dans les stations d’épuration* » [...] « *Le risque de dissémination de virus vers le milieu souterrain ou superficiel est très faible que ce soit en sol naturel ou reconstitué. L’effluent pourra de plus subir une filtration supplémentaire par le terrain à l’aval des dispositifs si les caractéristiques de celui-ci le permettent* » [...] « *Il reste que les dispositifs anciens ne sont pas obligatoirement aux normes et peuvent être à l’origine de débordements* ».

D’une manière générale, les risques de transfert de NoV par ces types de traitement sont à prendre en considération en fonction de leur distance au littoral et de la pédologie de la zone (Fiori 2004).

Une présence de NoV dans le milieu récepteur résulte :

- du rejet d’eaux usées traitées dans le milieu récepteur ;
- en cas de défaillance du réseau d’assainissement, et notamment en cas de débordement lors de forts épisodes pluvieux, d’une contamination accidentelle du milieu par des rejets d’eaux usées brutes.
- d’un rejet direct en zone littorale par les baigneurs ou les bateaux, réputé marginal mais susceptible d’impacter localement une zone de production.

## 2. Du milieu au coquillage

Pour se nourrir et respirer, la plupart des coquillages filtrent par leurs branchies de grandes quantités d’eau ; une huître peut par exemple filtrer jusqu’à 5 litres d’eau par heure. Les microorganismes peuvent ainsi être absorbés de manière passive ou active (cf. infra) par le coquillage. Ainsi les bivalves filtreurs peuvent concentrer les virus entériques dans leurs tissus digestifs jusqu’à 50 fois par rapport à l’eau (Loisy *et al.* 2005).

La bioaccumulation des virus dans les coquillages représente un phénomène rapide, ainsi après une heure de contact, les virus sont adsorbés par les tissus et des concentrations maximales en virus peuvent être obtenues à partir de six heures d’exposition (Abad *et al.* 1997, cité par ANSES 2010).

Pendant longtemps, les coquillages ont été considérés comme des filtres accumulant de manière passive les bactéries ou les virus. Or des travaux plus récents tendent à prouver le contraire : l’huître n’est pas juste un filtre passif, mais peut sélectionner certaines souches de virus (et notamment de NoV) grâce à des ligands très proches de ceux utilisés comme facteurs d’attachement spécifiques favorisant l’infection des NoV dans les cellules intestinales de l’Homme : les Histo-Blood Group Antigens (HBGA) (Maalouf 2014, 2010 ; Le Guyader *et al.* 2013). Il a notamment été mis en évidence une accumulation spécifique des NoV dans les glandes digestives de certains coquillages (*i.e.* huîtres, moules, palourdes) *via* la fixation spécifique à des carbohydrates qualifiés de « pseudo-HBGA » (Tian *et al.*, 2007). Il est désormais bien établi que les adhésions non spécifiques (*i.e.* électrostatiques, hydrophobes) et spécifiques (*i.e.* liaisons à certains ligands) favorisent l’accumulation et la survie des particules virales dans les aliments à risque (Almand *et al.*, 2017; Berger *et al.*, 2010; Brié, 2017). L’ensemble de ces interactions sont susceptibles d’augmenter la transmission de ces virus par les aliments et l’environnement même si de nombreuses zones d’ombres nécessitent d’être éclaircies (Chassaing *et al.*, 2020).



## C. Règlementation et surveillance des productions conchyliques

### 1. Une surveillance microbiologique basée sur le critère *E. coli*

#### Le classement de zone :

Pour maîtriser les risques sanitaires liés à la consommation de coquillages, la France a imposé dès 1939 le classement des zones de production de coquillages. Celui-ci est à présent encadré par la législation européenne. La qualité microbiologique des coquillages est gouvernée depuis 2017 par le Règlement UE 2015/2285 modifiant l’Annexe II du Règlement CE 854/2004 (Commission Européenne, 2015; Parlement Européen, 2004a).

#### *Références réglementaires :*

- *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*
- *Règlement (CE) n° 1881/2006 du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.*
- *Code Rural et de la Pêche Maritime*
- *Arrêté du 6 novembre 2013 relatif au classement, à la surveillance et à la gestion sanitaire des zones de production et des zones de reparcage des coquillages vivants*

Le classement s’établit sur la base d’analyses de coquillages d’un groupe donné issus de la zone.

Trois groupes de coquillages sont définis et se distinguent au regard de leur physiologie, soit leur aptitude à la contamination et à la purification vis à vis des contaminants microbiologiques :

- Groupe 1 : les gastéropodes marins (bulots, bigorneaux, ormeaux, crépidules...), les échinodermes (oursins, concombres de mer) et les tuniciers (violets) ;
- Groupe 2 : les bivalves fouisseurs, c’est-à-dire les mollusques bivalves filtreurs dont l’habitat est constitué par les sédiments (palourdes, coques...) ;
- Groupe 3 : les bivalves non fouisseurs, c’est-à-dire les autres mollusques bivalves filtreurs (huîtres, moules, coquilles Saint-Jacques...).

Les indicateurs recherchés dans les coquillages pour ces classements sont d’une part, des contaminants de l’environnement (plomb, cadmium, mercure, hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), dioxines et polychlorobiphényles (PCB)). Les zones de production présentant des dépassements des teneurs maximales des contaminants chimiques établies par le règlement (CE) n° 1881/2006 ne peuvent être classées.

D’autre part, la qualité microbiologique s’estime par un indicateur bactérien : *Escherichia coli* (en nombre d’*E. coli* pour 100 g de chair de coquillage et de liquide intervalvaire - CLI).

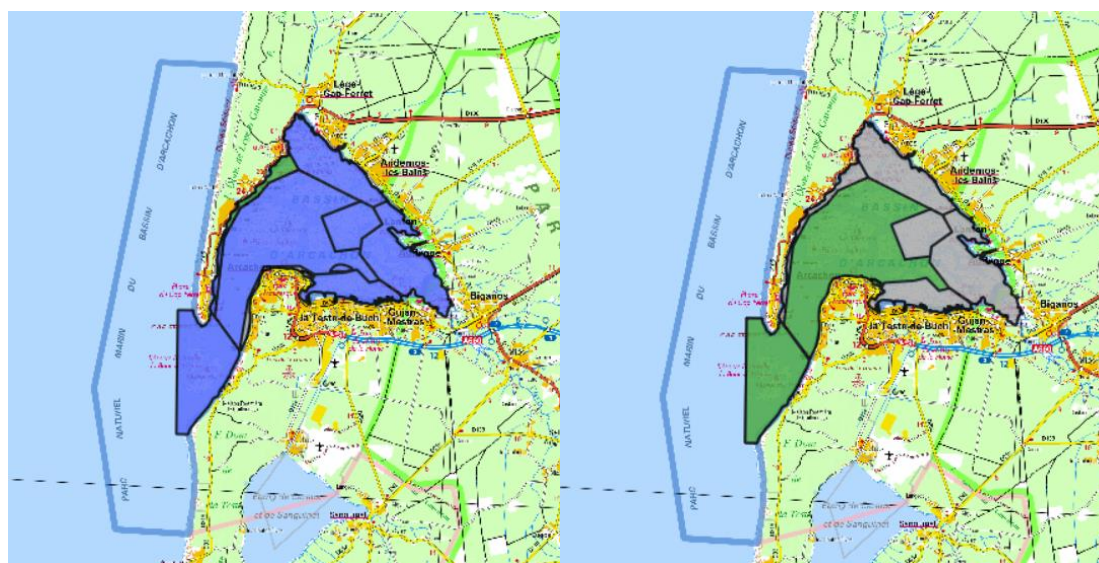
Suivant les résultats obtenus, les règles de classement prévoient trois classes de qualité microbiologique (Tableau 2).

**Tableau 2** : synthèse des règles de classement des zones de production conchylicoles

Classement	Mesures de gestion avant mise sur le marché	Critères de classement ( <i>E. coli</i> /100g de chair et liquide intervalvaire (CLI))			
		230	700	4 600	46 000
A	Consommation humaine directe	Au moins 80% des résultats	Tolérance de 20% des résultats		
B	Consommation humaine après purification	Au moins 90% des résultats			Tolérance de 10% des résultats
C	Consommation humaine après reparcage ou traitement thermique	100% des résultats			
Non classée	Interdiction de récolte	Si résultat supérieur à 46 000 <i>E. coli</i> /100 g de CLI ou si Seuils dépassés pour les contaminants chimiques ( cadmium, mercure, plomb, HAP, dioxines et PCB)			

La qualité des zones de production est réévaluée régulièrement par l’analyse des données issues de la surveillance des zones (Ifremer, Meteigner, 2021)

Sur le Bassin d’Arcachon (Figure 7), 10 zones de production sont classées. La majorité est classée A pour les huîtres (groupe 3) et la totalité est classée en B pour les palourdes (groupe 2) selon [l’arrêté du 22 juillet 2021](#).



**Figure 1** : zones conchylicoles classées : groupe 3 (huîtres) à gauche et Groupe 2 (Palourdes) à droite

**Zones A**       **Zones NC (zones non classées)**       **Zones B**

**La surveillance sanitaire des zones classées :**

Une surveillance régulière de la qualité chimique et microbiologique des coquillages issus des différentes zones classées est mise en œuvre à travers :

- le réseau ROCCH (Réseau d’Observation des Contaminants Chimiques) pilotée par l’Ifremer ;
- et le réseau REMI (Réseau de surveillance microbiologique des zones de production), relevant de la responsabilité des préfets de départements, et opéré par les laboratoires départementaux d’analyses (LDA), sous une assistance à maîtrise d’ouvrage de l’Ifremer.

Ainsi, sur la base du dénombrement d’*E. coli* dans les coquillages vivants, le REMI a pour objectifs :

- d’estimer la qualité microbiologique des zones de production conchylicole.
- de détecter et suivre les épisodes inhabituels de contamination.

La fréquence de base des analyses est mensuelle, mais elle peut être allégée à bimestrielle, sous conditions.

Il existe par ailleurs un dispositif d’alerte en cas de risques de contamination ou de dépassement des seuils :

Niveau d’alerte	Descriptif
0	Risque de contamination (rejet polluant, évènement climatique,...)
1	Contamination supérieure au seuil de mise en alerte détectée dans le cadre de la surveillance régulière : Zone A > 230 E. coli/100 g CLI Zone B > 4 600 E. coli/100 g CLI Zone C > 46 000 E. coli/100 g CLI
2	Contamination persistante supérieure au seuil de mise en alerte, suite aux alertes de niveau 0 ou 1
2	Forte contamination détectée (>46 000 E. coli/100 g CLI9) dans le cadre de la surveillance régulière

Le déclenchement du dispositif d’alerte de niveau 0 ou 1 se traduit par :

- l’émission par l’Ifremer d’un bulletin d’alerte (niveau 0 ou 1) vers une liste définie de destinataires ;
- la réalisation dans les 48 heures suivantes (hors jours non-travaillés) des prélèvements sur l’ensemble des points de suivi de la zone concernée (sous réserve de possibilité d’accès aux points).

Le déclenchement du dispositif d’alerte de niveau 2 se traduit par :

- l’émission par l’Ifremer d’un bulletin d’alerte vers une liste élargie de destinataires ;
- la programmation d’une surveillance à fréquence hebdomadaire de l’ensemble des points de suivi de la zone concernée (sous réserve de possibilité d’accès aux points), jusqu’à la levée de l’alerte qui intervient suite à deux séries consécutives de résultats inférieurs au seuil d’alerte.

**Sur le Bassin d’Arcachon, le dernier rapport de l’Ifremer fait état de deux alertes microbiologiques de niveau 0 et six alertes de niveau 1 en 2020 (Meteigner , 2021).**

### Le critère de qualité microbiologique *E. coli*

*E. coli* est ainsi retenu comme indicateur de contamination fécale pour le classement sanitaire des zones de production et de reparcage des coquillages. Il est également retenu comme critère de sécurité des denrées alimentaires (Règlement (CE) n°2073/2005) : ce critère est contrôlé lors de la mise en marché des coquillages par les centres d’expédition agréés.

Ce suivi bactériologique et système d’alerte, permettant la détection de contaminations fécales, contribue à la prévention des TIAC à NoV liées à la consommation de coquillages. **Il est cependant reconnu que des contaminations problématiques en NoV ne sont pas toujours associées à des niveaux en *E. coli* supérieurs aux seuils réglementaires (ANSES, 2016).** En effet, *E. coli* est connu 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, respectant la réglementation en vigueur, ayant conduit à des TIAC virales 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.

## 2. La gestion du risque NoV en discussion

Il n’existe pas de dispositif de surveillance basé sur un indicateur NoV à ce jour. L’étude européenne (EFSA, 2019) sur la prévalence en NoV dans les huîtres au niveau de zones de production et dans les établissements d’expédition d’huîtres creuses, initiée en 2016, avait pour objectif d’évaluer les possibilités et les conséquences du choix de différents seuils microbiologiques basés sur des résultats exprimés en génomes de NoV (ANSES 2016).

Suite aux 254 épidémies à NoV dans les huîtres ayant eu lieu en Europe lors de l’hiver 2019-2020 (dont 197 en France) et au nombre régulièrement important de notifications à NoV dans les coquillages émis par le RASFF ces dernières années, 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 suggérés. L’instauration d’un tel seuil en génome de NoV à partir duquel la présence de NoV infectieux serait probable n’a pas de justification scientifique puisqu’il a largement été démontré sur tous les virus cultivables que le rapport entre génomes de virus et virus infectieux est très variable dans le temps et dans l’espace et surtout après l’application de traitements. Les discussions ont repris fin 2021 concernant

l’instauration d’un critère à NoV dans les coquillages et les débats sont vifs au niveau de la communauté scientifique et des Etats membres.

En l’absence d’une réglementation harmonisée au niveau européen, la France a toutefois mis en place depuis 2013 une instruction technique actualisée chaque année concernant la gestion du risque à NoV en lien avec la consommation de coquillages. 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.

La dernière instruction technique DGAL spécifie les principes suivants :

« En cas de toxi-infection alimentaire collective (TIAC), une enquête alimentaire est réalisée : si la consommation de coquillages contaminés par des NoV est suspectée (en fonction des symptômes, de leur délai d’apparition et des repas partagés par les malades), une enquête de traçabilité est conduite afin de retrouver le centre d’expédition qui a mis sur le marché les coquillages consommés, ainsi que leur(s) zone(s) de production et date(s) de récolte.

Par la suite, des analyses officielles pour recherche de NoV sur les lots consommés et en milieu marin sont réalisées. Si des éléments concordants suggèrent la contamination d’une zone (tels que plusieurs TIAC en lien avec une même zone) ou si au moins deux échantillons donnent lieu à une détection de virus (dont un résultat défavorable au niveau de la zone de production), la fermeture de la zone concernée est décidée par arrêté préfectoral (interdiction de récolte), assortie d’opérations de retrait-rappel.

En l’absence de nouveau signal d’alerte (nouvelle TIAC, déversement d’eaux usées ou pluviométrie importante par exemple), la réouverture intervient 28 jours après la date de récolte dans le milieu des coquillages contaminants.

Les modalités locales d’alerte et les interactions entre les acteurs doivent être définies dans le cadre des instances locales de concertation sur le sujet de la qualité sanitaire des coquillages. »

## II. Méthodes d’analyses des norovirus

Si les bactéries sont cultivables in vitro de manière simple, ce n’est pas le cas pour tous les virus entériques et notamment les NoV. Pour ces derniers, il faut donc recourir à des méthodes de biologie moléculaire car ils ne se multiplient pas sur cultures cellulaires classiques.

On recourt donc à la technique de PCR (**polymerase chain reaction**). Cette méthode consiste à amplifier une séquence d’ADN grâce à une enzyme (Taq polymérase). Dans le cas NoV qui possèdent un génome à l’ARN, une étape de rétrotranscription (RT) est nécessaire (on parle donc de RT-PCR). Si la méthode est quantitative, on parle alors de RT-qPCR.

L’analyse par PCR doit être précédée par une étape d’extraction, de concentration et de purification du génome viral. Celle-ci peut se faire selon différents protocoles, le plus commun étant la lyse directe à l’aide du thiocyanate de guanidine et par adsorption sur bille de silice.

Il existe depuis relativement peu de temps, des méthodes normalisées pour la détection qualitative de génome viral.

Elles ont été réfléchies 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 (i.e. coquillages bivalves vivants, certains végétaux frais et surgelés, eaux embouteillées, surfaces alimentaires).

Ainsi, depuis 2013, des méthodes normalisées sont disponibles pour la recherche qualitative ou quantitative du génome des NoV (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 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 ou l’eau.

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 est très largement plus persistant que la particule infectieuse correspondante (Butot et al., 2009; Choi and Jiang, 2005;

Gassilloud et al., 2003; Hartard et al., 2018; Hewitt and Greening, 2004; Randazzo et al., 2018).

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  $\mu\text{L}$ ). Cela se traduit d’ailleurs souvent par l’impossibilité de détecter le génome des NoV ou du VHA dans des restes de repas pourtant incriminés dans des TIAC (EFSA, 2012; Le Guyader et al., 2006b; Le Mennec et al., 2017; Lowther et al., 2010). L’utilisation de cette norme ISO en routine pour la gestion du danger à NoV et VHA 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 aliments et l’eau.

**Cette méthode d’analyse présente plusieurs contraintes qu’il est important de prendre en compte dans l’interprétation des résultats :**

- Rendement d’extraction : Les rendements d’extraction sont généralement évalués par comparaison avec un virus témoin de processus (e.g. Mengovirus, NoV murin, enterovirus bovin). L’analyse est validée (selon la norme NF EN ISO 15216-2, 2019 ; NF EN ISO 15216-1, 2017), si le rendement d’extraction est supérieur ou égal à 1%.
- Inhibiteurs de PCR : Des substances inhibitrices de la réaction RT-PCR sont contenues dans de nombreux aliments et ils peuvent influencer le résultat d’analyse. Des inhibiteurs de PCR présents en trop grande quantité peuvent empêcher le bon déroulement de la réaction de RT-PCR et conduire à des faux négatifs. C’est la raison pour laquelle un ARN témoin est introduit dans chaque échantillon pour mesurer le niveau d’inhibition. Un résultat est considéré comme valide si l’inhibition de la réaction de PCR est inférieure à 75% pour l’échantillon non dilué ou dilué au dixième.
- Incertitude dans la mesure : il peut exister une incertitude dans la mesure, due aux inhibiteurs de PCR et aux pertes tout au long des processus d’extraction des virus et de purification de leur génome viral.

***Compte tenu des éléments précédents, les résultats doivent se lire en unité logarithmique.***

- Un autre point essentiel dans l’interprétation des résultats : l’impossibilité par RT-PCR de différencier les virus infectieux des virus non infectieux. La technique de RT-PCR amplifie l’ARN libre de virus dégradés comme l’ARN de virus non altéré présent dans l’échantillon (virus infectieux). Pour qu’un virus soit infectieux, il doit posséder une capsid et un génome parfaitement intègres.

A ce jour, aucune méthode fiable n’existe pour détecter directement les NoV infectieux dans les aliments et l’eau. Cependant, des progrès considérables ont été acquis pour les NoV ces cinq dernières années.

Des études récentes ont en effet montré qu’il était possible de cultiver ou de répliquer *in vitro* les NoV en utilisant i) des cellules B humaines (Jones et al., 2015), ii) des entéroïdes humains (Ettayebi et al., 2016, 2021), iii) des larves de poissons zèbres (Van Dycke et al., 2019) ou, iv) des cellules rénales animales de type Vero ou MDBK (Jeong et al., 2020; Todd and Tripp, 2020).

Néanmoins, ces approches demandent toutes des conditions opératoires très particulières qui restreignent leur utilisation à quelques laboratoires très spécialisés. De plus, elles ne permettent qu’une réplication virale limitée et pour seulement quelques génotypes de NoV.

Enfin, les méthodes de titrage des NoV infectieux par plage de lyse ou par « *Tissue Culture Infectious Dose 50* » (TCID<sub>50</sub>) sont encore loin d’être définies. Ceci étant, même si des méthodes de culture *in vitro* des NoV venaient à se démocratiser comme cela a été le cas pour les entérovirus dans les années 1990, elles resteraient inapplicables pour des analyses de routine car trop lourdes, trop coûteuses et trop longues pour l’obtention d’un résultat libérateur compatible avec les contraintes des producteurs et des industriels.

En résumé, il n’est pas possible d’envisager à court ou moyen terme d’utiliser ces méthodes pour rechercher les NoV infectieux dans les aliments et l’eau. En revanche, elles seront très utiles pour valider les outils de gestion ou pour étudier les mécanismes de pathogénicité, de survie ou d’infection de la cellule hôte.

Actuellement, des méthodes plus ou moins robustes sont proposées pour dissocier les particules virales infectieuses et non infectieuses dans les aliments et leur environnement. La plupart d’entre-elles sont basées sur la démonstration de l’intégrité du génome ou de la capsid virale. L’intégrité du génome, évaluée par la détection du génome complet, induit une perte de sensibilité de la RT-qPCR (Kostela et al., 2008). De plus, les dommages au niveau de la capsid ne sont pas pris en compte (Manuel et al., 2018; Rodríguez et al., 2009). L’intégrité de la capsid virale peut être déterminée i) par l’utilisation de pré-traitement enzymatique (i.e. RNase) ou d’agents intercalants (i.e. propidium monoazide (PMA), ethidium monoazide (EMA)) avant la détection du génome, ii) par la présence de dommages oxydatifs sur la capsid et, iii) par la liaison avec un ligand spécifique.

Il est plutôt admis que la RNase ou les agents intercalants peuvent pénétrer dans les capsides fortement endommagées ou détruites en empêchant l’amplification du génome par RT-qPCR. Cependant, le génome viral avec des capsides faiblement endommagées ou agrégées ne semblent pas ou alors faiblement accessibles à ces molécules (Escudero-Abarca et al., 2014; Nuanualsuwan and Cliver, 2002, 2003). L’accumulation des groupements carbonyles sur les protéines de capsid a été corrélée avec la perte du caractère infectieux de certains virus entériques (Sano et al., 2010, 2015). Cependant, ils ne seraient présents qu’après un traitement oxydant à forte dose. Enfin, certains ligands (i.e. HBGA, anticorps de capture, aptamères) sont utilisés en supposant que seuls les génomes des capsides intactes seront capturés et amplifiés (Manuel et al., 2018). Malheureusement, des capsides faiblement dénaturées ou endommagées peuvent encore reconnaître ces ligands



(Chassaing, 2021; Moore et al., 2017; Robin et al., 2019). En résumé, aucune de ces approches n’est suffisamment fiable pour dissocier parfaitement les virus infectieux des virus non infectieux.

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 VHA et, iii) être *a minima* aussi résistant que ces deux 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. Les FRNAPH sont classés en quatre génogroupes. 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 sont présents en abondance dans les eaux usées brutes à des niveaux compris entre  $10^3$  et  $10^5$  UFP/mL (Blanch et al., 2006; Cole et al., 2003; Gourmelon et al., 2007; Hartard et al., 2015; Havelaar et al., 1990). Ils sont ensuite retrouvés dans les rejets d’eaux usées et les masses d’eau continentales à des concentrations inférieures à  $10^2$  UFP/mL (Cole et al., 2003; Lucena et al., 2006; McMinn et al., 2017). 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). Une étude récente a aussi montré une corrélation entre la réduction des génomes de FRNAPH-II et celle des NoV au cours du traitement des eaux usées ( $r=0,69$ ), suggérant que les FRNAPH-II seraient un bon indicateur du comportement des NoV (Lee et al., 2019).

L’utilisation de ces FRNAPH comme indicateur du danger viral dans l’eau et les aliments présente donc un réel intérêt pour les aliments influencés par une pollution fécale d’origine urbaine comme les coquillages. 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 i) ils ont une structure similaire à celle des NoV, ii) les FRNAPH-II et -III sont plutôt spécifiques d’une pollution fécale d’origine humaine, iii) la persistance des FRNAPH dans les coquillages est plus importante que celle d’*E. coli* et, iv) les FRNAPH infectieux peuvent être rapidement quantifiés par des méthodes normées (ISO 10705-1, 2001).

Des études récentes ont montré l’intérêt des FRNAPH pour évaluer le danger à NoV dans les coquillages en Europe et au cours de la dépuración des huîtres (Hartard et al., 2016, 2018 ;Leduc et al., 2020 ; Lowther et al., 2019 ; Younger et al., 2020). Il a notamment 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. Une corrélation positive entre la présence de FRNAPH infectieux avec celle des NoV infectieux a été partiellement démontrée à partir de 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 entre FRNAPH infectieux et NoV infectieux (*données non publiées de l’UMT VIROcontrol*). 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.

### III. Empreinte des norovirus dans le système d’assainissement des eaux usées du Bassin d’Arcachon

#### 1. Présentation du système d’assainissement collectif des eaux usées du Bassin d’Arcachon

Le système d’assainissement des eaux usées des 10 communes riveraines du Bassin d’Arcachon (Figure 2) se compose de 5 stations d’épuration (3 urbaines et 2 industrielles) et d’un vaste réseau de collecte de type séparatif qui ceinture le plan d’eau avec pour exutoire final des eaux traitées, un rejet en milieu océanique à l’extérieur du Bassin d’Arcachon au niveau du Wharf de la Salie.

A noter que la Base Aérienne 120 (BA120) possède ses propres unités de traitement au nombre de 4 historiquement mais, en raison de leur vétusté, la base aérienne les supplée par des unités mobiles de traitement installées et déplacées selon l’état d’avancement des travaux à l’intérieur du site. Dans tous les cas, les eaux traitées sont refoulées vers le collecteur qui amène l’ensemble vers le Wharf de la Salie, sachant que la station communale de Cazaux se prépare pour accepter les effluents de la BA120 *via* une extension en cours de réalisation qui portera sa capacité actuelle de 5 000 équivalent-habitants (EH) à 7 400 EH.

Enfin, l’industriel SMURFIT KAPPA-Cellulose du pin gère l’unité de traitement dite industrielle et le SIBA assure la maîtrise d’ouvrage des 3 systèmes dits urbains, y compris le transport des eaux traitées de l’ensemble vers l’ouvrage terminal : le Wharf de la Salie.

Voici les principales caractéristiques des stations d’épuration syndicales :

Localisation	Capacité (EH)	Type de traitement				Date de mise en service
		Prétraitement	primaire	biologique	bactéricide	
La Teste de Buch	150 000	Dégrillage, dessablage, dégraissage	Décantation lamellaire	Biofiltres (cultures fixées, traitement biologique du carbone)	UV 4 mois de l’année jusqu’en Juin 21 puis 11 mois ensuite	2007
Biganos	135 000					
Cazaux	5 000		-	Boues activées faible charge	UV Non fonctionnel jusqu’en 2021	

Comme rappelé dans l’avant-propos, en 2012, le SIBA se met en quête de quantifier la présence de NoV dans les stations d’épuration et d’apprécier l’efficacité des traitements épuratoires.



Figure 2 : Système d'assainissement des eaux usées des 10 communes riveraines du Bassin d'Arcachon

## 2. Les campagnes d’analyses réalisées

On dénombre plus de 300 campagnes d’analyses réalisées depuis 2012 sachant qu’une campagne se définit comme étant 1 point/date/laboratoire.

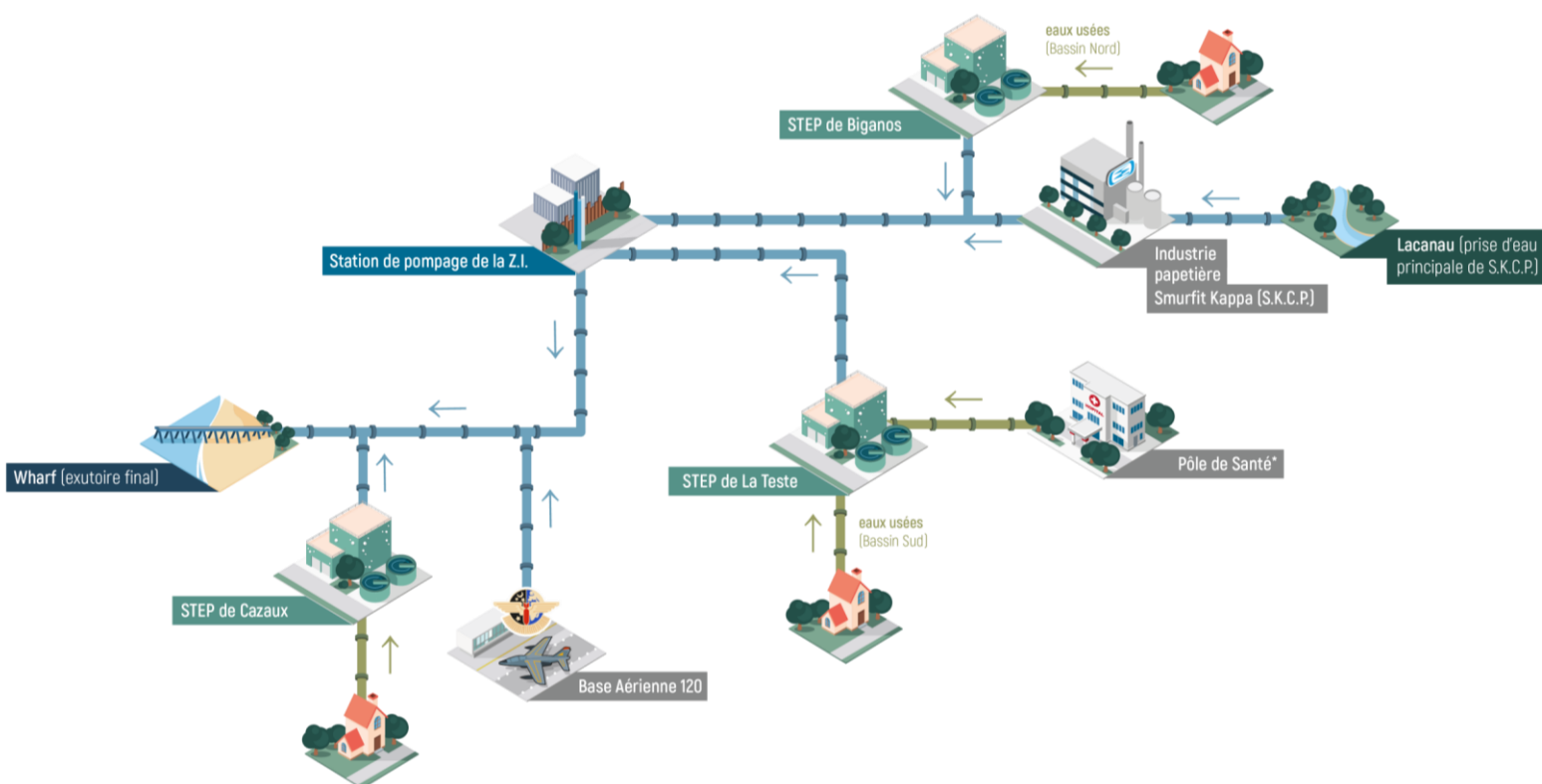
Les investigations portent sur 16 points avec des prélèvements ponctuels de 2012 à 2015 et des prélèvements 24 heures à partir de 2016 (sauf mention contraire), choisis afin de répondre aux questions soulevées durant ces 9 années d’études.

Les analyses peuvent porter :

- sur les NoV des groupes I et II :
  - en RTqPCR (kit CERAM Tools mis en œuvre par le LASAT jusqu’en janvier 2014 puis par EUROFINS)
  - en EMA (agent intercalant) couplée à la RT-qPCR
- sur les FRNAPH infectieux afin d’apprécier de manière indirecte le caractère infectieux des NoV. De plus, les FRNAPH s’utilisent fréquemment pour évaluer les performances des STEP vis-à-vis de l’élimination des virus entériques.

Le Tableau 3 traduit l’effort d’échantillonnage par site, on distingue les 1ères années où la recherche se porte uniquement sur les NoV (en gris dans le tableau). Puis à partir de 2015, les FRNAPH viennent compléter presque systématiquement l’analyse (en vert dans le tableau). Enfin en 2019, une analyse EMA-RT-qPCR (en abricot dans le tableau) devait permettre de préciser l’infectiosité des NoV accompagnée d’un séquençage des virus (laboratoire ABIOLAB).

La figure ci-dessous repositionne les différents sites de prélèvement dans le schéma d’assainissement





### 3. Présentation des résultats

Les interrogations initiales portaient sur l’empreinte en NoV dans les stations d’épuration et sur l’efficacité de ces dernières, vis-à-vis de leur abattement.

Dans la suite de ce chapitre, on notera « n= » le nombre de prélèvements concerné par le résultat.

Seuls quelques graphes illustrent ce chapitre dont les conclusions reposent sur l’expertise de l’ensemble des données accessibles dans ENKI.

La Figure 3 traduit la présence de NoV (groupes I et II cumulés) en entrée et en sortie de la STEP de Biganos sur une soixantaine de prélèvements (n=59) ainsi que l’abattement, le tout exprimé en unité  $\log_{10}$  :

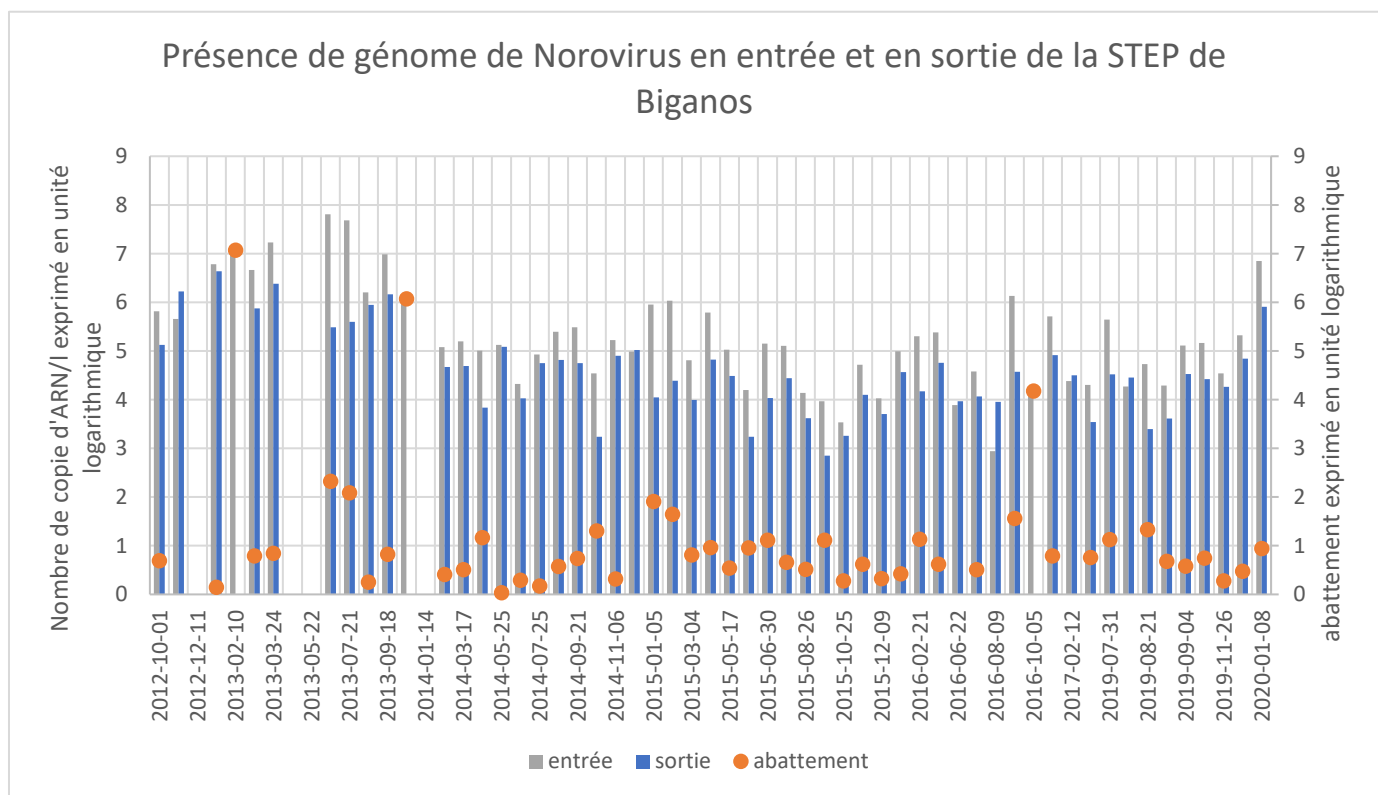


Figure 3

La Figure 4 représente les résultats obtenus sur les FRNAPH infectieux totaux en entrée et en sortie de la STEP de Biganos sur la même période que précédemment. Les résultats sont exprimés en unité logarithmique.

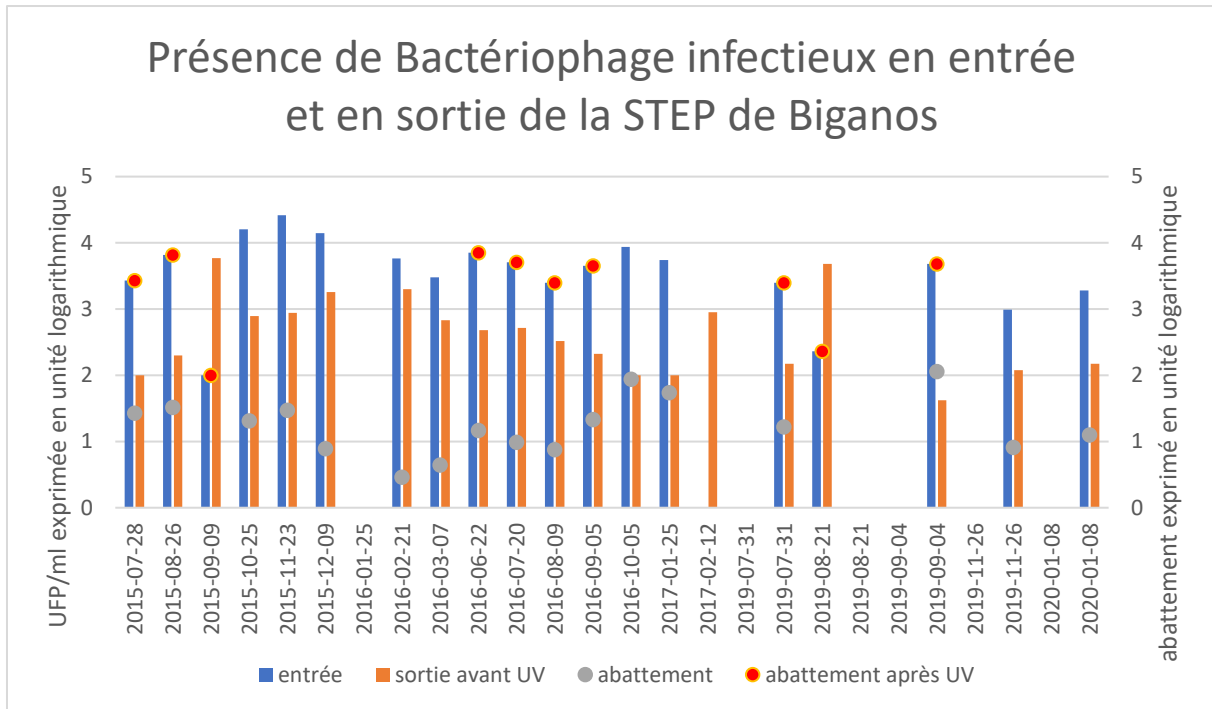


Figure 4

Plusieurs conclusions s’imposent à nous :

(1) Empreinte et efficacité sur la station de Biganos

- Le génome des NoV quantifiés au niveau de la station d’épuration de Biganos montre, en moyenne :
    - En entrée :  $10^5$  copies de génome/l (5 unités log),
    - En sortie :  $10^4$  copies de génome/l (4 unités log),
    - Soit un abattement moyen d’une unité logarithmique,
    - Après un traitement UV, l’abattement moyen est d’un demi log supplémentaire (16 campagnes de mesures).
  - Au vu des concentrations mesurées en sortie de STEP, élevées en comparaison avec d’autres paramètres, l’analyse du génome des NoV représente un excellent indicateur de présence d’eaux usées brutes ET traitées.
  - On n’observe pas de saisonnalité sur la période étudiée
  - L’analyse concomitante des FRNAPH infectieux permet de confirmer les résultats des NoV avant traitement UV (n=19 campagnes) puisqu’aucun traitement de désinfection n’a été mis en œuvre. En revanche, l’abattement des FRNAPH infectieux après traitement UV est total (n=10 campagnes) et pourrait suggérer que l’abattement des NoV infectieux après UV serait similaire.
- Les FRNAPH infectieux quantifiés au niveau de la station d’épuration de Biganos montre, en moyenne :



- en entrée :  $10^3$  UFP/ml (3,5 unités log),
- En sortie :  $10^{2,6}$  UFP/ml (2,6 unités log),
- Soit un abattement moyen de 1 unité logarithmique,
- Après un traitement UV, l’abattement est total.

(2) Sur les autres STEP et sur le rejet :

On obtient des résultats totalement similaires sur la station d’épuration de La Teste (n=11).

On note que sur la sortie de la station de Cazaux (n=7), l’abattement constaté sur les FRNAPH est de 2 log (au lieu de 1 log sur les 2 autres STEP). Ce constat doit être mis en relation avec le type de traitement de la station d’épuration qui implique des temps de séjour plus long et donc un niveau d’épuration supérieur (constat réalisé aussi sur les micropolluants).

Dans le cadre de l’appel à projet national sur les micropolluants, le projet REMPLAR du SIBA déploya un bioréacteur à membrane installé sur les rejets d’eaux usées du Pôle de Santé qui représentait une action à part entière des 4 années d’études. Six campagnes de mars à août 2016, réalisées ponctuellement en entrée et en sortie du traitement, permettent de confirmer les niveaux retrouvés en entrée en génome de NoV (concentration moyenne de  $10^3$  copies de génomes/l) et en FRNAPH infectieux (concentration moyenne de  $10^4$  UFP/ml) avec un abattement total en sortie sur les 2 paramètres, Tableau 4.

**Tableau 4** : résultats des campagnes d’analyses réalisées en entrée et sortie du bioréacteur à membrane déployé dans le cadre de l’APP REMPLAR (0 signifie <LDD)

NoV GI et II en cARN/L	08/03/2016		06/04/2016		19/05/2016		24/06/2016		20/07/2016		10/08/2016	
	NoV	BPHAGE	NoV	BPHAGE	NoV	BPHAGE	NoV	BPHAGE	NoV	BPHAGE	NoV	BPHAGE
Bioréacteur entrée	3,E+04	1,E+05	9,E+03	>10000	2,E+03	>30000	1,E+02	>100000	2,E+03	>30000	2,E+02	2,E+04
Bioréacteur sortie	0	0	0	0	0	0	0	<10	0	0	0	0

Sur la base des abattements réalisés sur les FRNAPH infectieux (n=15), l’étude de la sortie du traitement primaire sur les stations d’épuration de La Teste (n=8) et Biganos (n=27) indique une contribution identique des 2 étapes de traitement. Sur les NoV, vu les caractéristiques de l’analyse, la contribution du traitement primaire apparaît plus significative en lien certainement avec l’abattement sur les matières en suspension réalisé à cette étape.

Les 4 campagnes sur les boues de la STEP de Biganos pointent une présence de NoV à hauteur de 6 à 8 log pour 3 campagnes et 1 résultat inférieur à  $5.10^3$  copies de génome/l.

A l’issu de l’ensemble des systèmes de traitement, les résultats des analyses juste avant le rejet au Wharf de la Salie correspondent bien à la moyenne des résultats précédemment évoqués avec une empreinte en génome de NoV de l’ordre de  $10^4$  copies/l (n=57) et une infectivité virale déterminée sur la base des FRNAPH de 1,4 unités log d’UFP/ml (n=46). On note une légère saisonnalité avec  $\frac{1}{2}$  log de plus sur les mois de décembre/janvier et février.

(3) Lien avec le réseau SENTINELLE

L’analyse des données d’incidence de gastroentérites aiguës observées en région Aquitaine de 2012 à 2021 issu du système national de surveillance ne se corrèle pas avec l’empreinte en NoV en entrée de la station d’épuration de Biganos (Figure 5).

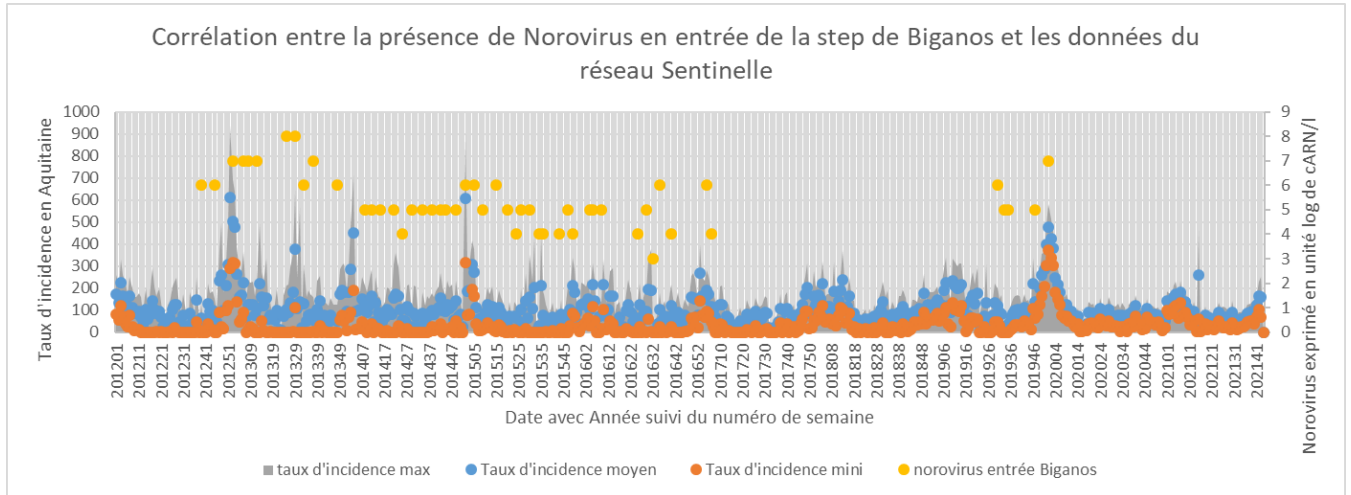


Figure 5

(4) Autres résultats

Comparaison inter laboratoires

D’octobre 2012 à janvier 2014, le LASAT réalisa les analyses de NoV puis EUROFINs avec le même protocole. Les moyennes retrouvées en entrée et sortie de la station d’épuration de Biganos sont similaires sur la somme des 2 génogroupes de NoV analysés respectivement sur les périodes concernées.

L’expérience d’un autre laboratoire (ABIOLAB) fut sollicitée pour discriminer plus finement l’infectivité des NoV (technique EMA-RT-qPCR) et réaliser un séquençage des NoV.

Pour un même échantillon, on ne constate qu’une très légère différence entre l’analyse EMA-PCR et RT-qPCR par ABIOLAB (de l’ordre de 0,11 unité log pour n=35), ce qui signifierait que le virus est quasi totalement sous une forme infectieuse, résultats incompatibles avec ceux acquis via les phages. Sur ce sujet, Actalia estime « qu’il faut ici se restreindre à comparer EMA-PCR et qPCR classique pour les NoV.

La méthode EMA PCR ne peut pas être comparée aux méthodes pour quantifier les virus infectieux. Les corrélations ne sont pas toujours établies pour un seul et même virus (c’est fonction du traitement de désinfection). C’est donc encore plus compliqué et dangereux à comparer pour deux virus (FRNAPH et NoV) :

1. Les agents intercalants peuvent pénétrer dans les capsides fortement endommagées ou détruites en empêchant l’amplification du génome par RT-qPCR.

Cependant, le génome viral avec des capsides faiblement endommagées ou agrégées ne semblent pas ou alors faiblement accessibles à ces molécules.

2. Les phages infectieux quantifiés par culture sont tous infectieux car ils se sont répliqués.

En résumé, la méthode EMA peut sous-estimer (traitement UV, chlore) la quantité réelle de virus infectieux. Les deux méthodes se corrélient bien quand on applique des traitements très lourds (chaleur à 90°C par exemple car on casse toute les capsides). »

Par ailleurs, la comparaison pour un même échantillon entre les 2 laboratoires pointe une différence moyenne de l’ordre d’un log à la faveur d’EUROFINS avec une variabilité importante allant de -1 à +3 unités logarithmiques (moyenne à 0,82 pour n=30).

### Norovirus des Groupes I et II

La discrimination entre les 2 génogroupes de NoV montre une légère abondance du génogroupe I par rapport au génogroupe II en entrée et en sortie des STEP (n=59), Figure 6.

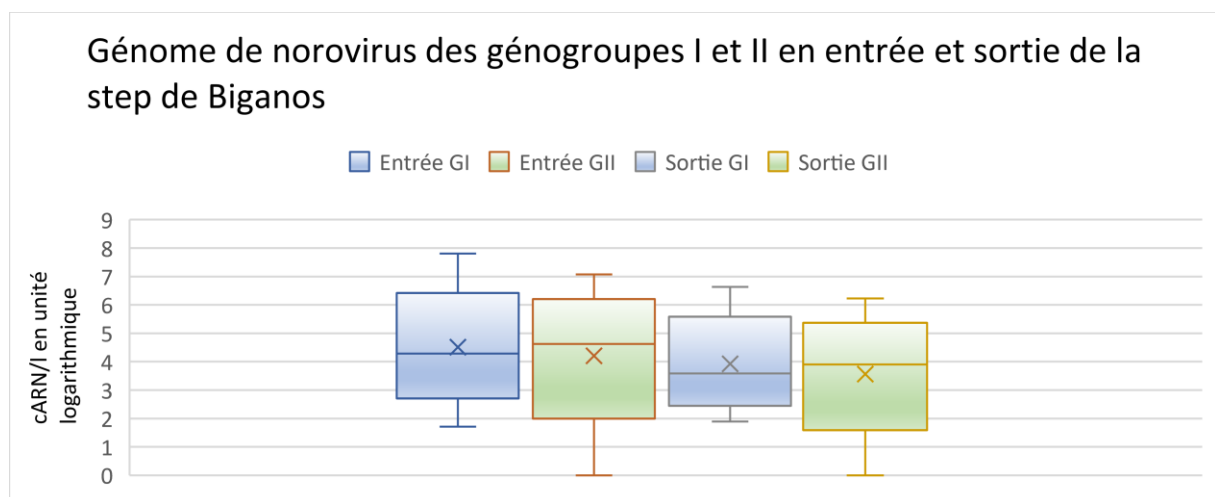


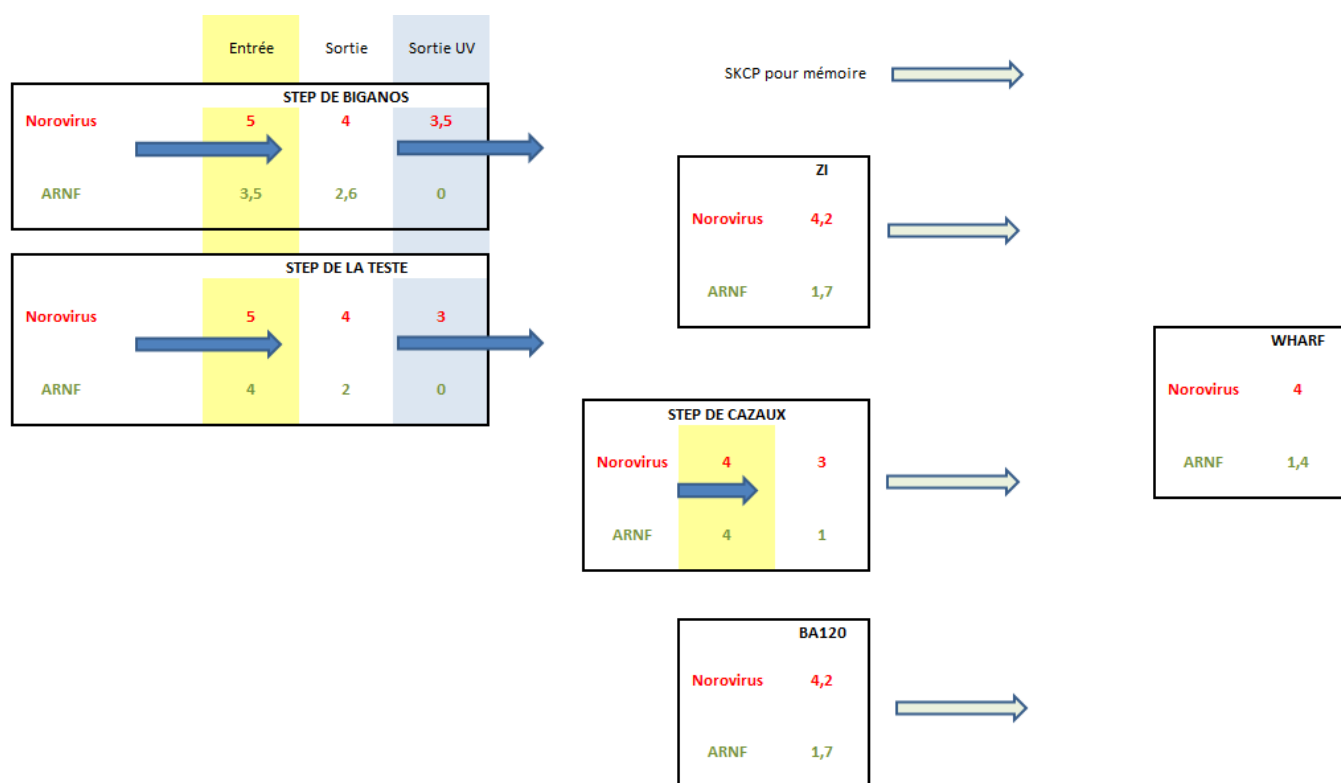
Figure 6

(5) En synthèse

Le schéma ci-dessous représente la synthèse des résultats acquis sur les systèmes d’assainissement.

On retient 3 fondamentaux :

- L’abattement d’environ une unité logarithmique sur les stations d’épuration vis-à-vis du génome des NoV,
- La totale efficacité des UV vis-à-vis de l’élimination des FRNAPH infectieux et donc potentiellement des NoV infectieux,
- L’analyse des NoV constitue un excellent indicateur de la présence d’eau usée même traitée.



## IV. Empreinte des norovirus dans l’environnement du Bassin d’Arcachon et ses tributaires

### 1. Des investigations pour comprendre

Alors que des investigations nationales étaient menées en 2012 suite à la fermeture récurrente de plusieurs zones de production du littoral français pour cause de TIAC à NoV dans les coquillages, le Bassin d’Arcachon n’avait pas été retenu comme une zone prioritaire d’étude *in situ*, considéré comme peu vulnérable à cette problématique.

Le SIBA retenait néanmoins que les productions conchylicoles du Bassin d’Arcachon pouvaient être menacées de fermeture par une présence de NoV infectieux dans les eaux et donc *in fine* dans les coquillages, après la déclaration d’une TIAC, sans que cette vulnérabilité ne soit renseignée localement.

Le SIBA a donc souhaité réaliser dès 2012 une série d’analyse en vue d’acquérir cette connaissance et d’établir une cartographie temporelle et spatiale de l’empreinte en NoV dans son environnement, le cas échéant, pour en comprendre l’origine.

En concertation avec les acteurs locaux impliqués, ces investigations ont été menées dans un cadre de recherche, relevant de la compétence du SIBA quant à la connaissance de la qualité des eaux. A contrario, ces résultats n’ont jamais eu

vocation de surveillance sanitaire des productions avant mises en marché, compétence relevant de l’Etat (cf. paragraphe 2.2).

## 2. Le Bassin d’Arcachon présente-il une empreinte en norovirus ?

### 2.1. *Intérêt d’un suivi dans les coquillages en plus d’un suivi dans l’eau, apports de la biosurveillance*

Dans les eaux de surface, la détection du génome des NoV est rendue complexe en raison de la dilution et/ou des mécanismes de sédimentation. A l’inverse, les coquillages, comme tous les organismes vivants peuvent accumuler les micropolluants ou les microorganismes comme les virus : on dit des organismes vivants (ou biote) qu’ils sont des matrices « intégratrices ». Par rapport aux prélèvements sur la matrice « eau » et notamment par rapport à des prélèvements ponctuels, les matrices intégratrices comme les organismes vivants offrent deux avantages (Besse 2011) :

- faciliter l’analyse car ils concentrent les micropolluants (ou les virus dans le cas qui nous intéresse) et rendent donc l’analyse plus sensible ;
- permettre l’intégration des résultats dans le temps : le biote peut en effet intégrer la contamination chronique d’une masse d’eau sur plusieurs semaines voire plusieurs mois.

On parle de biosurveillance lorsque l’on utilise les organismes biologiques pour détecter et mesurer une contamination chimique ou microbiologique, afin de renseigner sur l’état d’une masse d’eau. Les stratégies de biosurveillance existantes sont de deux types :

- les premières et les plus répandues utilisent des prélèvements de populations indigènes, on parle de biosurveillance passive. Cette approche est souvent utilisée pour suivre des tendances temporelles, par exemple l’observation sur le long terme d’une évolution des concentrations en contaminants chimiques ou biologiques (Tilghman et al. 2009) ;
- les secondes ont recours aux transplants (caging ou encagement) d’individus provenant d’un site de référence ou d’un élevage ; on parle alors de biosurveillance active. Cette méthode est généralement utilisée pour suivre des tendances spatiales : par exemple connaître le niveau de contamination existant ainsi que la répartition des contaminants dans une ou plusieurs régions (Tilghman et al. 2009).

## 2.2. Résultats de la biosurveillance réalisée dans le Bassin d’Arcachon sur les huîtres sauvages

### (1) Sites et méthodes

Introduite au début des années 1970 dans le Bassin, l’huître creuse (*Crassostrea Gigas*) est aujourd’hui l’espèce de coquillages la plus commune sur l’ensemble du Bassin. Elle constitue ainsi un organisme de choix pour réaliser des biosurveillances passives (prélèvement d’individus sauvages dans le milieu).

Quatre points de prélèvement ont été sélectionnés : Bélisaire, Les Jacquets, Bordes et Branne (FIGURE 7). Ces sites, sélectionnés sur la base des points REMI de l’Ifremer, permettent un suivi réparti de façon homogène sur l’ensemble du plan d’eau.

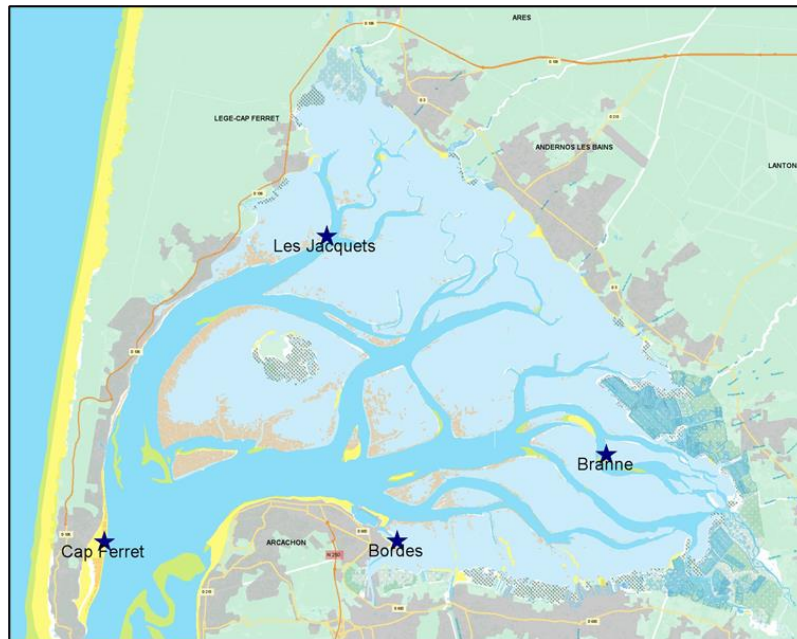


FIGURE 7 : POINTS DE BIOSURVEILLANCE DES NOV

Quinze huîtres sauvages minimum sont ramassées au sol à marée basse pour chaque analyse microbiologique (à l’exception du point « Jetée Bélisaire » où les huîtres sont décrochées de la jetée). L’opérateur porte des gants en néoprène pour éviter de se blesser ; il utilise éventuellement des outils pour dégager les huîtres de leur support ou pour les séparer entre elles (marteau et couteau à détroquer) (FIGURE 8).

Les huîtres sont récupérées dans un seau puis rincées à l’eau de mer pour enlever l’excédent de sable ou de vase. Elles sont ensuite transférées par lot dans une glacière réfrigérée à l’aide de plaques eutectiques jusqu’à réception le lendemain par le laboratoire d’analyse.

Les analyses portent sur la détection et la quantification du génome de NoV des génogroupes I et II par RT-qPCR en utilisant des méthodes adaptées de la norme ISO 15216.

D’octobre 2012 à janvier 2014, elles ont été confiées au laboratoire de La Rochelle, le LASAT. Et depuis février 2014, elles sont confiées au laboratoire Eurofins.

Comme recommandé dans l’ISO 15216, l’extraction des NoV est réalisée à partir 2g de glandes digestives d’huîtres. Un virus témoin de processus est inclus au début de l’analyse afin de contrôler les pertes au cours de l’analyse et ainsi déterminer un rendement d’extraction. Les acides nucléiques extraits sont détectés avec les kits Ceeram Tools TM. Des témoins d’amplification (positifs et négatifs) sont inclus pour chaque série d’analyses par RT-qPCR pour chacun des deux génogroupes de NoV recherchés.



**FIGURE 8 : PRELEVEMENT D’HUITRES SUR LE SITE DE BRANNE**

(2) Résultats

Les 388 résultats de la biosurveillance sur quatre points, de 2012 à juillet 2021 présentés Figure 9 permettent une visualisation temporelle mensuelle de l’empreinte en génome de NoV GI et GII dans les huîtres .

SIBA – Norovirus – Les acquis sur le Bassin d'Arcachon – Janvier 2022

	Norovirus GI en cARN/g				Norovirus GII en cARN/g				Norovirus GI + GII en cARN/g			
	JACQUETS	BRANNE	BORDES	BELISAIRE	JACQUETS	BRANNE	BORDES	BELISAIRE	JACQUETS	BRANNE	BORDES	BELISAIRE
oct.-12	0	<2500.0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	<2500.0	0
nov.-12	0	<2500.0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	<2500.0	0
déc.-12	0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0	0
janv.-13	<2500.0	<2500.0	0	<2500.0	0	0	0	0	<2500.0	<2500.0	0	<2500.0
févr.-13	0	21592	<2500.0	<2500.0	0	0	<2500.0	0	0	21592	<2500.0	<2500.0
févr.-13	<2500.0	<2500.0	<2500.0	<2500.0	0	0	0	0	<2500.0	<2500.0	<2500.0	<2500.0
mars-13	0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0	0
avr.-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mai-13	0	0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0
juin-13	0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0	0
juil.-13	0	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0	0
août-13	<2500.0	0	0	0	0	0	0	0	<2500.0	0	0	0
sept.-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
déc.-13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
janv.-14	<2500.0	<2500.0	0	<2500.0	0	<2500.0	0	<2500.0	<2500.0	<2500.0	0	<2500.0
févr.-14	42	234	23	0	8	124	146	48	50	357	169	48
mars-14	0	20	9	0	8	0	12	0	8	20	21	0
avr.-14	0	0	0	0	0	89	82	10	0	89	82	10
mai-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juin-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juil.-14	0	0	0	0	0	94	0	0	0	94	0	0
août-14	0	0	7	0	0	0	0	0	0	0	7	0
sept.-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
oct.-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nov.-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
déc.-14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
janv.-15	0	0	0	0	0	23	0	29	0	23	0	29
févr.-15	0	385	30	0	0	341	0	0	0	726	30	0
mars-15	51	28	0	0	0	55	0	0	51	83	0	0
avr.-15	0	0	0	0	0	0	28	0	0	0	28	0
mai-15	0	0	0	0	0	0	11	0	0	0	11	0
juin-15	0	0	0	0	0	4	0	0	0	4	0	0
juil.-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
août-15	0	0	0	28	0	0	0	0	0	0	0	28
sept.-15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
oct.-15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nov.-15	0	0	0	0	0	4	11	0	0	4	11	0
déc.-15	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	5	0
janv.-16	0	0	0	0	0	4	10	12	0	4	10	12
févr.-16	0	0	0	0	8	13	16	15	8	13	16	15
mars-16	0	0	0	0	251	269	219	27	251	269	219	27
avr.-16	0	0	0	0	0	19	94	33	0	19	94	33
juin-16	0	0	0	0	0	4	0	3	0	4	0	3
juil.-16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
août-16	4	0	3	0	0	0	0	0	4	0	3	0
nov.-16	45	0	0	0	0	6	0	0	45	6	0	0
déc.-16	0	295	160	0	0	0	0	28	0	295	160	28
janv.-17	0	0	0	0	0	129	0	0	0	129	0	0
févr.-17	0	0	0	0	0	64	0	0	0	64	0	0
avr.-17	0	0	0	0	0	0	97	0	0	0	97	0
mai-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juin-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juil.-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
août-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sept.-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
oct.-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nov.-17	0	0	359	0	0	0	0	0	0	0	359	0
déc.-17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
janv.-18	471	386	1748	0	0	589	0	0	471	975	1748	0
févr.-18	2604	2127	3312	2576	0	222	0	0	2604	2348	3312	2576
mars-18	0	0	0	120	0	0	14	0	0	0	14	120
avr.-18	0	0	169	92	0	0	0	0	0	0	169	92
mai-18	0	0	784	0	0	0	0	0	0	0	784	0
juil.-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
août-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sept.-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
oct.-18	0	133	0	0	0	433	0	0	0	565	0	0
déc.-18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
janv.-19	0	0	0	0	0	0	215	1052	0	0	215	1052
févr.-19	0	0	0	0	0	358	0	0	0	358	0	0
mars-19	0	0	0	0	0	775	173	0	0	775	173	0
avr.-19	0	0	0	0	0	80	0	0	0	80	0	0
mai-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juin-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juil.-19	0	0	144	0	0	0	206	0	0	0	350	0
août-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
sept.-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nov.-19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
déc.-19	84	356	54	0	77	285	333	104	161	641	387	104
janv.-20	339	359	1109	2572	123	552	744	1435	461	911	1853	4007
févr.-20	0	602	549	319	282	2450	1114	986	282	3052	1663	1305
mars-20	182	655	476	149	0	1390	771	0	182	2045	1247	149
avr.-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
mai-20	0	22	0	0	0	46	0	0	0	68	0	0
juin-20	0	0	0	0	0	0	116	0	0	0	116	0
juil.-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
août-20	0	0	0	0	0	0	147	0	0	0	147	0
sept.-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
oct.-20	0	0	0	0	0	292	0	0	0	292	0	0
nov.-20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
déc.-20	0	0	0	0	379	0	0	0	379	0	0	0
janv.-21	0	273	0	234	0	173	0	0	0	446	0	234
févr.-21	192	1679	332	306	570	4876	715	209	762	6555	1047	515
mars-21	0	989	0	0	126	334	0	0	126	1323	0	0
avr.-21	0	0	0	0	0	20	0	0	0	20	0	0
mai-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juin-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
juil.-21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

non détecté
non détecté ou <à 2500cARN/g (seuil de quantification pour les analyses réalisées par le LASAT)
quantifié < 500cARN/g
de 500 cARN/g à 10 <sup>3</sup>
10 <sup>3</sup> à 10 <sup>4</sup> cARN/g
>10 <sup>4</sup> cARN/g

FIGURE 9 : SYNTHESE DES RESULTATS DE LA BIOSURVEILLANCE DANS LES HUITRES EN COPIE D'ARN/G DE NOV GROUPE I ET GROUPE II



La présence de génome de NoV dans les huîtres est plus marquée en période hivernale et épidémique, et sur les dernières années :

Entre 2012 et 2013, tous les résultats reçus du LASAT sont négatifs ou non quantifiable à l'exception d'un pic de NoV GI détecté en février 2013 au point Branne (2.10<sup>4</sup> cARN/g). Il est à noter cependant que la limite de quantification à cette période s'élève à 2 500 cARN/g. Elle s'abaisse à 50 copies par prise d'essai sur la période suivante.

De ce fait, sur la période d'analyses confiée à EUROFINs (2014-2021), tous les sites présentent des résultats quantifiés à plusieurs reprises avec une saisonnalité de détection des deux groupes en période hivernale.

Cette observation est cohérente avec l'étude de prévalence Européenne des NoV, portée par l'autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA, 2019), qui indique une présence plus marquée des NoV (en génome) dans les coquillages entre les mois de novembre et d'avril, période épidémique de la gastroentérite aigue.

Une augmentation plus marquée des niveaux en génome de NoV s'observe sur les années 2018 (en GI), 2020 et 2021. A noter que ce sont des années caractérisées par une importante pluviométrie.

Une empreinte « génome de NoV » plus marquée sur certains secteurs géographiques du Bassin d'Arcachon :

La Figure 10 relate les fréquences de détection du génome de NoV GI et GII par site, ainsi que les valeurs médianes et maximum. Le « n » représente le nombre d'analyse.

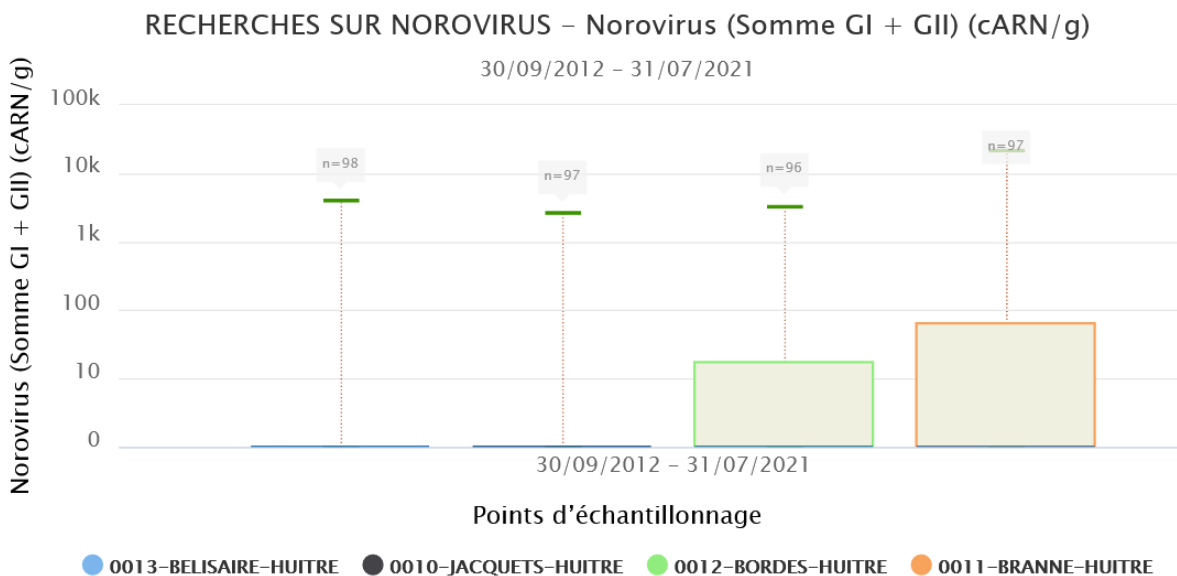
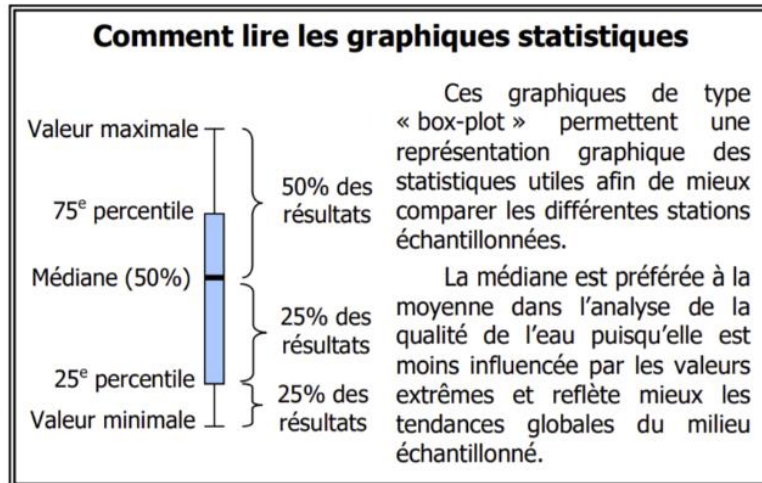


Figure 10 : Représentation statistique des n résultats par site de prélèvement en échelle logarithmique



**Encadré 1 : Comment lire les graphiques en boîtes.**

Les points de Bordes et de Branne (sud bassin et embouchure de la Leyre) présentent les détections les plus fréquentes avec les niveaux les plus forts détectés au point Branne (>4 log en fév 2013). Les sites Jacquets et Bélisaire présentent la plus faible fréquence de détection.

Une empreinte rarement supérieure à  $10^3$  copies de génome / g glandes digestives d'huîtres :

POINT	Fréquence NoV GI+GII > 500 copies/g	Fréquence NoV GI+GII > $10^3$ copies/g	Périodes > $10^3$ log
BELISAIRE	5 / 98 résultats	4 / 98 résultats	Fév. 2018, janv 2019, janv-fév 2020
JACQUETS	2 / 97 résultats	1 / 97 résultats	Fév. 2018
BORDES	7 / 96 résultats	6 / 96 résultats	Janv-fev 2018 / janv-fév. Mars 2020 / fév 2021
BRANNE	12 / 97 résultats	6 / 97 résultats	Fév. 2013/fév. 2018/fév. mars 2020/fév. Mars 2021

### Une empreinte plus marquée en intra-bassin

Les huîtres sauvages du Banc d'Arcachon n'ont pas été prélevées mensuellement en raison d'une impossibilité de campagne synchrones en plus des 4 points intra-bassin. Le Banc d'Arguin a cependant fait l'objet d'échantillonnages ponctuels en 2020 et notamment en mars 2020 (Figure 11). On peut observer une concentration en génome de NoV supérieure sur les points Branne et Bordes comparativement au banc d'Arguin.

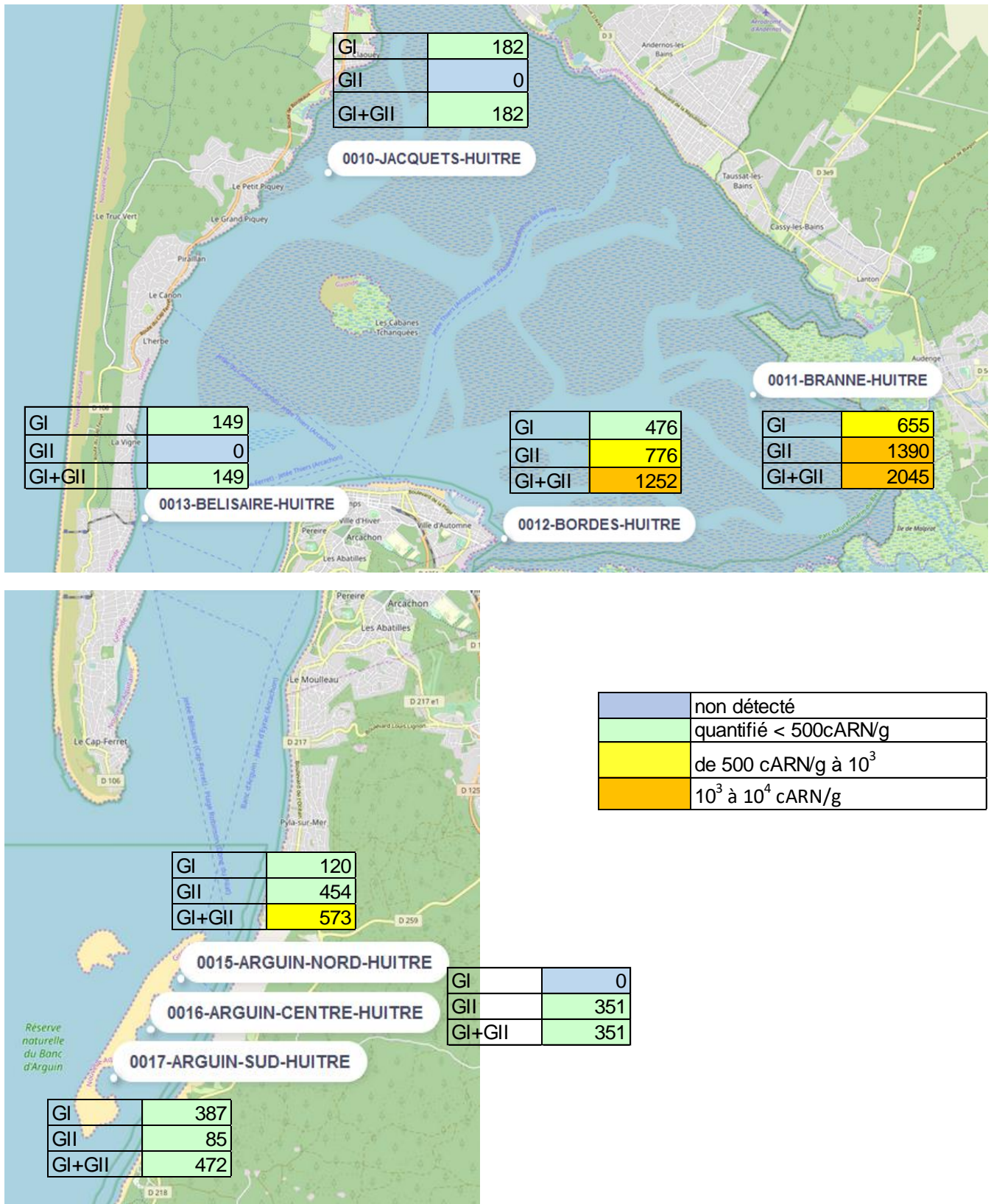


Figure 11 : représentation des résultats d'analyses des NoV dans les huîtres sauvages en différents points du Bassin - prélèvements réalisés le 10/03/20 en intra-bassin et le 11/03/20 à Arguin

2.3. Campagnes de suivi spécifique sur 3 matrices : huître, eau et sédiment

(1) Sites et méthodes

Des prélèvements conjoints d’huîtres, d’eau et de sédiment ont été réalisés lors de 3 campagnes spécifiques : décembre 2018, janvier et février 2019, en parallèle des suivis présentés précédemment. L’objectif consistait à voir si l’empreinte en génome de NoV s’observait également dans l’eau et les sédiments lors des périodes hivernales.

Pour chaque campagne, 15 huîtres, 250 g de sédiments ainsi que 20 litres d’eau ont été prélevés. Quinze huîtres ont été ramassées selon le protocole décrit précédemment. Le sédiment a été prélevé en surface, à proximité des huîtres, avec une cuiller en inox, et stocké dans des barquettes aluminium neuves. Enfin, l’eau (20 litres) a été prélevée dans des bidons neufs en polyéthylène. Les bidons ont été préalablement rincés 3 fois avec l’eau à prélever puis remplis en une seule fois.

Les analyses ont été conduites par le laboratoire Abiolab Asposan (Grenoble) par RT-qPCR, EMA-RT-qPCR. Un séquençage des NoV a également été effectué.

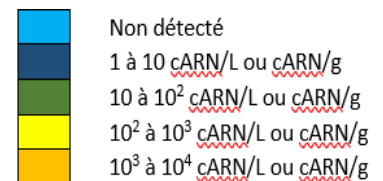
La technique EMA-RT-PCR était suggérée pour tenter de dissocier les NoV ayant une capsidie intègre des NoV ayant une capsidie dégradée ou des génomes libres.

(2) Résultats



GI	2018	2019	
<b>Bélisaire</b>	12	1	2
Huîtres	NP	NP	NP
Eau		GI.3	
Sédiment			

GII	2018	2019	
<b>Bélisaire</b>	12	1	2
Huîtres	NP	NP	NP
Eau			
Sédiment			



NP : non prélevé

GI	2018	2019	
<b>Jacquets</b>	12	1	2
Huîtres	GI.3		
Eau	GI.3		
Sédiment	GI.6	GI.2	GI.2

GII	2018	2019	
<b>Jacquets</b>	12	1	2
Huîtres			
Eau		GII.4	
Sédiment			

GI	2018	2019	
<b>Branne</b>	12	1	2
Huîtres			
Eau	GI.3		
Sédiment			

GII	2018	2019	
<b>Branne</b>	12	1	2
Huîtres			GII.4
Eau	GII.4	GII.17	
Sédiment		GII.4	GII.4

GI	2018	2019	
<b>Bordes</b>	12	1	2
Huîtres			
Eau			
Sédiment			

GII	2018	2019	
<b>Bordes</b>	12	1	2
Huîtres		GII.17	
Eau		GII.4	GII.4
Sédiment			

**Figure 12** : Synthèse des résultats en copie de génome de norovirus dans les huîtres, l’eau et les sédiments. Détection et quantification du génome de norovirus des groupes I et II. Résultats exprimés en copies de génome par gramme ou par litre.

Quelques centaines de copies de génome de NoV ont pu être détectées dans l'eau, sur l'ensemble des points et dans les sédiments au point Branne et Jacquets.

Ces résultats multi-matrices apportent cependant peu d'éléments supplémentaires sur l'empreinte NoV détectée. La détection des génomes de NoV dans les sédiments est très compliquée car les méthodes ne sont pas assez fiables ou suffisamment sensibles. Pour l'eau, on est confronté à la faible sensibilité et à la ponctualité du prélèvement. La détection dans des mollusques bivalves reste plus fiable et plus sensible.

**Si l'on compare ces résultats dans les huîtres lors des mêmes prélèvements analysés par deux laboratoires différents (déc 2018, jan-février 2019 - Figure 9 et**

Figure 12), les résultats présentent une empreinte différente :

- sur le suivi Eurofins, Figure 9, seul le groupe GII a été quantifié dans les huîtres en janvier 2019 aux points Bélisaire et Bordes, et en février 2019 au point Branne ;  
**sur le suivi Abiolab,**

- Figure 12, des noV GI sont détectés dans les huîtres aux Jacquets aux 3 dates, et au point Branne en janvier 2019  
des NoV GII sont aussi détectés au point Branne aux 3 dates et au point Bordes en janvier 2019.

Ces résultats interrogent sur la sensibilité de la méthode suivant les laboratoires pour les faibles détections (<2log) : on rentre dans le bruit de fond de l'analyse et de la détection.

Si l'on compare les résultats obtenus par Abiolab (Figure 13), suivant les deux techniques de PCR (standard et EMA-PCR), les seconds sont systématiquement plus faibles mais seulement de quelques unités génomes à chaque fois.

GII	2018		2019			
	12		1		2	
Branne	PCR	EMA PCR	PCR	EMA PCR	PCR	EMA PCR
Huîtres	28	21	49	44	61	55
Eaux marines	214	153	84	74	63	59

Sédiment	35	17	59	44	86	71
----------	----	----	----	----	----	----

**Figure 13** : Comparaison des résultats obtenus par les techniques de RT-PCR et d'EMA-RT-PCR. Exemples des résultats obtenus sur le site de Branne pour les norovirus du groupe II. Résultats exprimés en cARN/g.

Trop de questionnements persistent à ce stade pour conclure sur le caractère infectieux de l'empreinte observée. Les niveaux (<200 copies) restent dans le bruit de fond.

De plus, l'analyse par EMA-RTqPCR, comme dans le cas des eaux usées est susceptible de générer des faux-positifs.

### 3. D'où provient cette empreinte génomique intra-bassin : Investigations dans les tributaires

#### 3.1. Premières investigations de 2014 à 2017 : eau et coquillages

Les analyses (cf 2.2 et 2.3) démontrent une empreinte « génome de NoV » dans l'intra-Bassin, le SIBA a alors souhaité en comprendre l'origine.

Si un apport *via* le rejet des eaux usées traitées au Wharf de la Salie semble peu probable<sup>3</sup>, l'attention se porte alors sur les tributaires.

Dès 2013, des analyses ont été effectuées sur la matrice eau des tributaires : le canal des étangs, le Cirès, Le Betey, le Rouillet, la Leyre, le ruisseau du Bourg, le canal des Landes, la craste douce et le lac de Cazaux. Toutes les analyses ont été conduites sur une durée de 3 mois en 2013 sauf le suivi sur la Leyre qui a débuté en 2012 et s'est poursuivi jusqu'en mars 2016. D'octobre 2012 à janvier 2014, les analyses ont été réalisées par le laboratoire Lasat (La Rochelle). A partir de février 2014, elles ont été confiées au laboratoire Eurofins.

Tous les résultats se sont avérés négatifs à l'exception d'un prélèvement dans la Leyre datant de février 2014 où des NoV du groupe II ont été détectés à des niveaux très faibles : environ 60 copies /L.

La difficulté d'analyse dans la matrice eau a motivé des investigations dès 2014 dans des matrices intégratrices comme pour les suivis intra-bassin effectués dans les huîtres sauvages.

Seulement sans stock suffisant de coquillages d'eau douce dans les cours d'eau, le recours à l'encagement s'est avéré nécessaire.

<sup>3</sup> Etude courantologique de dispersion du panache, régulièrement actualisée (Rapport intitulé Modélisation de la dispersion des effluents rejetés par le wharf de la salie , SAFEGE-juin 2018), disponible en ligne et suivis microbiologiques dans les eaux océanes

(1) Sites et méthodes

Le suivi spatial des NoV dans plusieurs tributaires du Bassin, réalisé de 2014 à 2016, a été basé sur une approche de biosurveillance active (encagement d'organismes provenant d'un élevage ou d'un site considéré comme référence). Dans le cadre de cette étude, les avantages de cette approche sont :

- la possibilité de choisir les sites d'étude ;
- le choix du temps d'exposition. Ce temps a été fixé à 2 mois dans notre étude. Nous avons à l'époque estimé ce temps suffisant pour 1) assurer un temps d'exposition représentatif, et 2), s'assurer que la présence des NoV dans les coquillages ne reflétait pas une contamination antérieure.

## Espèces retenues

### Corbicula fluminea

La palourde asiatique (*Corbicula fluminea*) a été choisie sur proposition de l'Ifremer. Il s'agit d'un bivalve d'eau douce fouisseur vivant à l'interface entre le substrat et la colonne d'eau. C'est une espèce invasive en Europe. Ce bivalve symétrique mesure jusqu'à 3 centimètres chez les adultes (Figure 14).



**Figure 14.** *Corbicula fluminea*.

Ce modèle est très utilisé par la station marine d'Arcachon pour le suivi métallique de divers cours d'eau, et notamment les tributaires du Bassin. La station marine d'Arcachon et notamment l'équipe « Ecotoxicologie Aquatique » (UMR CNRS 5805 EPOC) a gracieusement fourni les corbicules et accepté d'intégrer le suivi des NoV sur les tributaires à leur suivi des éléments traces métalliques.

### Anodonta spp

En plus des corbicules, un suivi à l'aide d'anodontes a été testé. Il s'agissait d'évaluer la possibilité d'utiliser cette espèce de bivalve d'eau douce, notamment pour :

- limiter la pression sur les stocks de corbicules au niveau du site de référence ;
- diminuer le nombre de bivalves nécessaires à l'analyse, l'anodonte étant bien plus grosse que la corbicule (Figure 15 et Figure 16).



**Figure 15.** *Anodonta spp.*



**Figure 16.** Comparaison de la taille des anodontes et des corbicules.



### Origine des organismes

Les corbicules sont prélevées sur une station de référence près de Saint Seurin sur l'Isle (Gironde) où ces organismes se retrouvent en quantité importante. Elles sont récoltées puis acheminées à la station marine où elles sont ensuite stabulées (maintenues dans des aquariums).

Les anodontes ont été achetées à la ferme aquacole d'Anjou. Les anodontes ont été prélevées par le prestataire dans des rivières et des étangs où cette espèce est naturellement présente. Elles ont été récoltées peu de temps avant l'encagement, acheminées par envoi postal au SIBA et mises en cage sur les sites d'exposition au jour de réception.

### Sites échantillonnés

Deux objectifs ont été poursuivis. Dans un premier temps, il s'agissait d'établir une cartographie de la présence des NoV dans les tributaires du Bassin. Pour ce faire, plusieurs points ont été échantillonnés : le canal des étangs au Porge, le canal des Landes au parc de la chêneraie, le ruisseau du Bourg à Gujan-Mestras, la Leyre au Pont de Lamothe (Le Teich) et la Leyre à Mios.

Ces points ont été choisis car ils correspondaient à la fois aux points de suivi de la qualité de l'eau (REPAR) et aux points de suivi du programme OSQUAR 2 (Ostréiculture et Qualité de l'environnement du Bassin d'Arcachon) dans lequel des corbicules ont régulièrement été exposées pendant 3 ans pour suivre l'évolution des éléments traces métalliques dans les tributaires du Bassin.

Dans un second temps, 2 sites additionnels, un site en amont sur la Leyre et un site sur le Lacanau (affluent de la Leyre) ont été suivis pour tenter de tracer l'origine de la présence des NoV dans la Leyre.

Au total, 8 campagnes d'encagement ont été réalisées entre 2014 et 2016 Le Tableau 5 récapitule l'ensemble des campagnes. Ces campagnes ont dû être limitées en nombre de sites et en fréquence d'analyse en raison du manque de disponibilités en corbicules.

**Tableau 5.** Synoptique des campagnes d'encagement menées sur les tributaires du Bassin d'Arcachon. En bleu : campagnes réalisées – les croix indiquent des campagnes sans résultats par perte matériel

Année	Campagnes d'encagement								
	2014		2015				2016		
	Date de pose	NC	30-sept	30-déc	24-mars	08-juil	08-sept	01-déc	23-févr
Date de récupération	01-oct	28-oct	23-févr	1 <sup>er</sup> juin	26-août	27-oct	08-févr	10-mai	
Leyre à Salles								X	
Leyre à Mios									
Leyre à Lamothe									
Canal des Etangs									
Canal des Landes									
Ruisseau du Bourg									
Lacanau à Mios								X	



**Figure 17 : Localisation des sites d'encagement**

#### Protocole d'exposition et de récupération

Le jour de l'exposition, les corbicules sont transférées dans des glacières depuis la station marine jusque sur les sites d'étude. Elles sont transférées dans des cages en plastique lestées et largement perforées afin de maintenir un flux d'eau suffisamment important (Figure 18).

Trente corbicules sont exposées de manière à avoir en fin d'exposition une masse de tissu suffisante pour pouvoir conduire les analyses. Les cages sont ensuite immergées puis dissimulées de manière à éviter le vandalisme.



**Figure 18.** Cage d'exposition pour les corbicules.

Le jour de l'exposition, les anodontes ont été amenées dans des glacières sur les sites d'étude. Sur chaque site, 12 anodontes sont transférées dans des poches en grillage de fer, et lestées (Figure 19).



Figure 19. Cage d'exposition pour les anodontes.

Les cages (de corbicules et d'anodontes) sont immergées pendant 2 mois puis les organismes sont récupérés. Ils sont ensuite stockés dans des glacières puis transférés dans la journée au laboratoire prestataire pour que les analyses y soient réalisées dans les 24h suivant la récupération.

### Analyses

Les analyses sont réalisées par le laboratoire Eurofins. Les génomes de NoV sont détectés en utilisant la méthode ISO 15216 via le kit CEERAMTools.

#### (2) Résultats corbicules

**Tableau 6 : Synthèse des résultats d'analyses en génome de NoV dans les corbicules pour les norovirus GI et GII avec rappel des résultats dans les huîtres à Branne aux mêmes périodes.**

*La quantification < 40cARN/g n'est pas à retenir en valeur car inférieure à la sensibilité de la méthode.*

GI	01-oct.-14	28-oct.-14	févr.-15	juin-15	août-15	oct.-15	févr.-16	mai-16
Leyre à Salles								0
Leyre à Mios	203,5	0	2030	0	0	0	0	0
Leyre à Lamothe	0	0	1615	0	25	0	0	0
Canal des Etangs		0		0	0	0		
Canal des Landes		0	0	4,5	0	0		
Ruisseau du Bourg	0	0	0	0	0	0	0	0
Lacanau à Mios								0
GI+GII	01-oct.-14	28-oct.-14	févr.-15	juin-15	août-15	oct.-15	févr.-16	mai-16
Leyre à Salles								44
Leyre à Mios	158	0	6150	8	0	0	67	33
Leyre à Lamothe	162	0	2815	25	7	3	60	4
Canal des Etangs		0		0	0	0		
Canal des Landes		0	0	0	0	0		
Ruisseau du Bourg	0	0	0	0	8	0	42	1
Lacanau à Mios								6
GI+GII	oct.-14	oct.-14	févr.-15	juin-15	août-15	oct.-15	févr.-16	juin-16
Huître - Branne	0	0	726	4	0	0	13	4

	non détecté
	quantifié < 500cARN/g
	de 500 cARN/g à 10 <sup>3</sup>
	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>4</sup> cARN/g

Aucune empreinte en NoV GI ou GII n'a été détectée sur le Canal des Etangs et seulement une seule fois à un niveau très faible sur le Canal des Landes.

L'empreinte la plus marquée se situe sur la Leyre au point d'encagement situé en amont de la commune de Mios et au point aval, au niveau du Pont de Lamothe, avec des valeurs supérieures à  $10^3$  en février 2015. A cette date, les huîtres du point Branne présentaient une empreinte de  $10^2$ .

**Lorsque la pollution virale est significative pendant la période épidémique à GEA, ces résultats indiquent un possible apport de génome de NoV *via* la Leyre, sans toutefois présager de son caractère infectieux. Cependant, le faible nombre d'analyses rend l'interprétation fragile et ne permet pas de savoir s'il s'agit d'un phénomène épisodique ou récurrent.**

A noter également que les corbicules ont été encagées deux mois partant du postulat que leur empreinte éventuelle initiale en Nov (celle de leur lieu de prélèvement) ne serait plus détectable et que la mesure serait représentative du lieu d'encagement. Et en effet, 4 analyses dites témoin ont été réalisées à réception des organismes avant encagement et l'empreinte n'était pas nulle.

### (3) Résultats anodontes

**L'utilisation des anodontes ne s'est pas révélée concluante.**

Tout d'abord, le taux de survie après deux mois d'exposition étaient compris entre 60 et 80% en fonction des sites. Ceci pourrait être lié à l'écologie de ces organismes : ceux-ci préfèrent les fonds vaseux dans lesquels ils se tiennent enfouis ainsi que les courants faibles. Certains sites ne correspondaient pas à ces caractéristiques. Cela pourrait également être lié au protocole d'encagement car dans les poches métalliques, les anodontes étaient serrées les unes contre les autres ce qui n'est peut-être pas une condition optimale pour leur physiologie et leur survie.

Par ailleurs, les analyses en génome de NoV se sont toutes révélées négatives, alors que des détections positives en génomes NoV ont été retrouvées dans les corbicules sur les mêmes sites (La Leyre à Mios et La Leyre à Lamothe). Dans ces conditions, il n'est pas possible de conclure sur la base d'un seul essai compte tenu du comportement physiologique probablement instable des anodontes.

**Le choix de l'organisme sentinelle modèle est déterminant : les facteurs à prendre en compte sont notamment son adaptabilité au milieu, la connaissance de sa provenance et de sa physiologie.**

### *3.2. DEC 2018-Jan 2020 : Nouvelles investigations sur la Leyre*

Compte-tenu des premiers résultats obtenus et de la suspicion d'un apport via la Leyre, une nouvelle série d'analyses a été initiée. Devant les difficultés rencontrées

pour réaliser une biosurveillance active, la matrice eau a été retenue sur les conseils d'Abiolab Asposan dont les techniques semblaient mieux précisées.

(1) Sites et méthodes

De décembre 2018 à janvier 2020, 8 prélèvements ont ciblé le site du Pont de Lamothe, point situé à l'aval de la Leyre et au niveau duquel sont conduites d'autres analyses (nutriments, pesticides...) :

**Tableau 7 : mois de prélèvement**

	2018	2019												2020
mois	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1
Leyre														

Pour chaque prélèvement, 20 litres d'eau ont été échantillonnés et transmis au laboratoire Abiolab Asposan pour détection et quantification du génome des NoV par RT-qPCR et EMA-RT-qPCR, associé à un séquençage des NoV GI et GII.

(2) Résultats

**Tableau 8 : Résultats en copies/L pour les NoV GI et GII dans les eaux de la Leyre au point Lamothe et rappel des résultats Huîtres à Branne aux mêmes dates.**

Date	déc.-18	janv.-19	févr.-19	juil.-19	août-19	sept.-19	nov.-19	janv.-20
Norovirus GI	456	835	833	65	41	29	952	1070
Norovirus GI (EMA)	395	786	729	52	32	21	892	944
Norovirus GII	1489	2401	9451	58	74	46	824	1241
Norovirus GII (EMA)	984	1983	8447	44	59	24	738	1173
TOTAL GI + GII	1945	3236	10284	123	115	75	1776	2311
<b>BRANNE Huîtres</b>	<i>déc.-18</i>	<i>janv.-19</i>	<i>févr.-19</i>	<i>juil.-19</i>	<i>août-19</i>	<i>sept.-19</i>	<i>nov.-19</i>	<i>janv.-20</i>
<b>TOTAL GI + GII</b>	0	0	358	0	0	0	0	911

	non détecté
	quantifié < 500cARN/L
	de 500 cARN/L à 10 <sup>3</sup>
	10 <sup>3</sup> à 10 <sup>4</sup> cARN/L
	>10 <sup>4</sup> cARN/L

Les résultats sont présentés dans le Tableau 8. Les NoV des deux génogroupes sont systématiquement détectés dans les eaux de la Leyre. Ils sont quantifiés à des niveaux de 3 log cARN/L de novembre à février et à des niveaux plus faibles en période estivale quel que soit le groupe considéré. Ces résultats semblent cohérents avec une circulation plus importante des NoV pendant le pic épidémique hivernal.

Si l'on compare ces résultats avec l'empreinte NoV retrouvée dans les huîtres aux mêmes périodes (résultats Eurofins), on n'observe pas de corrélation évidente entre l'intensité de l'empreinte dans l'eau de la Leyre et les huîtres du Bassin. On ne peut

pas exclure à ce stade d'autres apports ou facteurs influençant la capacité des huîtres à accumuler ces particules.

Enfin, en termes d'empreinte génétique, les génotypes GI.3 d'une part, et GII.4 et GII.17 d'autre part, sont prédominants (Tableau 9).

**Tableau 9 : Détection, quantification et séquençage du génome de norovirus GI et GII dans la Leyre. Résultats exprimés en copies/L. Lorsque le séquençage a pu être réalisé, les génotypes identifiés sont indiqués dans les cases correspondantes aux échantillons.**

<b>GI</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>						
<b>Leyre</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Eau</b>	GI.3	GI.3	GI.3				GI.2 et GI.3	GI.2

<b>GI</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>						
<b>Leyre</b>	<b>12</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>12</b>
<b>Eau</b>	GII.4 et GII.17	GII.4 et GII.17	GII.4 et GII.17	GII.4	GII.17		GII.4	GII.4 et GII.17

Les génogroupes GII.4 et GII.17 sont prédominant dans les prélèvements. Ces génotypes correspondent à des souches épidémiques de NoV : pour rappel, GII.4 a été incriminé dans plusieurs épidémies survenues en Europe et est désormais le plus rencontré ; GII.17, est une souche apparue plus récemment en Asie et qui est en évidence depuis 5 à 6 ans en France et en Europe.

Il est intéressant de constater que le profil génétique des NoV de la Leyre apparaît proche de celui retrouvé dans les eaux usées à cette période.

### *3.3. Septembre 2020 – mars 2021 : une saison à part*

Fort de ces résultats, le SIBA continue au cours de l'année 2020 de s'interroger sur les NoV, leur origine et leur caractère infectieux dans les huîtres du Bassin d'Arcachon comme dans la Leyre.

Des projets sont en cours au niveau national sur ces questions d'infectivité impliquant des entreprises ostréicoles, les organisations professionnelles et le laboratoire Actalia.

Le SIBA décide alors de poursuivre des investigations en ce sens. Un partenariat est conclu entre le SIBA et Actalia au cours de l'année 2020 pour réaliser un ensemble de prélèvements et analyses complémentaires.

Par ce partenariat, le SIBA et Actalia poursuivent les objectifs suivants :

- Valider sur le terrain l'intérêt de FRNAPH-II comme indicateur de danger à NoV infectieux dans les huîtres et leur environnement
- Mieux appréhender la contamination et la vulnérabilité des sites locaux
- Implication dans le projet OXYVIR financé par le FEAMP Mesure 47 entre 2017 et 2023 avec les partenaires ACTALIA, LCPME, Suez, Gillardeau, CNC, CHU Dijon et le pôle Aquimer.

(1) Sites et méthodes

Les sites retenus sont :

- Les quatre points habituels intra-bassin sur matrice huîtres sauvages (20 individus/site)
- Un prélèvement au banc d'Arguin (conche centre, au point REMI) sur matrice huîtres sauvages (20 individus)
- Un point sur la Leyre (Lamothe) sur matrice eau (2 Litres) et ponctuellement deux points supplémentaires à Mios et sur le Lacanau (points utilisés pour les corbicules)

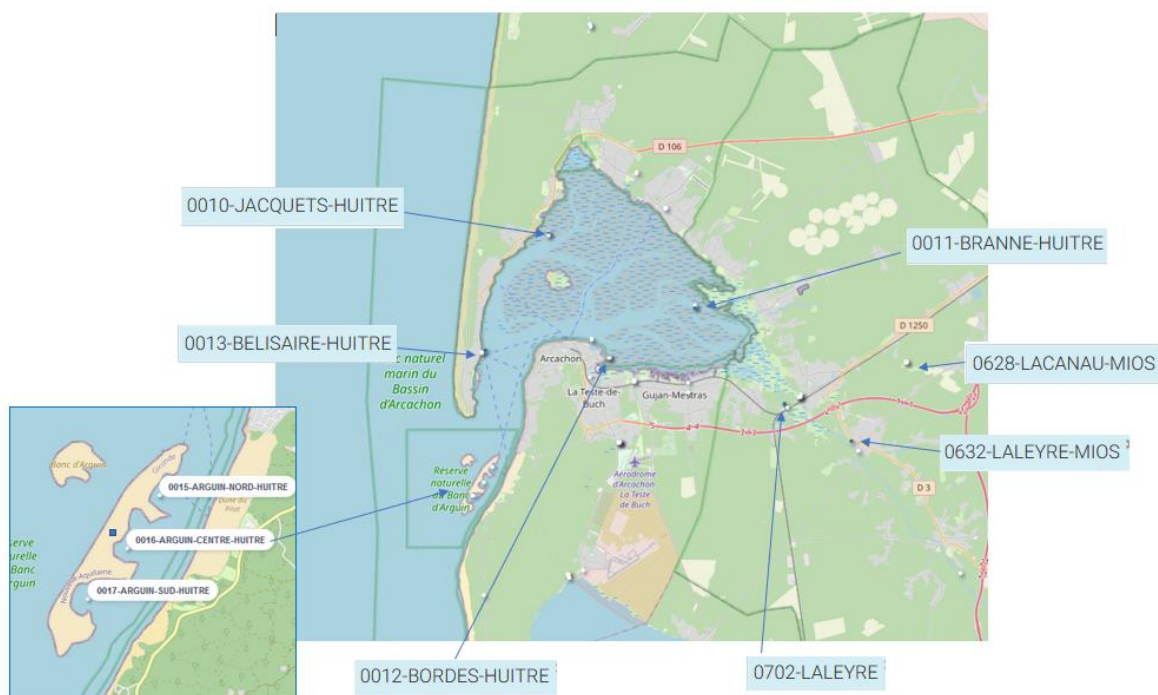


Figure 20 : Locations des points de prélèvement

Les échantillons ont été expédiés en froid positif le lendemain du prélèvement après conservation au froid. Le génome en NoV a été analysé suivant la norme ISO 15216-1 (2017). Les FRNAPH ont été analysés (infectieux et génome) suivant la norme ISO 10705-1 (2001) et selon Wolf *et al.*(2010).

(2) Résultats

Les 3 campagnes réalisées d'octobre à décembre 2020 révèlent une absence d'empreinte en génome de NoV dans les huîtres et une quantification très faible en octobre et novembre 2020 dans les eaux de la Leyre (Tableau 10).

Parallèlement, les indicateurs épidémiologiques du réseau sentinelle concernant les gastroentérites aiguës sont faibles comparés aux autres années.

Le partenariat décide alors de suspendre les prélèvements et analyses en attendant les premiers indicateurs épidémiques.

Or, alors que le réseau sentinelle ne présente toujours pas de reprise épidémique (semaine6-2021 - Figure 21), plusieurs TIAC sont déclarées et s'avèrent avoir pour origine la consommation de coquillages du Bassin d'Arcachon (toutes zones de production). La consommation de coquillages ferme alors pour 28 jours à compter du 11 février 2021.

Les résultats des analyses confiées à Eurofins confirment une détection notable en génome de NoV dans les huîtres pour les 4 points, en particulier à Branne en février 2021.

Le partenariat SIBA-ACTALIA relance immédiatement des campagnes de prélèvement dans les huîtres et les eaux de la Leyre. Aucune présence de NoV n'est retrouvée au 23 février dans les eaux et les niveaux observés dans les huîtres redeviennent rapidement faibles.

**Tableau 10 : résultats des campagnes d'analyses réalisées par le laboratoire Actalia de septembre 2020 à mars 2020- NoV GI+GII en copies/g ou copies/L**

Huîtres en cARN/g (GI+GII)	2020					2021			
	9	10	11	12	1	23/02/2021	01/03/2021	15/03/2021	
0010-JACQUETS		0	0		Arrêt du suivi actalia		57	0	
0011-BRANNE		0	0			première TIAC	632	85	0
0012-BORDES			0			déclarée le		55	0
0013-BELISAIRE		0	0			16/02/2021 -	252	59	0
ARGUIN		0		0		fermeture de 28 jours à			
EAU 0702 La Leyre cARN/L	0	217	183			compter du	0		
EAU La Leyre - Mios cARN/L					11 février	0			
EAU La Leyre - Lamothe cARN/L						0			

**Tableau 11 : rappel des résultats Eurofins à la même période. NoV GI+GII en cARN/g**

Huîtres GI+GII – Eurofins	sept.-20	oct.-20	nov.-20	déc.-20	janv.-21	10 fév. 2021	15 mars-21	avr.-21
JACQUETS	0	0	0	379	0	762	126	0
BRANNE	0	292	0	0	446	6555	1323	20
BORDES	0		0	0	0	1047	0	0
BELISAIRE	0	0	0	0	234	515	0	0

Cet épisode démontre que les données du réseau sentinelle ne peuvent servir d'indicateur de risque sur la présence de NoV dans le Bassin d'Arcachon.



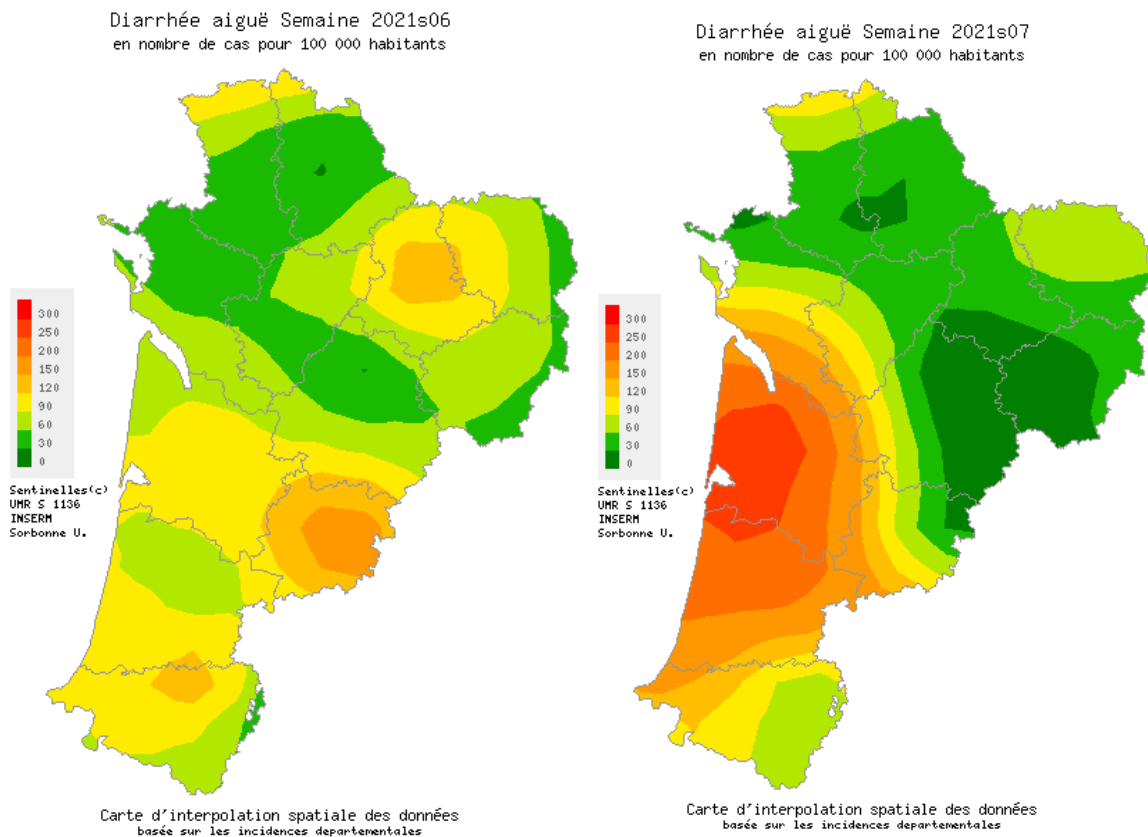


Figure 21 : cartes épidémiologiques du réseau sentinelle pour la semaine 6 (du 8 au 14/02/21) et la semaine 7 (du 15 au 21/02/2021)

(3) Premières approches d'estimation de l'inféctivité des NoV en utilisant les FRNAPH comme indicateur

Tableau 12 : résultats des campagnes d'analyses réalisées par le laboratoire Actalia de septembre 2020 à mars 2020- FRNAPH en UFP/g ou UFP/L  
Résultats nominaux présentés sur la plage de couleurs des résultats NoV

Phages infectieux en UFP/g	2020					2021		
	9	10	11	12	1	23/02/2021	01/03/2021	15/03/2021
0010-JACQUETS		0	0		Arrêt du suivi actalia		0	0
0011-BRANNE		0	1			11	1	0
0012-BORDES			0				5	0
0013-BELISAIRE		0	0			0	0	0
ARGUIN		0		0				
EAU 0702 La Leyre UFP/L	0	0	0				0	
EAU La Leyre - Mios UFP/L						0		
EAU La Leyre - Lamothe UFP/L						0		

A ce jour, l'analyse des FRNAPH Infectieux pour estimer le caractère infectieux des NoV dans les huitres reste à démontrer (Actalia, travaux en cours dans le cadre du programme OXYVIR, 2017-2023).

Sur cet épisode, le génome des NoV et les FRNAPH infectieux quantifiés indiqueraient une pollution virale plutôt ancienne cohérente avec l'absence de

particules virales infectieuses car pas ou très peu de FRNAPH infectieux ont été détectés. Seul le point Branne du 23/02/2021 pourrait suggérer la présence d'une pollution virale récente en raison de la présence de FRNAPH infectieux et de génome de NoV à des niveaux supérieurs à  $5,0 \times 10^2$  copies / g. Ici, il n'est pas exclu que le génome des NoV détectés puissent traduire la présence de NoV infectieux si cet indicateur du danger à NoV est bel et bien robuste.

## V. Discussion

Les investigations réalisées sur le système d'assainissement des eaux usées offrent à présent au SIBA une connaissance étayée du comportement des NoV.

On note une présence de génomes de NoV GI et/ou GII, génogroupes responsables des épisodes de gastroentériques humaines, dans les eaux usées brutes mais aussi dans les eaux usées traitées, sans saisonnalité vraiment marquée. Les niveaux observés, de l'ordre de 4 log, peuvent en faire un excellent indicateur de présence d'eaux usées brutes et/ou traitées dans les milieux, plus spécifique comparativement à *E. Coli*.

Le traitement par UV permet une réduction totale de la charge infectieuse des FRNAPH infectieux et donc potentiellement des NoV infectieux dans les eaux traitées avant rejet. Fort de ce constat, le SIBA tend à imposer ce traitement à l'année sur l'ensemble de ces stations, déjà effectif dès à présent pour les STEP de Biganos et de La Teste de Buch.

Concernant l'empreinte « génome de NoV » observée dans les huitres sauvages du Bassin d'Arcachon, elle est plus marquée lors les périodes hivernales avec les niveaux les plus forts (supérieurs à 3 log) observés lors des hivers particulièrement pluvieux (2013, 2018, 2020 et 2021).

La question de l'infectiosité de cette empreinte « génome de NoV » demeure, sauf en février 2021, où des TIAC à coquillages ont été déclarées, suivies d'une fermeture administrative de 28 jours de l'ensemble des zones de productions en lien avec l'instruction technique de la DGAL. Il est à retenir de cet épisode, la situation de crise constatée sur l'ensemble du bassin versant suite aux intempéries de janvier 2021 qui avait d'ailleurs amené le SIBA à déclarer une situation sinistrée des réseaux à la police de l'eau et aux autres parties prenantes en date 1<sup>er</sup> février 2021.

Dans le cadre des profils de vulnérabilité des eaux conchylicoles actuellement en cours de rédaction, une attention particulière sera portée sur l'organisation des procédures d'alerte pour la mise à l'abri de stocks de coquillages dans de tels cas. Définir les critères qui qualifieront une situation de crise constitue également une action à mener en collaboration avec les acteurs impliqués.

Dans les autres cas, les investigations pour comprendre l'origine des empreintes en génomes de NoV et caractériser leur infectivité en utilisant les FRNAPH-II infectieux comme indicateurs se poursuivent dans le cadre du partenariat avec ACTALIA et le projet OXYVIR (2017-2023).

Globalement, l'ensemble des résultats acquis sur la présence des NoV dans l'intra-Bassin et notamment sur le point Branne, les résultats acquis avec les corbicules et

les résultats acquis dans les eaux de la Leyre, orientent vers un apport de NoV dans le Bassin via la Leyre, en lien probable avec la présence en amont de plusieurs STEP dont certaines rejettent dans des affluents de la Leyre (Figure 22). Cela n'exclue pas d'autres sources possibles.

Le partenariat SIBA-ACTALIA prévoit en 2022 de nouvelles campagnes sur les huîtres et sur des organismes encagés en différents points de la Leyre. Le SIBA sera aussi impliqué dans le cadre du projet OXYVIR financé par le FEAMP, en particulier pour une action dédiée à anticiper sur la détection d'anomalie dans l'apport d'une pollution virale au niveau des zones conchylicoles.

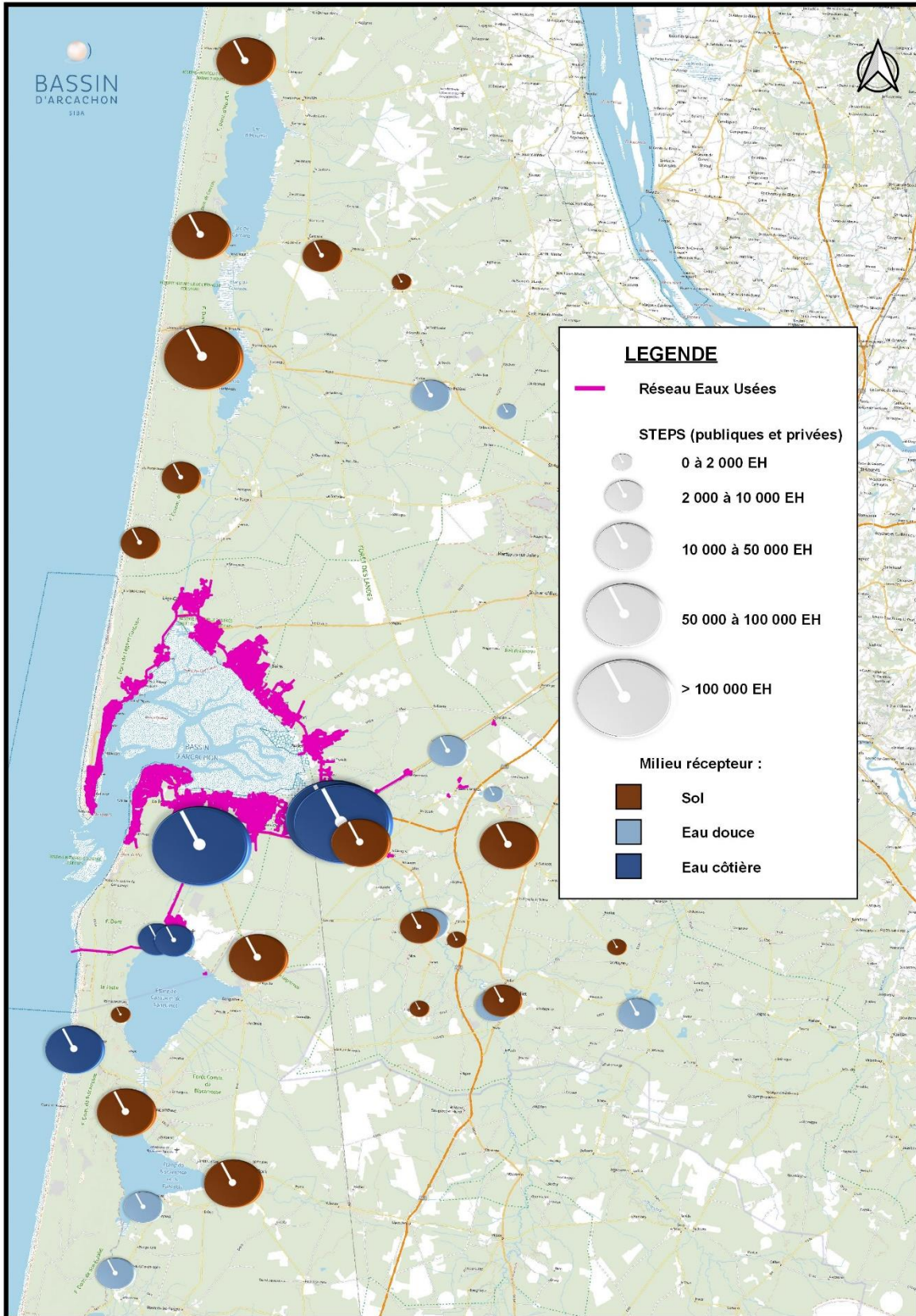


Figure 22 : STEP présent sur le bassin versant du Bassin d'Arcachon

## VI. Bibliographie recensée

Abad F.X., Pinto R.M., Bosch A. 1997. Disinfection of human enteric viruses on fomites. *FEMS Microbiology Letters* 156, 107-11.

ANSES 2010. Contamination de coquillages marins par le virus de l'hépatite A. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2009sa0044-2.pdf>

ANSES, 2016. Note d'appui scientifique et technique relatif à l'étude européenne de prévalence de norovirus dans les huîtres. <https://www.anses.fr/fr/system/files/BIORISK2016SA0016.pdf>

Atmar R.L., Neill F.H., Romalde J.M., Le Guyader S., Woodley C.M., Metcalf T.G., Estes M.K. 1995. Detection of Norwalk virus and Hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3014-3018.

Belliot G., Kamel A. H., Estienney M., Ambert-Balay K., Pothier P. 2010. Evidence of Emergence of New GGII. 4 Norovirus Variants from Gastroenteritis Outbreak Survey in France during the 2007-to-2008 and 2008-to-2009 Winter Seasons. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(3), 994-998.

Besse J.P., O. Geffard, M. Coquery. 2011. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE, Cemagref.

Brié A. 2017. Etude des propriétés de surface du bactériophage MS2 et du norovirus murin au cours de différents traitements d'inactivation. Rapport de thèse - Université de Lorraine.

Campos J.A., Lees D.N. 2014. Environmental transmission of human noroviruses in shellfish waters. *Applied and Environmental Microbiology* 80 (12) pp 3552-3561.

Chapalati Rao V., Lakhe S.B., Waghmare S.V., Raman V. 1981. Virus removal in primary settling of raw sewage. *J.E.E.D.*, 56-67.

Chikhi - Brachet R. et al., "Virus diversity in a winter epidemic of acute diarrhea in France", *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 40, N°11, pp. 4266-4272, 2002

Collet N. 2012. Virus entériques et transmission hydrique : Méthodes analytiques, efficacité des filières d'épuration et contamination sur des sites littoraux avec coquillages. Rapport de master. Université de Lorraine - Agence de l'Eau Seine Normandie.

Barrett M., Fitzhenry K., O'Flaherty V., Dore W., Keaveney S., Cormican M., Rowan N., Clifford E. 2016. Detection, Fate and Inactivation of Pathogenic Norovirus Employing Settlement and UV Treatment in Wastewater Treatment Facilities. *Science of the Total Environment* 15 (568) pp 1026-1036.

da Silva A.K., Le Guyader F.S., Le Saux J-C., Pommepuy M., Montgomery M., Elimelech M. 2008. Norovirus removal and particle association in a waste stabilization pond; *Environmental Science and Technology* 42, 9151-9157.

da Silva A. K., Le Saux J.-C., Parnaudeau S., Pommepeuy M., Elimelech M. Le Guyader F. S. 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: Different behaviors of genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(24), 7891-7897.

Davies, C.M., Yousefi, Z. and Bavor, H.J. (2003) Occurrence of coliphages in urban stormwater and their fate in stormwater management systems. *Letter of Applied Microbiology* 37, 299-303.

de Rougemont A., Ruvoen-Clouet N., Simon B., Estienney M., Elie-Caille C., Aho S., Pothier P., Le Pendu J., Boireau W., Belliot G. 2011. Qualitative and Quantitative Analysis of the Binding of GII.4 Norovirus Variants Onto Human Blood Group Antigens. *Journal of Virology* 85(9) pp 4057 - 4070.

de Rougemont. 2011. Rôle des antigens tissulaires de groupes sanguins humains A,B,H et Lewis dans l'évolution des norovirus GII.4. Rapport de thèse - Université de Bourgogne.

Dowell S.F. et al., "A multistate outbreak of oyster - associated gastroenteritis: implications for interstate tracing of contaminated shellfish", *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 171, pp. 1497 - 1503, 1995

EFSA. Scientific opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control to foodborne viruses. (2011) *EFSA Journal* 9:1-96.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2190.pdf>.

EFSA. Scientific Opinion on Norovirus (Nov) in oysters: methods, limits and control options. (2012) *EFSA Journal* 10:2500.  
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2500.pdf>.

EFSA. Scientific report on technical specifications for a European baseline survey on norovirus in oysters. *EFSA Journal* (2016) ;14(3):4414,62pp.

EFSA. Analysis of the European baseline survey of norovirus in oysters.(2019)  
<https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.2903/j.efsa.2019.5762>

Fumian T.M., Fioretti J.M., Lun J.H., Dos Santos I.A.L., White P.A., Miagostovich M.P. 2019. Detection of Norovirus Epidemic Genotypes in Raw Sewage Using Next Generation Sequencing. *Environment International* 123 pp 282-291. *Food Microbiology* 63 ; 248-254.

Fiori M. 2004. Rejet de Norovirus : Bilan des Connaissances et appréciation de son impact sur la zone côtière. Mémoire de l'École Nationale de la Santé Publique. ENSP Rennes.

Flannery J, Keaveney S, Doré W. 2009. Use of FRNA bacteriophages to indicate the risk of norovirus contamination in Irish oysters. *Journal of Food Protection*. 72(11), 2358-62.

Gerba C.P., Nokes R.L., Karpiscak M.M. 2000. Reduction of enteric organisms in small scale, subsurface flow constructed wetlands. *Proceedings of the Small Drinking Water and Wastewater Systems: Technology for the 21st Century*, 210-216.

Gerba C.P., Janauer G.E., Costello M. 1984. Removal of poliovirus and rotavirus from tapwater by a quaternary ammonium resin. *Water Research*. 18, 17-19.

Gilbert R.G., Rice R.C., Bouwer H., Gerba C.P., Wallis C., Melnick J.L. 1976. Wastewater renovation and reuse: virus removal by soil filtration. *Science* 192 (4243), 1004-1005.

Hartard C., Banas S., Loutreul J., Rincé A., Benoit F., Boudaud N., Gantzer C. 2016. Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. *Applied and Environmental Microbiology* 82(18) pp 5709-5719.

Hartard C., Banas S., River R., Boudaud N., Gantzer C. 2017. Rapide and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products.

Hartard C. 2017. Les bacteriophages à ARN-F spécifiques comme indicateurs du danger viral lié à la pollution fécale des matrices hydriques et alimentaires. Rapport de thèse - Université de Lorraine.

Hartard C., Leclerc M., Rivet R., Maul A., Loutreul J., Banas S., Boudaud N., Gantzer C. 2018. F-Specific RNA Bacteriophages, Especially Members of Subgroup II, Should Be Reconsidered as Good Indicators of Viral Pollution of Oysters. *Applied and Environmental Microbiology* 84(1) pp 1-14.

Hausel M.J., Machmeier R. 1973. On site wastewater treatment on problem soils. *JWPCF* 52, 548-552.

Hewitt J., Leonard M., Greening G.E., Lewis G.D. 2015. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Research* 45(18), 6267-76.

Fauvel B. 2016. Étude du transport et du devenir des bactériophages ARN F-spécifiques dans les eaux de la rivière de l'Alzette : influence des caractéristiques virales et hydro-climatologiques. Rapport de thèse - Université de Lorraine.

Fumian T.M., Fioretti J.M., Lun J.H., Dos Santos I.A.L., White P.A., Miagostovich M.P. 2019. Detection of Norovirus Epidemic Genotypes in Raw Sewage Using Next Generation Sequencing. *Environment International* 123 pp282-291.

Kamarasu P., Hsu H-Y., Moore M.D. 2018. Research progress in viral inactivation utilizing human norovirus surrogates. *Frontiers in sustainable food systems* 2 pp 1-17.

Lodder W.J., de Roda Husman A.M. 2005. Presence of Noroviruses and Other Enteric Viruses in Sewage and Surface Waters in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 71(3) pp 1453 - 1461.

Le Guyader S Atmar R., Maalouf H., Le Pendu J. 2013. Huitres et norovirus : une affinité particulière ? *Virologie* 17(4), 253-263.

Le Guyader S., Pommepuy M., Atmar R. 2009). Monitoring viral contamination in shellfish growing areas. In *New technologies in aquaculture: Improving production*

efficiency, quality and environmental management (Edited by G Burnell, University College Cork, Ireland and G Allan, NSW Department of Primary Industries, Australia).

Le Guyader S Haugarreau L., Miossec L., Dubois E., Pommepuy M. 2000. Three-year study to assess human enteric viruses in shellfish. *Applied and environmental microbiology*, 66(8), 3241-3248.

Le Guyader S., Dubois E., Menard D., Pommepuy M. 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-nested PCR. *Applied And Environmental Microbiology*, 60(10), 3665-3671.

Leung W.K., Chan P.K., Lee N.L., Sung J.J. 2010. Development of an in vitro cell culture model for human noroviruses and its clinical application. *Hong Kong Med Journal*, 16, 18-21.

Loisy F., Atmar R.L., Le Saux J.C., Cohen J., Caprais M.P., Pommepuy M., Le Guyader F.S. 2005 Use of rotavirus virus-like particles as surrogates to evaluate virus persistence in shellfish. *Applied Environmental Microbiology* 71, 6049-53.

Lopman B.A. et al., "Human caliciviruses in Europe", *Journal of Clinical Virology*, Vol. 24, pp. 137-160, 2002A

Lu J., Sun L., Fang L., Yang F., Mo Y., Lao J., Zheng H., Tan X., Lin H., Rutherford S., Guo L., Ke C., Hui L. 2014. Gastroenteritis Outbreaks Caused by Norovirus GII.17, Guangdong Province, China, 2014-2015. *Emerging Infectious Diseases* 21(7) pp 1240-1242.

Lucena F., Duran A.E., Moron A., Calderon E., Campos C., Gantzer C., Skraber S., Jofre J. 2004. Reduction of bacterial indicators and bacteriophages infecting faecal bacteria in primary and secondary wastewater treatments. *Journal of Applied Microbiology*, 97(5), 1069-1076.

Maalouf H. 2010. Spécificité de la fixation des norovirus sur les tissus de coquillages et implications sanitaires. Thèse de doctorat. Université de Nantes.

Maalouf H., Zakhour M., Le Pendu J., Le Saux J.C., Atmar R.L., Le Guyader F.S. 2010. Norovirus genogroup I and II ligands in oysters: tissue distribution and seasonal variations. *Applied Environmental Microbiology* 76, 5621-30.

Melnick J.L. 1984. Etiologic agents and their potential for causing waterborne virus diseases. *Monographs in Virology* 15, 1-16.

METEIGNER Claire, PERRIERE-RUMEBE Myriam (2021). Evaluation de la qualité des zones de production conchylicole. Département de la GIRONDE. Édition 2021.

Mounts A. W. et al., "Cold weather seasonality of gastroenteritis associated with Norwalk-like viruses", *Journal of Infectious Diseases*, Vol. 181 (Suppl. 2), pp. S284-S287, 2000

Myrmel M., Berg E.M., Grinde B., Rimstad E. 2006. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. *Journal of Water and Health* 4, 197-209.



ODE/LITTORAL/LERAR/21.005Ogorzaly L. 2009. Intérêt du géotypage des phages ARN F-spécifiques pour estimer la pollution fécale et virale des eaux. Université Henri Poincaré – Nancy 1.

Nicosia L.A., Rose J.B., Stark L., Stewart M.T. 2001. A field study of virus removal in septic tank drainfields. *Journal of Environmental Quality* 30, 1933-9.

Noble R.T. et al., "Inactivation of indicator microorganisms from various sources of faecal contamination in seawater and freshwater", *Journal of Applied Microbiology*, Vol. 96, pp. 464-472, 2004

Ogorzaly L., Tissier A., Bertrand I., Maul A., Gantzer, C. 2009. Relationship between Fspecific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water, *Water Research*, 43(5), 1257-1264.

Patel M.M., Hall A.J., Vinjé J., Parashar U.D. 2009. Noroviruses: a comprehensive review. *Journal of Clinical Virology*. 2009 Jan;44(1):1-8.

Payment P., Fortin S., Trudel M. 1986. Elimination of human enteric viruses during conventional waste water treatment by activated sludge. *Canadian Journal of Microbiology* 32, 922-5.

Pommeuy M, Hervio-Heath D, Caprais M-P et al. 2005. Fecal contamination in coastal areas: an engineering approach. in: Belkin S & Colwell RR (Eds) *Oceans and health, pathogens in the marine environment*, New York, NY, Springer, 331-359.

Prevost B., Lucas F.S., Goncalves A., Richard F., Moulin L., Wurtzer S. 2015a Large Scale Survey of Enteric Viruses in River and Waste Water Underlines the Health Status of the Local Population. *Environment International* 79 pp 42-50

Prevost B., Lucas F.S., Ambert-Balay K., Pothier P., Moulin L., Wurtzer S. 2015b. Deciphering the diversities of astroviruses and noroviruses in wastewater treatment plant effluents by a high-throughput sequencing method. *Applied and Environmental Microbiology* 81 (20) pp 7215-722.

Prevost B., Goulet M., Lucas F.S., Joyeux M., Moulin L., Wurtzer S. 2016. Viral persistence in surface and drinking water: suitability of PCR pre-treatment with intercalating dyes. *Water Research* 91 pp 68-75.

Randazzo W., Khezri M., Ollivier J., Le Guyader F.S., Rodríguez-Díaz J., Aznar R., Sánchez G. 2018. Optimization of PMAxx Pretreatment to Distinguish Between Human Norovirus With Intact and Altered Capsids in Shellfish and Sewage Samples. *International Journal of Food Microbiology* 266 pp 1-7.

Rönnqvist M., Mikkilä A, Tuominen P., Salo S., Maunula L. 2013. Ultraviolet Light Inactivation of Murine Norovirus and Human Norovirus GII: PCR May Overestimate the Persistence of Noroviruses Even When Combined With Pre-PCR Treatments. *Food and Environmental Virology* 6(1) pp 48-57.

Siebenga J.J., Lemey P., Kosakovsky-Pond S.L., Rambaut A., Vennema H, Koopmans M. 2010. Phylodynamic reconstruction reveals norovirus GII.4. Eepidemic expansions and their molecular determinants. *PLoS Pathogens*.

Sima L. C., Schaeffer J., Le Saux J. C., Parnaudeau S., Elimelech M., Le Guyader F. S.

2011. Calicivirus Removal in a Membrane Bioreactor Wastewater Treatment Plant, *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15), 5170-5177.
- Skraber S., Ogorzaly L., Helmi K., Maul A., Hoffmann L., Cauchie H.M., Gantzer C. 2009. Occurrence and persistence of enteroviruses, noroviruses and F-specific RNA phages in natural wastewater biofilms. *Water Research* 43(19), 5170-5177.
- Sofia Strubbia, My V T Phan, Julien Schaeffer, Marion Koopmans, Matthew Cotten, Françoise S Le Guyader. 2019. Characterization of Norovirus and Other Human Enteric Viruses in Sewage and Stool Samples Through Next-Generation Sequencing. *Food and Environmental Biology* 11(4) pp 400-409.
- Straub T.M., Bentrup K.H.Z., Orosz-Coghlan P., Dohnalkova A., Mayer B.K., Bartholomew R.A., Valdez C.O., Bruckner-Lea C. J., Gerba C.P., Abbaszadegan M., Nickerson C.A. 2007. In vitro cell culture infectivity assay for human noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 13(3), 396-403.
- Surbeck C.Q., Jiang S.C., Ahn J.H., Grant S.B. 2015. Flow fingerprinting fecal pollution and suspended solids in stormwater runoff from an urban coastal watershed. *Environmental Science and Technology* 40(14), 4435-41.
- Adeline Thomas A., Le Saux J-C., Ollivier J., Maalouf H., Pommepuy M., Le Guyader F.S. 2011. Norovirus et huîtres : de la terre à la mer ! *Virologie* 2011, 15 (6), 353-60.
- Tilghman, A., Garric, J., Coquery, M. 2009. La mesure des contaminants dans le biote : avantages et inconvénients pour la surveillance chimique du milieu continental, Cemagref.
- Treguier C., Schaeffer J., Le Saux J-C., Cochennec-Laureau N., Le Guyader S.F. 2015. Contamination des coquillages par les norovirus en rivière d'Auray (Norocoqauray). RST/LER/MPL/15.08 Ifremer.
- Vaillant V., Jourdan-Da Silva N., Quilici M.L., Couturier E., Le Guyader S., Delmas G., Le Saux J.C., 2012. Surveillance des risques biologiques liés à la consommation de coquillages en France. *Bulletin Epidemiologique Hebdomadaire*, HS, 34-3.
- van Beek J., Ambert-Balay K., Botteldoorn N., Eden J.S., Fonager J., Hewitt J., Iritani N., Kroneman A., Vennema H., Vinjé J., White P.A., Koopmans M. 2013. Indications for worldwide increased norovirus activity associated with emergence of a new variant of genotype II.4, late 2012. *Eurosurveillance* 18(1).
- Van Cuyk S., Siegrist R.L., Lowe K., Harvey R.W. 2004. Evaluating microbial purification during soil treatment of wastewater with multicomponent tracer and surrogate tests. *Journal of Environmental Quality* 33, 316-29.
- Vidales J.A., Gerba C.P., Karpiscak M.M. 2003. Virus removal from wastewater in a multispecies subsurface-flow constructed wetland. *Water Environment Research*, 75(3), 238-245.
- Westrell T., Teunis P., van den Berg H., Lodder W., Ketelaars H., Stenstrom T.A., de Roda Husman A.M. 2006. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research* 40, 2613-20.

Wyn-Jones P. 2007. The detection of waterborne viruses. In 'Human viruses in Water', Persp. Med. Virol. (Ed. A Bosch) pp. 177-204. (Elsevier).