



HAL
open science

Détection des virus entériques infectieux dans le milieu hydrique : méthodes actuelles et perspectives

Camille Bach

► **To cite this version:**

Camille Bach. Détection des virus entériques infectieux dans le milieu hydrique : méthodes actuelles et perspectives. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01732617

HAL Id: hal-01732617

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01732617>

Submitted on 14 Mar 2018

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

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



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

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

UNIVERSITE DE LORRAINE
2014

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de Pharmacie

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 10 Octobre 2014

par **Camille BACH**
née le 08/05/1986 à Metz (57)

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Détection des virus entériques infectieux dans le milieu
hydrique : méthodes actuelles et perspectives

Membres du Jury

Président : Pr. Christophe GANTZER, PU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Directeur : Dr Isabelle BERTRAND, MCF, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine

Juges : Dr Audrey ESCLATINE, MCF, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud
Dr Benoît GASSILLOUD, Chargé de recherche, ANSES, Nancy
Dr Catherine LAURAIN, PHA-Biologiste, Service de Bactériologie, CHU Nancy

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2013-2014**

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Francine KEDZIEREWICZ

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Président du Conseil de la Pédagogie

Bertrand RIHN

Président de la Commission de la Recherche

Christophe GANTZER

Président de la Commission Prospective Facultaire

Jean-Yves JOUZEAU

Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle

Béatrice FAIVRE

Responsable ERASMUS :

Francine KEDZIEREWICZ

Responsable de la filière Officine :

Francine PAULUS

Responsables de la filière Industrie :

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable du Collège

d'Enseignement Pharmaceutique

Jean-Michel SIMON

Hospitalier :

Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :

Raphaël DUVAL

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Max HENRY

Gérard SIEST

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Roger BONALY
 Pierre DIXNEUF
 Marie-Madeleine GALTEAU
 Thérèse GIRARD
 Maurice HOFFMANN
 Michel JACQUE
 Lucien LALLOZ
 Pierre LECTARD
 Vincent LOPPINET
 Marcel MIRJOLET
 Maurice PIERFITTE
 Janine SCHWARTZBROD
 Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT
 Gérald CATAU
 Jean-Claude CHEVIN
 Jocelyne COLLOMB
 Bernard DANGIEN
 Marie-Claude FUZELLIER
 Françoise HINZELIN
 Marie-Hélène LIVERTOUX
 Bernard MIGNOT
 Jean-Louis MONAL
 Blandine MOREAU
 Dominique NOTTER
 Christine PERDICAKIS
 Marie-France POCHON
 Anne ROVEL
 Maria WELLMAN-ROUSSEAU

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
 Annie PAVIS

Faculté de Pharmacie**Présentation****ENSEIGNANTS**

*Section
 CNU**

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	<i>Thérapie cellulaire</i>
Chantal FINANCE	82	<i>Virologie, Immunologie</i>
Jean-Yves JOUZEAU	80	<i>Bioanalyse du médicament</i>
Jean-Louis MERLIN	82	<i>Biologie cellulaire</i>
Alain NICOLAS	80	<i>Chimie analytique et Bromatologie</i>
Jean-Michel SIMON	81	<i>Economie de la santé, Législation pharmaceutique</i>

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Jean-Claude BLOCK	87	<i>Santé publique</i>
Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	<i>Pharmacologie</i>
Raphaël DUVAL	87	<i>Microbiologie clinique</i>
Béatrice FAIVRE	87	<i>Biologie cellulaire, Hématologie</i>
Luc FERRARI ☒	86	<i>Toxicologie</i>
Pascale FRIANT-MICHEL	85	<i>Mathématiques, Physique</i>
Christophe GANTZER	87	<i>Microbiologie</i>
Frédéric JORAND ☒	87	<i>Environnement et Santé</i>

Pierre LABRUDE (retraite 01-11-13)	86	<i>Physiologie, Orthopédie, Maintien à domicile</i>
Isabelle LARTAUD	86	<i>Pharmacologie</i>
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	<i>Pharmacognosie</i>
Brigitte LEININGER-MULLER	87	<i>Biochimie</i>
Pierre LEROY	85	<i>Chimie physique</i>
Philippe MAINCENT	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alain MARSURA	32	<i>Chimie organique</i>
Patrick MENU	86	<i>Physiologie</i>
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Bertrand RIHN	87	<i>Biochimie, Biologie moléculaire</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	<i>Pharmacie clinique</i>
Julien PERRIN	82	<i>Hématologie biologique</i>
Marie SOCHA	81	<i>Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique</i>
Nathalie THILLY	81	<i>Santé publique</i>

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	<i>Parasitologie</i>
Mariette BEAUD	87	<i>Biologie cellulaire</i>
Emmanuelle BENOIT	86	<i>Communication et Santé</i>
Isabelle BERTRAND	87	<i>Microbiologie</i>
Michel BOISBRUN	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François BONNEAUX	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
Ariane BOUDIER	85	<i>Chimie Physique</i>
Cédric BOURA	86	<i>Physiologie</i>
Igor CLAROT	85	<i>Chimie analytique</i>
Joël COULON	87	<i>Biochimie</i>
Sébastien DADE	85	<i>Bio-informatique</i>
Dominique DECOLIN	85	<i>Chimie analytique</i>
Roudayna DIAB	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Natacha DREUMONT	87	<i>Biochimie générale, Biochimie clinique</i>
Joël DUCOURNEAU	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Florence DUMARCAY	86	<i>Chimie thérapeutique</i>
François DUPUIS	86	<i>Pharmacologie</i>
Adil FAIZ	85	<i>Biophysique, Acoustique</i>
Caroline GAUCHER	85/86	<i>Chimie physique, Pharmacologie</i>
Stéphane GIBAUD	86	<i>Pharmacie clinique</i>
Thierry HUMBERT	86	<i>Chimie organique</i>
Olivier JOUBERT	86	<i>Toxicologie</i>
Francine KEDZIEREWICZ	85	<i>Pharmacie galénique</i>
Alexandrine LAMBERT	85	<i>Informatique, Biostatistiques</i>
Faten MERHI-SOUSSI	87	<i>Hématologie</i>
Christophe MERLIN	87	<i>Microbiologie</i>
Maxime MOURER	86	<i>Chimie organique</i>
Coumba NDIAYE	86	<i>Epidémiologie et Santé publique</i>
Francine PAULUS	85	<i>Informatique</i>
Christine PERDICAKIS	86	<i>Chimie organique</i>

ENSEIGNANTS (suite)

Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Gabriel TROCKLE	86	Pharmacologie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIUO	87	Biochimie et Biologie moléculaire
Colette ZINUTTI	85	Pharmacie galénique

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

☒ *En attente de nomination*

***Disciplines du Conseil National des Universités :**

80 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

81 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

82 : *Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

85 ; *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé*

86 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé*

87 : *Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques*

32 : *Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle*

11 : *Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes*

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION,
NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES
THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES
COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

REMERCIEMENTS

A ma directrice de Thèse, Mme Isabelle BERTRAND, pour m'avoir accompagné tout au long de mon année de master et avoir accepté de diriger ce travail. Merci pour ta confiance, ta disponibilité et tes conseils toujours pertinents. Tu m'as enseigné une méthode de travail qui se révèle très utile dans le monde rigoureux de l'assurance qualité.

A M. Christophe GANTZER, qui me fait l'honneur de présider ce jury. Pour m'avoir accepté dans son laboratoire lors de mon internat et permis de découvrir l'univers merveilleux de la recherche lorsque j'avais besoin de fuir l'hôpital. Veuillez trouver ici mes remerciements les plus sincères.

A mes juges, Mme Audrey ESCLATINE et M. Benoit GASSILLOUD, qui me font l'honneur de participer à ce jury. Veuillez trouver ici, l'expression de mon respect et de ma reconnaissance.

A Mme Catherine LAURAIN, pour avoir accepté sans hésiter de juger ce travail. Pour les étudiants d'officine il est d'usage de demander à son maître de stage de participer au jury de thèse. En faisant appel à toi, j'ai l'impression que la boucle est bouclée.

A toute l'équipe du laboratoire de microbiologie : Aurélie, Erell, Romain, David, Sandrine, Sandrine. Merci de m'avoir accompagnée dans mes premiers pas en recherche et pour votre bonne humeur qui m'a fait particulièrement apprécier cette année passée parmi vous.

A mes parents, qui ont sponsorisé sans faille ces nombreuses années d'études. Merci pour vos encouragements et pour toutes ces valeurs que vous m'avez transmises. A Noémie et Clément, qui rendent mon séjour à Paris supportable, merci pour votre présence et les nombreuses soirées sushi. A toute ma famille qui m'a suivie et encouragée depuis toujours, merci pour tout.

A mon Pépé Jean, Papeu et Monique, vous m'avez tant donné, j'aurai été si fière de prêter serment devant vous.

A mes amis de la fac, Fiona et Sophie, nous nous sommes légèrement perdues de vue mais j'espère pour mieux nous retrouver. A Caro, toujours toujours là malgré les années qui passent, merci pour tout.

A l'Orchestre Symphonique de l'Université de Lorraine, pour l'instant détente du mardi soir et qui bat Meetic à plates coutures. Merci à Mathilde, Hélène, Valérie, Paul et Guillaume mon copiputre préféré.

L'internat m'a permis également de faire de belles rencontres (merci à Béatrice pour le stage aux Essais Cliniques, créateur d'amitié depuis toujours). Merci à Marie, Aurélie, Arnaud, Jeany mon fournisseur officiel de sangsues, et tous les autres ... pour tous les bons moments partagés même pendant les gardes. Merci à Clara et Marion (ma coupine du Nôrd) pour le footing décompression du lundi soir, qu'il vente, neige (un peu) ou pleuve (souvent).

Merci à toutes les personnes rencontrées à l'hôpital et ailleurs qui ont permis de rendre ces quatre ans d'internat plus humain.

Merci à Pouic et Mélu, mes réveils matin officiels, toujours présents et égaux à eux même. Je ne sais pas encore où le futur va me porter mais je vous garantis que vous serez dans mes valises.

Merci à Nicolas, de m'avoir supportée et soutenue durant ces quatre années d'internat, pour ta confiance et ta patience, pour les bons moments partagés et les projets à venir. Tu as mis un peu de musique dans ma vie, merci.

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES	4
LISTE DES TABLEAUX	5
ABREVIATIONS	6
INTRODUCTION.....	8
PREMIERE PARTIE : Les virus entériques pathogènes du milieu hydrique.....	10
1- Les virus entériques pathogènes.....	10
1.1- Les virus des gastro-entérites aiguës.....	13
1.1.1- Les calicivirus : norovirus et sapovirus.....	14
1.1.1.1- Les norovirus.....	15
1.1.1.2- Les sapovirus.....	17
1.1.2- Les rotavirus.....	18
1.1.3- Les adénovirus	20
1.1.4- Les astrovirus	22
1.1.5- Le virus Aichi.....	23
1.2- Les virus des hépatites	24
1.2.1- Virus de l'hépatite A	24
1.2.2- Virus de l'hépatite E.....	26
1.3- Virus entériques responsables d'autres pathologies.....	28
1.3.1- Les entérovirus et paréchovirus	28
1.3.1.1- Le genre <i>Entérovirus</i>	29
1.3.1.2- Le genre <i>Paréchovirus</i>	30
1.3.2- Les réovirus.....	31
1.4- Autres virus potentiellement transmissibles par voie hydrique	31
1.4.1- <i>Picornaviridae</i>	31
1.4.2- <i>Parvoviridae</i>	32
1.4.3- Autres virus.....	32
2- Les voies de contamination.....	33
3- Survie des virus entériques.....	36
4- Cas d'épidémies virales liées à l'eau ou aux aliments	38
4.1- Epidémies virales liées à l'eau	38
4.2- Epidémies virales liées aux aliments.....	41

DEUXIEME PARTIE : Méthodes actuelles de détection des virus entériques pathogènes dans l'eau et les aliments	43
1- Contrôle sanitaire microbiologique de l'eau et des aliments	43
2- Méthodes actuelles pour la recherche des virus entériques dans l'eau et les aliments.....	46
2.1- Méthodes de concentration et d'éluion-concentration	46
2.1.1- Méthodes de concentration pour l'analyse d'échantillons hydriques	46
2.1.2- Analyse virologique d'aliments	49
2.1.3- Analyse virologique des boues.....	50
2.2- Méthodes d'extraction des acides nucléiques	50
2.3- Méthodes de détection des virus	51
2.3.1- Détection par culture cellulaire	51
2.3.2- Détection du génome viral par RT-PCR	54
2.4- Méthodes normalisées existantes et en préparation pour la détection de virus dans l'eau et les aliments	58
2.4.1- Méthode normalisée pour la recherche des entérovirus dans les eaux : Normes XP T90-451	58
2.4.2- Méthode normalisée en développement pour la détection du virus de l'hépatite A et du norovirus dans les aliments et les eaux embouteillées	59
2.5- Comparaison des concentrations en virus entériques dans l'eau et les aliments déterminées par culture cellulaire et RT-PCR	60
2.6- Interprétation d'un signal positif en génome en termes de danger viral	62
TROISIEME PARTIE : Détection des virus entériques infectieux : méthodes en développement et perspectives	65
1- Méthodes basées sur la culture cellulaire.....	65
1.1- Détection de génome viral dans des cellules infectées	65
1.1.1- Détection avec amplification : RT-PCR.....	66
1.1.2- Détection de génome viral dans des cellules infectées par hybridation <i>in situ</i>	70
1.2- Détection de protéines virales dans les cellules infectées	72
1.2.1- Détection de protéines virales structurales.....	72
1.2.2- Détection de protéines virales non structurales.....	73
1.3- Détection de modifications cellulaires lors de l'infection virale.....	74
1.4- Adhésion virale sur cellules permissives	76
2- Evaluation de l'intégrité de la capsid virale	77
2.1- Traitement enzymatique.....	77
2.2- Agents intercalants	80
2.3- Techniques immunologiques	83
2.3.1- Détection par RT-PCR	83

2.3.1.1- Séparation immuno-magnétique	83
2.3.1.2- Immunocapture	85
2.3.2- Détection par réaction colorée : méthode ELISA	85
3- Méthodes évaluant l'intégrité du génome	87
3.1- PCR long fragment.....	87
3.2- Cas particulier des <i>Picornaviridae</i> : région 5' non codante.....	88
4- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'infectiosité virale	89
4.1- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'intégrité de la capside	89
4.2- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'intégrité du génome viral.....	92
CONCLUSION	95
BIBLIOGRAPHIE	97
RESUME :	133

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Observation par microscopie électronique des principaux virus entériques associés à une transmission par voie hydrique (Koopmans et Duizer, 2004)	11
Figure 2: Virus détectés chez des patients consultant leur médecin généraliste pour infection gastro-intestinale, en fonction de l'âge, pour la période 1993-1996 (FSA, 2000)	13
Figure 3 : Virus détectés chez des patients consultant leur médecin généraliste pour infection gastro-intestinale, en fonction de l'âge, pour la période 2008-2009 (FSA, 2012)	13
Figure 4 : Agrégats de virus de Norwalk observés au microscope électronique (Kapikian, 2000).....	15
Figure 5 : Sapovirus dans les selles d'un enfant atteint de gastro-entérite, microscopie électronique (Curry, 2003).....	18
Figure 6 : Représentation schématique d'un virion de rotavirus (Singer <i>et al.</i> , 2010).....	19
Figure 7 : Structure d'un adénovirus (Russel, 2000).....	20
Figure 8 : Structure d'un astrovirus (Dong <i>et al.</i> , 2011)	22
Figure 9 : Estimation de la prévalence du virus de l'hépatite A en 2005	25
Figure 10 : Structure d'une particule du virus de l'hépatite E (Mori et Matsuura, 2011)	27
Figure 11 : Virus de l'hépatite E agrégés (souche A87) observés en microscopie électronique (Huang <i>et al.</i> , 1992).....	27
Figure 12 : Schéma du cycle de contamination virale du milieu hydrique	34
Figure 13 : Représentation schématique de l'état d'ionisation des protéines en fonction du pH (Michen et Graule, 2010).....	47
Figure 14: Evolution de la fluorescence au cours d'une PCR en temps réel en fonction du nombre de cycle	55
Figure 15 : Représentation schématique du principe de la PCR en temps réel avec une sonde TaqMan	56
Figure 16 : Principe des puces à ADN	57
Figure 17 : Inactivation du <i>Poliovirus 1</i> infectieux (infectious virus) détecté par culture cellulaire et dégradation de son génome (viral genome) détecté par RT-PCR en temps réel à 35°C dans une eau minérale (Gassilloud <i>et al.</i> , 2003)	61
Figure 18 : Logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire (afssa, 2007)	62
Figure 19 : Principe de la culture cellulaire couplée à la RT-PCR.....	66
Figure 20 : Principe des sondes moléculaires (d'après Ganguli <i>et al.</i> , 2011)	70
Figure 21 : Principe du FRET appliqué à la détection d'une protéase virale dans des cellules infectées (d'après Hamza <i>et al.</i> , 2011)	74
Figure 22 : Principe de la FTIR couplée à la culture cellulaire (d'après Lee-Montiel <i>et al.</i> 2011).....	76
Figure 23 : Principe du traitement enzymatique avant détection par PCR.....	78
Figure 24 : Mode d'action des agents intercalant EMA ou PMA	80
Figure 25 : Principe de la séparation immuno-magnétique (d'après Hamza <i>et al.</i> , 2011)	84
Figure 26 : Principe de la méthode ELISA, il s'agit ici de la méthode ELISA sandwich.....	86
Figure 27 : Prédiction des réactions au niveau des protéines ou du génome de poliovirus 1 soumis à différents traitements inactivant (Wigginton et Kohn, 2012).....	89

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Virus humains transmissibles par voie hydrique (d'après Hamza <i>et al.</i> , 2011 ; Bosch <i>et al.</i> , 2008 ; Carter <i>et al.</i> , 2005 ; Fauquet <i>et al.</i> , 2005).....	12
Tableau II: Classification des sérotypes des adénovirus humains (Cupelli et Stehle, 2011).....	21
Tableau III : Excrétion virale dans les selles (Schwarzbrod, 2000).....	34
Tableau IV : Inactivation virale en fonction de la température, de l'exposition aux UV ou au chlore.	37
Tableau V : Les épidémies virales récentes d'origine hydrique au niveau mondial (Hamza <i>et al.</i> , 2011)	39
Tableau VI : Epidémies virales récentes liées à la consommation d'aliments contaminés (d'après Stals <i>et al.</i> , 2012).....	42
Tableau VII : Points isoélectriques (<i>pI</i>) expérimentaux de certains virus entériques	48
Tableau VIII : Exemples de lignées cellulaires permettant la détection de virus entériques (d'après afssa, 2007).....	53
Tableau IX : Comparaison de la culture cellulaire et de la RT-PCR pour la détection de virus entériques dans des aliments et des échantillons environnementaux	60

ABREVIATIONS

A549 : cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
afssa : agence française de sécurité sanitaire des aliments
ALAT : ALanine AminoTransférase
anses : agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (anciennement afssa)
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
BET : bromure d'éthidium
BGM et BGMK : lignée continue de cellules de rein de singe vert Buffalo
BSA : albumine de sérum bovin
CaCo-2 : lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer colique
CCL : Contaminant Candidate List
CE : Commission Européenne
CEN : Comité européen de normalisation
CFP : protéine fluorescente cyan
CoV : coronavirus
CSHPF : Conseil supérieur d'hygiène publique de France
CSMVSP : Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique
Ct : Cycle threshold
CT : concentration x temps
db : double brin
DI₅₀ : dose infectante qui provoque des symptômes chez 50% des sujets infectés
ECP : Effet cytopathique
EFSA : European Food Safety Authority, autorité européenne de sécurité des aliments
EIL : essais inter-laboratoire
ELISA : Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay
EMA : Ethidium Monoazide
ESIMS : Spectrométrie de masse avec ionisation par électroébulisaison
FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfert
FRhK : cellules de rein fœtal de singe rhésus
FSA : Food Standards Agency (UK)
FTIR : spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier
GD1a : ganglioside
HCSP : Haut Conseil de la santé publique
HEK : cellules de rein d'embryon humain
Hela : lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer de l'utérus
Hep2 : lignée de cellules humaines dérivée d'un cancer du larynx
ICC-PCR : Integrated Cell Culture PCR (combinaison culture cellulaire et PCR)
ICTV : Comité International de la Taxonomie des Virus
IFA : Immunofluorescence Assays
IFREMER : Institut français de recherche pour l'exploitation de la mer
IMS : séparation immunomagnétique
InVS : Institut de Veille Sanitaire
ISO : Organisation internationale de normalisation
kb : kilo base

kbp : kilo paire de base
L20B : lignée continue de cellules de souris transfectées avec le récepteur cellulaire des poliovirus
LEMP : Leucoencéphalopathie multifocale progressive
Log ou log₁₀ : logarithme décimal
MA-104 : lignée continue de cellules de rein embryonnaire de singe rhésus
MALDI : Désorption-ionisation laser assistée par matrice
MIQE : minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments
MNV : norovirus murin
NoV : norovirus
NPPUC : nombre le plus probable d'unités cytopathiques
OMS : Organisation Mondiale pour la Santé
pb : paire de bases
PBS : Phosphate Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction, Réaction en Chaîne par Polymérase
PEG : Polyéthylène glycol
PLC/PRF/5 : lignée de cellules humaines dérivée d'un hépatome humain
PMA : Propidium Monoazide
ppm : partie par million
PVK : cellules primaires de rein de singe vervet
qPCR : Quantitative PCR
RAW 264.7 : lignée de macrophages
RD : lignée de cellules humaines dérivée d'un rhabdomyosarcome humain
RT : Reverse Transcription
SAFV : virus Saffold
SaV : sapovirus
sb : simple brin
SRAS : syndrome aigu respiratoire sévère
TCID₅₀ : dose infectant en culture de tissus 50 % (unité infectieuse)
TGBE : Tampon Tris, Glycine, Extrait de Bœuf
T_m : Temperature melting
UFP : Unité Formant Plage
US-EPA : Agence Américaine de l'Environnement
UV : ultraviolet
Vero : lignée continue de cellules de rein de singe
VHA : virus de l'hépatite A
VHE : virus de l'hépatite E
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine
VPN : valeur prédictive négative
YFP : protéine fluorescente jaune

INTRODUCTION

L'importance du milieu hydrique dans la transmission d'infections virales a été démontrée dans les années 1940-1945 avec les épidémies de poliomyélite (LeGuyader *et al.*, 2014). La mise en évidence de particules virales dans les selles de personnes infectées ainsi que dans les eaux usées des zones endémiques a permis la remise en question d'une transmission aérienne de la maladie. La virologie environnementale a ensuite connu un tournant au début des années 1990 avec le développement des méthodes de biologie moléculaire.

Les virus abondent dans le milieu hydrique, aussi bien dans les eaux douces que dans le milieu marin. Parmi ces virus, les virus excrétés dans les selles de personnes infectées sont capables de provoquer des infections chez l'homme et présentent donc un intérêt en santé humaine. Ces virus sont regroupés sous le nom de virus entériques, ils appartiennent à plusieurs familles et plusieurs genres. Ils sont responsables de gastro-entérites aiguës, d'hépatites, mais aussi d'autres pathologies comme la poliomyélite. Selon l'OMS, plus de 500 millions de personnes sont concernées chaque année dans le monde par des maladies infectieuses d'origine hydrique. Plus de trois millions de personnes décèdent chaque année de maladies liées à l'eau, aux installations sanitaires ou à l'hygiène. Parmi ces décès, plus de deux millions sont dus à des maladies diarrhéiques, la plupart chez des enfants de moins de cinq ans. Les maladies diarrhéiques représentent ainsi la deuxième cause de mortalité dans le monde des enfants de moins de cinq ans (OMS, 2013a). Les maladies virales occupent ici une place non négligeable, le rotavirus représente la cause principale de diarrhée sévère dans le monde (Ganesh et Lin, 2013), provoquant le décès de près de 500 000 enfants de moins de cinq ans par an (Parashar *et al.*, 2003). Le norovirus, lui, est responsable du décès d'environ 200 000 enfants de moins de cinq ans (Patel *et al.*, 2008).

La contamination de l'homme par des virus entériques pathogènes met en cause la consommation d'eau insuffisamment ou non traitée, mais aussi le contact avec des eaux récréatives contaminées, la consommation de fruits de mer cultivés dans des zones conchylicoles contaminées ou encore la consommation de produits maraichers contaminés par irrigation ou épandage de boues d'épuration (Schwartzbrod, 2000). A l'heure actuelle, la qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation est uniquement basée sur des indicateurs bactériens. Or, la survie dans l'environnement et la résistance aux traitements de désinfection diffèrent entre les bactéries et les virus. La pertinence des indicateurs bactériens pour l'évaluation du danger viral semble alors contestable. Ainsi, le CSMVSP (Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique), dans son avis de janvier 2002, est parvenu à la conclusion que les indicateurs bactériens fécaux conventionnels ne sont pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de norovirus dans les mollusques. Pour évaluer les risques pour la santé humaine il conviendrait donc d'utiliser également la détection de virus entériques. Cette détection peut se faire par culture cellulaire qui est actuellement la méthode de référence car elle permet de détecter les virus infectieux présentant un risque en termes de santé publique. Cependant, tous les virus ne sont pas cultivables, c'est le cas du norovirus, d'où l'intérêt des méthodes moléculaires qui permettent une détection rapide et spécifique du génome viral. Toutefois, la présence de génome viral ne peut être systématiquement reliée à la présence de virus infectieux car le génome persiste

beaucoup plus longtemps dans l'environnement que les particules virales infectieuses. Devant ce constat, il apparaît nécessaire de développer de nouvelles méthodes de détection. Ces techniques doivent permettre de détecter la totalité des virus entériques pathogènes dans le milieu environnemental tout en discriminant les particules virales infectieuses et non infectieuses pour une bonne évaluation du risque sanitaire lié à l'eau et aux aliments.

Ce travail bibliographique s'articulera selon trois axes. Tout d'abord, nous nous intéresserons aux différents virus entériques pathogènes du milieu hydrique et à leurs caractéristiques. Ensuite nous recenserons les méthodes actuelles de détection des virus dans le milieu hydrique et leurs limites. Enfin, nous aborderons les méthodes de détection actuellement en développement et les différentes perspectives envisagées.

PREMIERE PARTIE :

Les virus entériques pathogènes du milieu hydrique

Les virus associés à une transmission hydrique sont des virus entériques, c'est-à-dire qu'ils infectent les cellules du tractus intestinal et sont excrétés dans les selles des personnes infectées. Ces virus posent des problèmes significatifs en termes de santé publique, ils sont responsables de gastro-entérites, d'hépatites, de paralysies, de méningites ou encore de maladies respiratoires. Ces virus sont excrétés en grande quantité par voie fécale et vont contaminer l'environnement, ils peuvent ainsi être transmis par voie hydrique ou lors de la consommation d'aliments contaminés.

Nous allons tout d'abord présenter ces virus entériques pathogènes, ensuite nous nous intéresserons à leurs voies de transmission, à leur persistance dans l'environnement et enfin nous décrirons des exemples d'épidémies liées à ces virus.

1- Les virus entériques pathogènes

Les virus entériques sont excrétés dans les selles, ce sont des virus nus de taille comprise entre 20 et 100 nm, ils peuvent être classés en trois groupes en fonction des pathologies dont ils sont responsables (Koopmans et Duizer, 2004). Le premier groupe correspond aux virus responsables de gastro-entérites aiguës, il s'agit des norovirus, rotavirus, adénovirus, sapovirus, astrovirus... Ces virus colonisent le tractus intestinal et s'y répliquent en causant des symptômes tels que diarrhées et vomissements. Le deuxième groupe de virus entériques comprend les virus des hépatites transmises par voie digestive, il s'agit des virus des hépatites A et E. Enfin le troisième groupe concerne des virus tels que le poliovirus et les coxsackievirus, se répliquant au niveau intestinal mais causant des pathologies diverses après migration vers d'autres organes, notamment le système nerveux central.

La **figure 1** représente certains de ces virus observés par microscopie électronique. Les principaux virus humains pouvant être transmis par la voie hydrique sont présentés dans le **tableau I**.

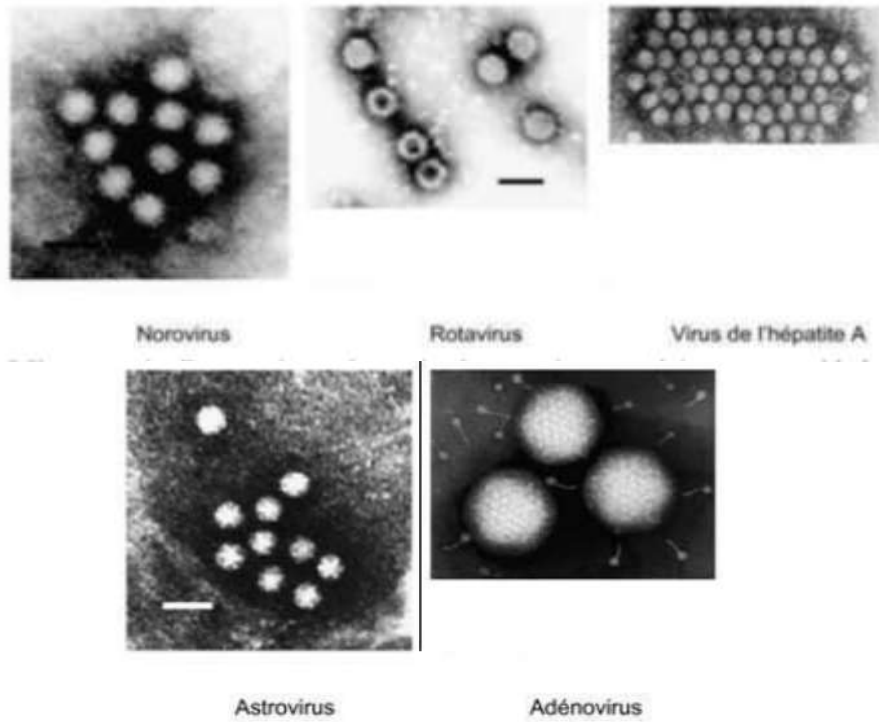


Figure 1 : Observation par microscopie électronique des principaux virus entériques associés à une transmission par voie hydrique (Koopmans et Duizer, 2004)

Tableau I : Virus humains transmissibles par voie hydrique (d'après Hamza *et al.*, 2011 ; Bosch *et al.*, 2008 ; Carter *et al.*, 2005 ; Fauquet *et al.*, 2005)

Pathologie	Nom commun des virus	Famille	Genre	Capside		Génome		
				Morphologie	Taille	Nature	Taille (kb ou kpb)	Configuration
Gastro-entérite	Norovirus	<i>Caliciviridae</i>	<i>Norovirus</i>	icosaédrique	27-30 nm	ARN sb	7-8	1 segment
	Sapovirus	<i>Caliciviridae</i>	<i>Sapovirus</i>	icosaédrique	27-30 nm	ARN sb	7-8	1 segment
	Rotavirus	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus (A-C)</i>	icosaédrique	75 nm	ARN db	19-32	11 segments
	Astrovirus	<i>Astroviridae</i>	<i>Mamastrovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	6-7	1 segment
	Adénovirus	<i>Adenoviridae</i>	<i>Mastadenovirus</i>	icosaédrique	80-110 nm	ADN db	26-45	linéaire
	Virus Aichi	<i>Picornaviridae</i>	<i>Kubovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
Hépatite	Virus de l'hépatite A	<i>Picornaviridae</i>	<i>Hepatovirus</i>	icosaédrique	25-28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Virus de l'hépatite E	<i>Hepeviridae</i>	<i>Hepevirus</i>	icosaédrique	30 nm	ARN sb	7	1 segment
Autres*	Coxsackievirus A et B	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Echovirus	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Poliovirus	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Entérovirus	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	icosaédrique	28 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Parechovirus	<i>Picornaviridae</i>	<i>Parechovirus</i>	icosaédrique	27 nm	ARN sb	7-9	1 segment
	Réovirus	<i>Reoviridae</i>	<i>Orthoreovirus</i>	icosaédrique	75 nm	ARN db	18-30	10 segments

* Ces virus peuvent être responsables d'une grande variété de symptômes, allant de symptômes respiratoires à des symptômes neuronaux

1.1- Les virus des gastro-entérites aigües

Il est aujourd'hui admis que les gastro-entérites virales aigües les plus communes sont dues aux rotavirus chez les jeunes enfants et aux norovirus chez les adultes. Les virus responsables de gastro-entérites sont une cause importante de mortalité et de morbidité dans le monde, mais leur importance est souvent sous-estimée. Entre 1993-1996 et 2008-2009, deux études menées au Royaume-Uni ont recensé toutes les consultations chez un médecin généraliste pour infections gastro-intestinales (FSA, 2000 et 2012). La répartition des cas entre cinq virus entériques en fonction de l'âge des patients est représentée sur la **figure 2** pour la première étude et sur la **figure 3** pour la seconde.

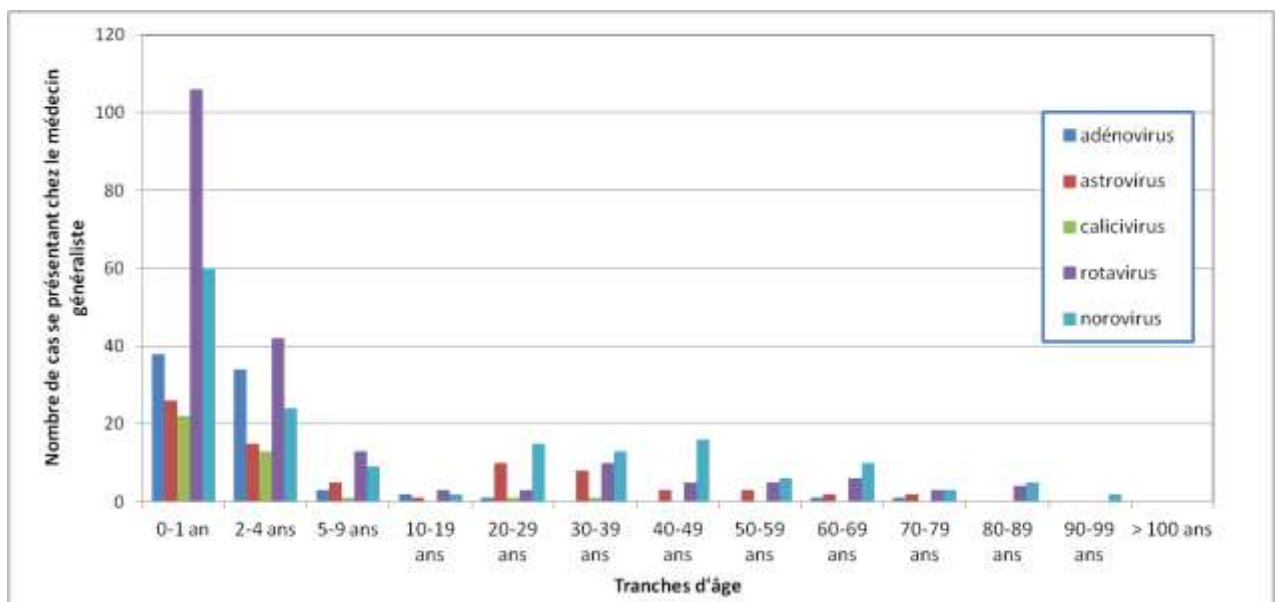


Figure 2: Virus détectés chez des patients consultant leur médecin généraliste pour infection gastro-intestinale, en fonction de l'âge, pour la période 1993-1996 (FSA, 2000)

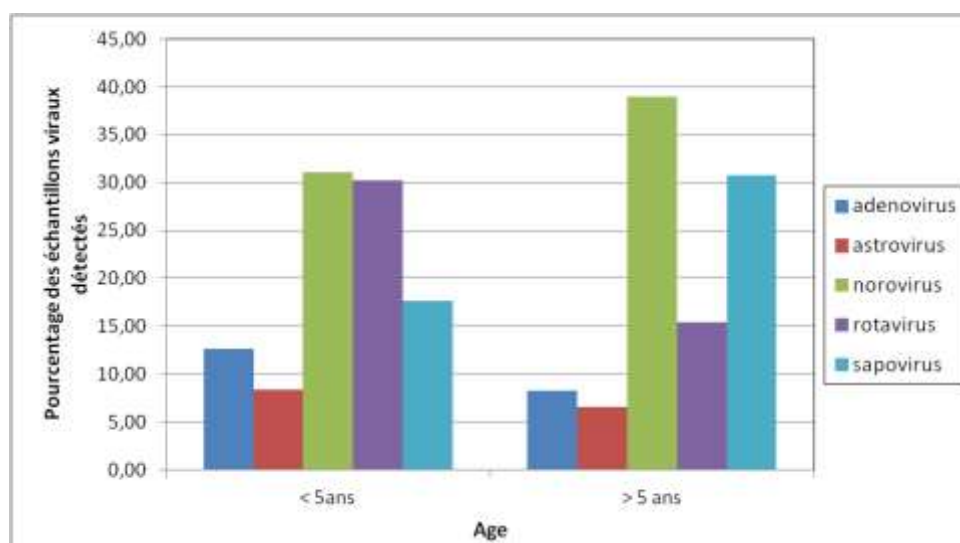


Figure 3 : Virus détectés chez des patients consultant leur médecin généraliste pour infection gastro-intestinale, en fonction de l'âge, pour la période 2008-2009 (FSA, 2012)

Lors de la première étude (FSA, 2000), les sapovirus sont détectés sous l'appellation calicivirus. Nous remarquons que très peu de calicivirus sont alors détectés chez les adultes en comparaison à la seconde étude (FSA, 2012). Ceci peut s'expliquer par les progrès en termes de sensibilité des méthodes de détection entre ces deux études. Lors de la première étude, 26,5% des consultations chez le généraliste pour infection intestinale virale concernaient des enfants de moins de cinq ans présentant une infection à rotavirus. Ce chiffre passe à environ 12% lors de la seconde étude. Cette différence peut s'expliquer du fait de l'amélioration des techniques de détection de l'ensemble des virus entériques entre les deux études. La vaccination anti-rotavirus en routine des enfants au Royaume Uni ne se pratiquait pas lors de ces deux études.

Les norovirus représentent la cause la plus importante d'épidémies de gastro-entérites non bactériennes dans le monde (Carter, 2005). Ces virus infectent aussi bien les adultes que les enfants, comme le montrent les **figures 2 et 3**. Ils représentent 40 à 50% des gastro-entérites liées à la nourriture aux USA (Dolin, 2007). Les principaux virus infectant les adultes au Royaume-Uni en 2008-2009 sont les norovirus et les sapovirus (FSA, 2012). Les infections à rotavirus représentent la cause majeure de diarrhée chez les enfants de 6 à 24 mois (Schaechter *et al.*, 1999). La quasi-totalité des enfants ont au moins eu une infection à rotavirus du groupe B avant l'âge de cinq ans. Les rotavirus sont responsables d'environ deux millions d'hospitalisations et provoquent 352 000 à 592 000 décès chez les enfants de moins de cinq ans chaque année dans le monde (Parashar *et al.*, 2003). Les enfants des pays les plus pauvres comptent pour 82% des morts par rotavirus.

Les astrovirus sont une cause importante de gastro-entérites chez les jeunes enfants (Dennehy *et al.*, 2001 ; Herrmann *et al.*, 1991), ce qui ne ressort pas forcément dans l'étude de la FSA (2012). En 1978, Kurtz et Lee ont effectué une recherche d'anticorps à astrovirus dans un hôpital anglais, ils ont constaté que 75% des enfants de 5 à 10 ans possédaient des anticorps dirigés contre ce virus. Les astrovirus sont aussi une cause importante de gastro-entérites chez les personnes âgées (Lewis *et al.*, 1989 ; Gray *et al.*, 1987) en association avec d'autres virus comme des rotavirus ou calicivirus.

Pour les adénovirus, ce sont essentiellement les sérotypes 40 et 41 qui sont responsables de gastro-entérites. L'infection est le plus souvent asymptomatique chez les adultes en bonne santé.

Nous allons présenter les principaux virus responsables de gastro-entérites aiguës transmissibles par voie hydrique.

1.1.1- Les calicivirus : norovirus et sapovirus

Le nom calicivirus vient du mot latin calyx qui signifie « calice », la surface de ces virus présente en effet des dépressions en forme de calice visibles en microscopie électronique. Les calicivirus sont des virus à ARN simple brin de polarité positive. Ils possèdent une capside icosaédrique d'environ 30 nm de diamètre. Ces virus sont retrouvés chez un grand nombre d'hôtes comme l'homme, les primates, le chat, le porc, le poulet. La famille des *Caliciviridae* inclut deux genres qui peuvent infecter les humains : *Norovirus* et *Sapovirus*.

1.1.1.1- Les norovirus

La dénomination norovirus (NoV) fait référence à la ville de Norwalk dans l'Ohio aux Etats-Unis, où survint une épidémie de gastro-entérites impliquant des enfants et des adultes en 1968 (Adler et Zickl, 1969). Les particules virales ont seulement été clairement identifiées dans les échantillons de cette épidémie en 1972. Une observation au microscope électronique a été possible après agglutination des particules par des anticorps issus du sérum d'un patient convalescent (Kapikian *et al.*, 1972). Ce virus a alors été dénommé virus de Norwalk, en référence à la ville où eut lieu l'épidémie. La **figure 4** représente les agrégats de norovirus observés au microscope électronique (Kapikian, 2000). Grâce à l'analyse du génome, qui est un ARN simple brin de sept à huit kilo bases, le virus de Norwalk a ensuite été classé dans la famille des *Caliciviridae* et dans le genre *Norovirus*. Ce genre regroupe cinq génogroupes dont les génogroupes I, II et IV qui sont pathogènes pour l'homme. La diversité de la séquence du gène de la capsidie a permis de définir des génotypes qui sont respectivement au nombre de 8, 17 et 1 pour les génogroupes I, II et IV (Zheng *et al.*, 2006).

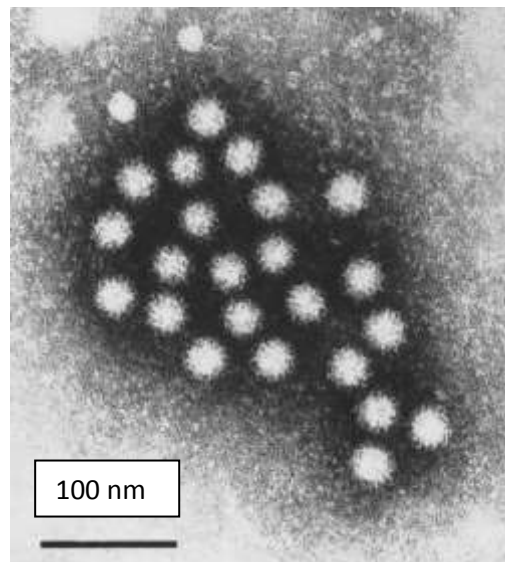


Figure 4 : Agrégats de virus de Norwalk observés au microscope électronique (Kapikian, 2000)

Signes cliniques et réponse immunitaire :

Les norovirus sont responsables de gastro-entérites aiguës avec diarrhée et vomissements d'apparition brutale. L'incubation pour les génogroupes I et II a une valeur médiane de 1,2 jours et 95% des cas symptomatiques sont observés avant 2,6 jours (Lee *et al.*, 2013).

Les vomissements sont très fréquents chez les enfants de plus de un an alors que la diarrhée domine le tableau clinique chez les enfants de moins de un an. De la fièvre est observée chez 37 à 45% des patients, celle-ci est souvent spontanément résolutive en 24h. La guérison est elle aussi spontanée au bout de deux à trois jours ; cependant des formes cliniques plus sévères peuvent être observées chez les personnes immunodéprimées avec une

évolution possible vers une atteinte chronique. La détection du virus dans les selles peut se faire jusqu'à trois semaines après l'infection chez les patients avec ou sans symptômes.

Lors d'études réalisées aux USA sur des volontaires sains afin de tester le pouvoir pathogène et immunogène des norovirus, trois types de situation ont été observées. Certains individus ont développé une maladie associée à une réponse immunitaire, d'autres sont restés asymptomatiques tout en présentant une séroconversion associée à une excrétion du virus, et enfin, certains n'ont présenté ni symptômes, ni séroconversion (Ruvoën et Le Pendu, 2013). De même, lors d'études réalisées sur des personnes volontaires, 13 à 40% d'entre elles n'ont pas développé de symptômes (Patel *et al.*, 2009). Certaines personnes semblent donc présenter une résistance innée à ces virus. La théorie émise est que les norovirus utilisent comme ligands cellulaires des glycanes A, B, H et Lewis (de la famille des antigènes tissulaires de groupes sanguins) et que le polymorphisme de ces glycanes influencerait la sensibilité aux infections à norovirus (Ruvoën et Le Pendu, 2013).

Voies de transmission :

L'homme est le seul réservoir des norovirus humains. La transmission se fait par la voie féco-orale soit directe, soit indirecte via l'eau ou les aliments contaminés. L'eau, les coquillages filtreurs comme les huîtres qui concentrent les virus, les fruits et les légumes exposés à de l'eau contaminée ou encore les produits dérivés comme la glace ou les coulis peuvent être des sources de contamination (afssa, 2007). Une transmission par voie aérienne est également possible par les aérosols produits lors des vomissements (Koopmans *et al.*, 2002).

Trois éléments favorisent la transmission de ces virus, leur faible dose infectieuse, la grande diversité des souches et leur grande résistance dans l'environnement (Patel *et al.*, 2009). Ces virus présentent une dose infectieuse inférieure à 10^2 particules virales et une excrétion fécale élevée comprise entre 10^7 et 10^{10} particules virales par gramme de selles. De plus, l'excrétion virale peut perdurer jusqu'à deux semaines après le début des symptômes. Ainsi, une épidémie de gastro-entérites à norovirus liée à la consommation de sandwiches décrite en 1997 aux Etats-Unis, était due à la préparation des sandwiches par une personne malade 10 jours auparavant (Parashar *et al.*, 1998). La grande diversité des souches avec des types antigéniques et génétiques multiples favorise les infections à répétition (Lau *et al.*, 2004 ; Patel *et al.*, 2009) et l'immunité n'est généralement que de quelques mois (Parrino *et al.*, 1977). Du fait de la grande diversité antigénique et surtout de l'absence d'immunité acquise de longue durée, aucun vaccin n'a été développé pour ces virus. Enfin, les norovirus semblent relativement stables dans l'environnement car de nombreuses épidémies à norovirus ont été reliées à une contamination du milieu hydrique (Patel *et al.*, 2009).

Epidémiologie :

Les norovirus sont responsables de la majorité des épidémies de gastro-entérites aiguës chez les patients de tout âge (Hall *et al.*, 2011) aussi bien dans les pays en développement que dans les pays industrialisés (Fankhauser *et al.*, 2002). Ils représentent la principale cause de maladie liée à la nourriture (Scallan *et al.*, 2011) et sont responsables de la moitié des gastro-entérites dans le monde (Patel *et al.*, 2009). Aux Etats-Unis, les norovirus sont responsables d'environ 21 millions de cas de gastro-entérites aiguës par an, provoquant plus de 70 000

hospitalisations, 400 000 visites aux urgences et environ 800 décès (Hall *et al.*, 2012). En Europe, de 1995 à 2000, les norovirus ont été responsables de plus de 85% des épidémies de gastro-entérites non bactériennes (Lopman *et al.*, 2003). Ces virus causent chaque année la mort de 200 000 enfants de moins de cinq ans dans les pays en voie de développement (Patel *et al.*, 2008).

Les norovirus sont responsables d'infections partout dans le monde et tout au long de l'année, cependant ils sont plus fréquemment rencontrés en hiver d'où le nom de « winter vomiting disease » utilisé dans les pays anglo-saxons. Ainsi, en Europe, on observe une saisonnalité hivernale avec quelques épidémies ponctuelles au printemps et en été (afssa, 2007). Une augmentation de la détection de norovirus au niveau mondial a été observée pendant la période 2002-2003 avec plusieurs épidémies à norovirus rapportées dans des hôpitaux au Royaume-Uni, aux Etats-Unis, en Europe, au Canada et au cours de croisières (Lopman *et al.*, 2004). Ces différentes épidémies ont été attribuées à l'émergence d'une nouvelle souche de norovirus dans le monde qui possède une mutation du gène de la polymérase (Lopman *et al.*, 2003 et 2004). La détection de ce nouveau variant du génogroupe II.4 coïncide avec une augmentation des épidémies en Europe et surtout, elle a précédé un pic d'épidémie atypique au printemps et en été 2002. Cette nouvelle souche semble plus infectieuse que les autres et mérite de plus amples investigations.

Détection :

En diagnostic clinique, la méthode de référence est la RT-PCR par amplification du gène de l'ARN polymérase. Des tests immunologiques de type ELISA sont également commercialisés, mais ils sont moins sensibles que la détection génomique. Dans l'environnement et les aliments, la technique de référence est la RT-PCR. Une seule étude a décrit la culture de norovirus humains sur système tridimensionnel (Straub *et al.*, 2007).

Ainsi, les norovirus sont une cause majeure de gastro-entérites dans le monde, toutes classes d'âge confondues et quel que soit le pays. C'est l'agent infectieux le plus fréquemment responsable d'épidémies de gastro-entérites aiguës en collectivité, aussi bien d'origine alimentaire qu'hydrique.

1.1.1.2- Les sapovirus

Les sapovirus (SaV) ont été identifiés pour la première fois lors d'une épidémie de gastro-entérites dans un orphelinat de la ville de Sapporo au Japon (Chiba *et al.*, 1979). La **figure 5** représente des sapovirus observés en microscopie électronique. Le génome de ces virus est un ARN monocaténaire de polarité positive de taille comprise entre sept et huit kilo bases. Les sapovirus sont divisés en cinq génogroupes, eux-mêmes divisés en génotypes (Hansman *et al.*, 2007).

Les sapovirus sont également responsables de gastro-entérites. L'incubation est de 24 à 48 h avec des symptômes souvent moins marqués que pour les norovirus (Cubitt, 1989). La guérison est spontanée en moins de trois jours.

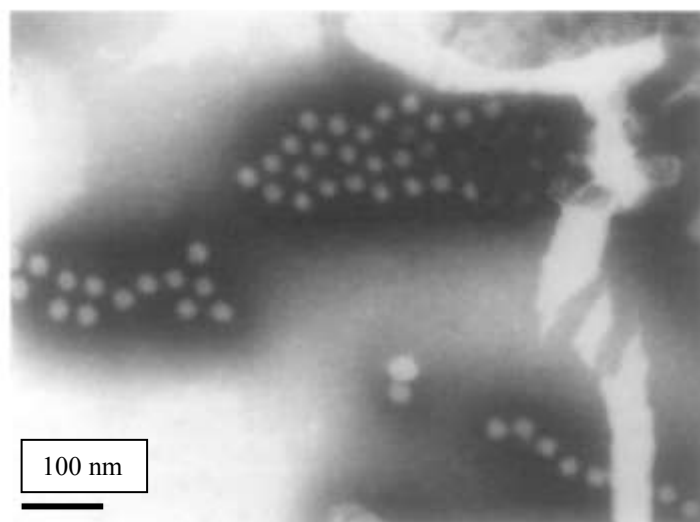


Figure 5 : Sapovirus dans les selles d'un enfant atteint de gastro-entérite, microscopie électronique (Curry, 2003)

La transmission des sapovirus suit surtout la voie féco-orale directe, mais peut aussi se faire de façon indirecte avec l'eau contaminée. Tout comme les norovirus, les sapovirus semblent très résistants dans l'environnement, bien que cette résistance soit difficile à évaluer du fait de l'absence actuelle de système de multiplication *in vitro* (afssa, 2007). En revanche, ces virus sont rarement impliqués dans des épidémies liées à la nourriture (Chiba *et al.*, 2000).

Les sapovirus sont surtout retrouvés dans des infections de l'enfant et des personnes âgées. Ils comptent pour 3% des admissions d'enfants à l'hôpital pour diarrhée au Royaume-Uni et aux Etats-Unis. La plupart des enfants présentent des anticorps à l'âge de 12 ans (FSA, 2000). Les sapovirus peuvent aussi être responsables d'épidémies nosocomiales (Johansson *et al.*, 2005).

La détection de sapovirus, aussi bien chez l'homme que dans l'eau et les aliments, est réalisée par détection du génome par RT-PCR.

1.1.2- Les rotavirus

Les rotavirus appartiennent à la famille des *Reoviridae*. En microscopie électronique, ils ressemblent à une roue d'où leur nom (**figure 1, page 11**). leur capsidie icosaédrique mesure entre 70 et 100 nm de diamètre (Weisberg, 2007) et leur génome est composé de 11 segments d'ARN bicaténaire de taille totale comprise entre 19 et 32 kilo paires de bases (**figure 6**). Ces virus sont classés en huit groupes, de A à H (Desselberger, 2014), mais seuls les groupes A, B et C infectent les humains et le groupe B est surtout retrouvé en Chine (Carter, 2005).

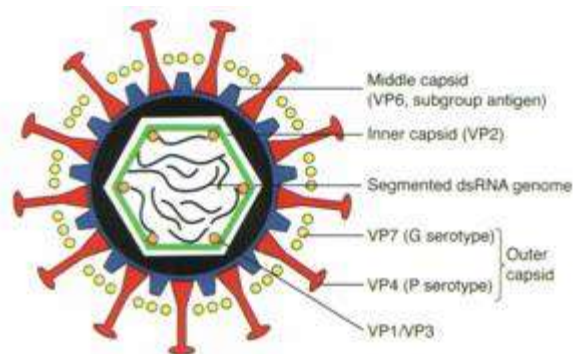


Figure 6 : Représentation schématique d'un virion de rotavirus (Singer *et al.*, 2010)

Signes cliniques et prévention :

La durée médiane de l'incubation est de deux jours et 75% des cas symptomatiques sont observés à 2,5 jours (Lee *et al.*, 2013). Les rotavirus sont responsables d'une gastro-entérite pouvant se révéler grave chez les jeunes enfants avec un tableau de diarrhée liquide intense accompagnée de fièvre et de douleurs abdominales. Chez les adultes, l'infection est plus discrète voire asymptomatique ; en effet, une immunité persistante s'installe après l'infection primaire (Schaechter *et al.*, 1999).

Il n'existe aucun traitement spécifique pour les rotavirus et le risque principal de cette infection pour les enfants est la déshydratation. Un vaccin est aujourd'hui disponible en France sous deux spécialités commercialisées. RotaRix® est un vaccin monovalent obtenu à partir d'une souche humaine atténuée. RotaTeq® est un vaccin pentavalent obtenu à partir d'un virus bovin recombinant exprimant des protéines de surface de rotavirus humains. Dans son avis de novembre 2013, le Haut Conseil de la Santé Publique (HCSP) recommande dorénavant la vaccination anti-rotavirus systématique pour les nourrissons âgés de moins de six mois (HCSP, 2013). Cette vaccination suit un schéma vaccinal à deux doses à 2 et 3 mois de vie pour le vaccin monovalent et à trois doses à 2, 3 et 4 mois de vie pour le vaccin pentavalent.

Voies de transmission :

La transmission se fait surtout de personne à personne. Une transmission par aérosols est possible. Les rotavirus peuvent survivre plusieurs heures sur les mains, jusqu'à neuf jours dans des aérosols et plusieurs dizaines de jours dans une eau à 20°C (afssa, 2007). Cependant, malgré cette résistance dans le milieu hydrique, à ce jour aucune épidémie liée à l'eau n'a été rapportée pour les rotavirus.

Epidémiologie :

Les rotavirus du groupe A sont responsables de 611 000 morts par an chez les jeunes enfants, surtout dans les pays en voie de développement (Parashar *et al.*, 2006). Au Royaume-Uni, le rotavirus est le virus entérique pathogène le plus souvent identifié dans les cas de gastro-entérite chez les enfants de moins de quatre ans (FSA, 2000). Ces virus sont essentiellement retrouvés en période hivernale.

Détection :

Chez l'homme, le diagnostic se fait par détection des antigènes viraux dans les selles par test ELISA, agglutination au latex ou encore par immunochromatographie. La recherche du génome viral par RT-PCR dans les selles peut également être réalisée lors d'investigations épidémiologiques. La détection dans l'environnement et les aliments se fait par RT-PCR. Ces virus sont cultivables, notamment sur cellules MA-104 et CaCo-2 (afssa, 2007).

1.1.3- Les adénovirus

Les adénovirus appartiennent à la famille des *Adenoviridae*, au genre *Mastadenovirus* pour les virus ayant pour hôte un mammifère (Ishibashi et Yasue, 1984). Ce sont des virus non enveloppés avec une capsidie icosaédrique de 80 à 110 nm de diamètre. Leur génome est composé d'un ADN double brin linéaire de 26-45 kilo paires de bases (**figure 7**) (Russel, 2000). Sept sous-groupes ou espèces nommés A à G et 52 sérotypes sont identifiés pour les adénovirus humains (Ghebremedhin, 2014).

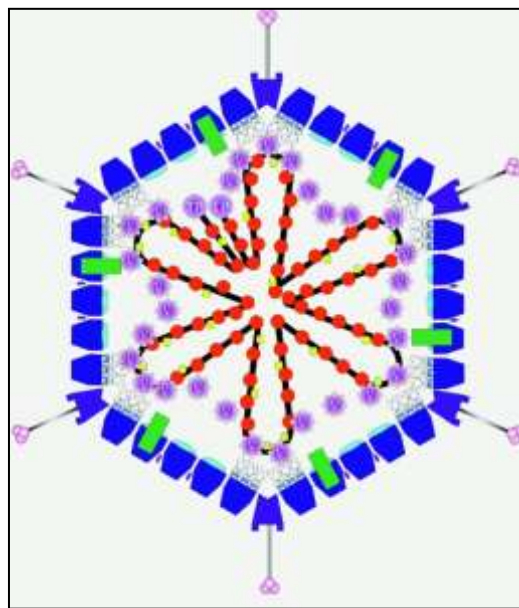


Figure 7 : Structure d'un adénovirus (Russel, 2000)

Signes cliniques :

La pathologie dépend du sérotype et de l'espèce, le **tableau II** présente une classification des différents sérotypes et le site d'infection. La plupart des adénovirus infectent le tractus respiratoire supérieur et se disséminent par voie aérienne. C'est le cas notamment des adénovirus des espèces B, C et E. Ils sont responsables d'infections respiratoires avec congestion nasale, toux, frissons, fièvre. Ils peuvent aussi provoquer des pharyngo-conjonctivites, des conjonctivites et des kérato-conjonctivites épidémiques (Schaechter *et al.*, 1999). Ces espèces B, C et E sont responsables de 5 à 10% des maladies respiratoires et des conjonctivites infantiles (Ganesh et Lin, 2013). Les sérotypes 4 et 7 qui appartiennent

respectivement aux espèces E et B ont été associés à des épidémies d'infections respiratoires aiguës chez de jeunes recrues militaires avec jusqu'à 80% des personnes touchées (Singh, 2014). Les épidémies liées à une exposition en piscine ou autre eau récréative contaminée sont le plus souvent dues au contact de l'œil avec l'eau contaminée et au partage de serviettes ou de lunettes (Papapetropoulou et Vantarakis, 1998 ; Crabtree *et al.*, 1997). Le sérotype 11 qui appartient à l'espèce B provoque des atteintes respiratoires et oculaires, mais aussi des cystites hémorragiques qui sont spontanément résolutive chez les immunocompétents, en revanche cette infection peut se révéler grave chez les immunodéprimés (Numazaki *et al.*, 1973).

Les sérotypes 40 et 41 (groupe F) sont responsables de gastro-entérites et vont plus particulièrement nous intéresser. L'infection est asymptomatique chez les adultes en bonne santé, mais des signes cliniques peuvent apparaître chez les personnes âgées, les enfants et les personnes immunodéprimées (Dupuis *et al.*, 1995). L'incubation varie entre 3 et 10 jours et les signes cliniques sont modérés avec présence de nausées, vomissements et diarrhée aqueuse. Les vomissements sont fréquents et surtout présents au début des symptômes. Des signes respiratoires apparaissent dans 20% des cas. La guérison est spontanée en 10 à 12 jours (afssa, 2007). L'excrétion du virus dans les selles a lieu pendant toute la période des signes cliniques et se poursuit après la guérison.

Tableau II: Classification des sérotypes des adénovirus humains (Cupelli et Stehle, 2011)

Espèce	Sérotype	Site d'infection
A	12, 18, 31	Tractus gastro-intestinal,
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50	Œil, tractus respiratoire, tractus urinaire
C	1, 2, 5, 6	Tractus respiratoire
D	8, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22, 30, 32, 33, 36, 39, 42, 49, 51	Œil, tractus gastro-intestinal
E	4	Tractus respiratoire, œil
F	40, 41	Tractus gastro-intestinal

La transmission des adénovirus se fait par la voie féco-orale, orale-orale ou encore main-œil. Même les souches responsables d'infections respiratoires ou de kérato-conjonctivites peuvent être retrouvées dans les selles (Ghebremedhin, 2014).

Epidémiologie :

Les sérotypes 40 et 41 sont les agents de 5 à 20% des gastro-entérites chez les enfants (Haramoto *et al.*, 2010). Au Royaume-Uni, les infections à adénovirus ont surtout lieu chez les enfants de moins de cinq ans et ils représentent 12% des virus identifiés lors d'une infection intestinale (FSA, 2000). Ils sont responsables de 5 à 20% des admissions à l'hôpital aux Etats-Unis pour diarrhée, surtout chez les enfants de moins de deux ans (Uhnoo *et al.*, 1984 ; Kotloff *et al.*, 1989). Les infections à adénovirus touchent surtout les enfants car les adultes seraient immunisés ; en effet, plus de 90% de la population mondiale adulte posséderait des anticorps pour un ou plusieurs sérotypes d'adénovirus (Fong *et al.*, 2010). La

répartition des adénovirus est mondiale, des épidémies et des cas sporadiques ont lieu tout au long de l'année sans période de flambée précise (afssa, 2007).

Détection :

Le diagnostic biologique se fait par recherche des antigènes spécifiques ou par PCR. Les adénovirus 40 et 41 se multiplient sur cellules HEK 293 (afssa, 2007), cependant leur culture est beaucoup plus difficile que celle des autres sérotypes. Les techniques de biologie moléculaire ont un intérêt surtout épidémiologique et pour la recherche de virus dans l'eau et les aliments (Haramoto *et al.*, 2010).

Les adénovirus sont fréquemment retrouvés dans les eaux polluées par des matières fécales et dans les coquillages (Pina *et al.*, 1998 ; Papapetropoulou et Vantarakis, 1998 ; Chapron *et al.*, 2000). Aux Etats-Unis, l'agence de protection de l'environnement (US E.P.A.) a inclus les adénovirus dans la liste des agents contaminants des eaux de distribution (Drinking Water Contaminant Candidate List ou CCL).

1.1.4- Les astrovirus

Les astrovirus sont des particules icosaédriques de 28 nm de diamètre qui doivent leur nom à leur forme d'étoile à 5 ou 6 branches (**figure 8**) qui peut s'observer en microscopie électronique (**figure 1, page 11**). Ces virus ont un génome à ARN monocaténaire de polarité positive de 6 à 7 kilo bases (Ganesh et Lin, 2013). Ils sont les seuls membres de la famille *des Astroviridae*, 8 sérotypes d'astrovirus humains sont décrits actuellement.

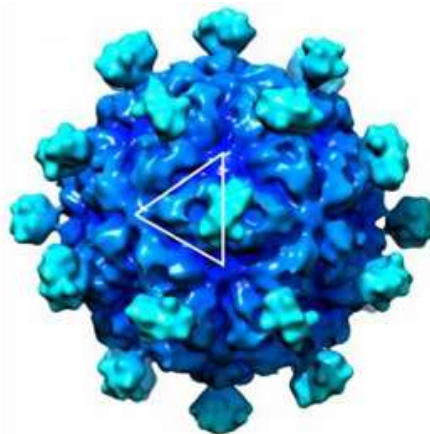


Figure 8 : Structure d'un astrovirus (Dong *et al.*, 2011)

Signes cliniques :

L'incubation moyenne est de 4,5 jours, avec 75% des cas symptomatiques déclarés après 5,3 jours (Lee *et al.*, 2013). Les symptômes sont ceux d'une gastro-entérite avec un tableau de diarrhée aqueuse prédominant, associé ou non à d'autres symptômes digestifs comme des douleurs abdominales, des nausées et des vomissements. Les vomissements sont

moins fréquents lors d'infections à astrovirus que pour les infections à rotavirus ou calicivirus (Bennett *et al.*, 2005). Le risque de déshydratation et d'hospitalisation semble moins important que pour les rotavirus (Dennehy *et al.*, 2001). Les symptômes durent en moyenne deux à trois jours.

Epidémiologie :

L'homme est l'unique réservoir des astrovirus humains. Leur transmission suit la voie féco-orale. L'excrétion virale chez les personnes infectées peut précéder les symptômes et se poursuivre plusieurs jours après la fin de la diarrhée. La contamination de personne à personne concerne surtout les crèches et maisons de retraite.

Les astrovirus comptent pour 5% des admissions à l'hôpital aux Etats-Unis pour diarrhée, ces hospitalisations concernant presque exclusivement des enfants (Ellis *et al.*, 1984). Au Royaume-Uni, les astrovirus représenteraient 12% des virus identifiés avec une incidence de 125 pour 100 000 personnes-année pour les enfants de moins de 1 an et de 550 pour 100 000 personnes-année pour les enfants de 2 à 4 ans (FSA, 2000). Les astrovirus représentent également une étiologie fréquente de diarrhée chez les personnes immunodéprimées et les personnes âgées (afssa, 2007).

Les sérotypes 1 et 2 sont rapidement acquis pendant l'enfance. Une étude réalisée au Royaume-Uni montre que 50% des enfants de 7 ans possèdent des anticorps contre le sérotype 1 et ce chiffre passe à 75% à l'âge de 10 ans (Lee et Kurtz, 1982 ; Kurtz et Lee, 1984). Les adultes, bien qu'immunisés contre les sérotypes 1 et 2, peuvent être infectés par les sérotypes 3 à 8. Dans ce cas, les anticorps acquis pendant l'enfance ne permettent pas de prévenir les signes cliniques. Ainsi au Japon, 1500 enfants et professeurs ont été infectés par des astrovirus de type 4 lors d'une épidémie liée à la nourriture et à l'eau (Oishi *et al.*, 1994).

1.1.5- Le virus Aichi

Jusqu'en 1993 et l'identification du virus Aichi, la famille des *Picornaviridae* n'était pas associée à des épidémies de gastro-entérites. La première épidémie de gastro-entérites impliquant le virus Aichi a eu lieu au Japon en 1989, elle était liée à la consommation d'huîtres (Yamashita *et al.*, 1993). Le virus identifié lors de cette épidémie est capable d'infecter *in vitro* des cellules Vero et possède une organisation de son génome typique des *Picornaviridae* (Yamashita *et al.*, 1998). Le virus Aichi a été classé dans un nouveau genre des *Picornaviridae*, le genre *Kobuvirus*. Le virus Aichi possède une capsidie icosaédrique de 28 nm de diamètre, son génome est composé d'un ARN simple brin de polarité positive de 7 à 9 kilo bases (Yamashita *et al.*, 1991).

Le virus Aichi a été identifié dans des eaux usées et des échantillons d'eaux de surface aux Pays-Bas prélevés entre 1987 et 2000 et entre 2009 et 2012. Le virus était donc déjà en circulation au sein de la population humaine avant sa première détection (Lodder *et al.*, 2013).

Ce virus représenterait moins de 3% des cas de gastro-entérites et il est souvent associé à d'autres pathogènes entériques. Seules quelques études se sont intéressées à la détection du virus Aichi chez l'homme, des données supplémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre sa pathogénicité et son mode de transmission (Reuter *et al.*, 2011).

1.2- Les virus des hépatites

A ce jour six types de virus d'hépatites ont été identifiés : A, B, C, D, E et G. Seuls les virus de l'hépatite A et de l'hépatite E sont transmissibles par la voie féco-orale et par conséquent sont liés à une transmission par l'eau, ce sont des virus d'hépatites entériques (Ganesh et Lin, 2013). Le virus de l'hépatite A représente environ 50% des cas d'hépatite dans le monde, il est relié à de sévères épidémies liées à l'eau (Pintó et Saiz, 2007). L'hépatite E, bien que moins fréquente que l'hépatite A, présente un taux de mortalité plus élevé, surtout chez la femme enceinte. Le virus de l'hépatite E est surtout responsable d'infections dans les pays en voie de développement, mais peut être transmis par les animaux, surtout le porc, dans les pays industrialisés (Purcell et Emerson, 2008).

1.2.1- Virus de l'hépatite A

Le virus de l'hépatite A, ou VHA, appartient à la famille des *Picornaviridae*, comme le virus Aichi ou le genre *Enterovirus*. Il a d'ailleurs initialement été classé dans ce genre, mais des analyses poussées ont montré des propriétés uniques en relation avec sa structure génétique et sa procédure de réplication. Le VHA a donc été classé dans le genre *Hepatovirus* dont il est l'unique membre (Cuthbert, 2001). Ce virus possède une capsidie icosaédrique de 25 à 28 nm de diamètre et un génome à ARN monocaténaire de polarité positive de 7 à 9 kilo bases (Ganesh et Lin, 2013). Trois génotypes (I, II et III) sont décrits actuellement chez l'homme. Ces virus peuvent infecter les hommes mais aussi d'autres primates comme par exemple le chimpanzé. Le foie est le site connu de réplication et de libération des particules virales.

Signes cliniques :

L'hépatite A est une affection aigüe du foie, généralement bénigne et d'évolution favorable sans séquelle dans 95% des cas (afssa, 2007). L'incubation est d'environ un mois. Chez les enfants de moins de cinq ans, l'infection est asymptomatique dans 90% des cas. En revanche, 70 à 80% des adultes infectés sont symptomatiques. La moitié des formes symptomatiques sont caractérisées par une forme ictérique. Les autres signes cliniques comprennent une asthénie, des céphalées, l'apparition de fièvre, des nausées et vomissements et des douleurs abdominales. La mortalité globale liée au virus de l'hépatite A est très faible allant de 0,2 à 0,4%, cependant ce chiffre devient supérieur à 2% pour les personnes de plus de 40 ans (afssa, 2007). L'hépatite A n'évolue jamais vers la chronicité. Quelques formes graves existent, elles sont fulminantes, surtout chez les adultes atteints d'une hépatopathie chronique. Elles sont caractérisées par une hépatite aigüe couplée à une encéphalopathie métabolique et leur taux de létalité est de 70 à 90%.

Voies de transmission :

L'excrétion du VHA dans les selles est très importante, allant de 10^5 à 10^{11} particules virales par gramme de selles (Koopmans *et al.*, 2002), sur une durée de 15 jours à un mois (Cuthbert, 2001). Cette excrétion virale peut être prolongée chez des patients immunodéprimés ou chez les nouveaux-nés prématurés. La contamination se fait par contact

direct ou par ingestion d'aliments ou d'eau contaminée par des déjections (OMS, 2000). Il existe également un faible risque de transmission parentérale. En effet, une virémie se produit chez les sujets infectés une à deux semaines avant l'augmentation des ALAT (Alanine aminotransférases), et celle-ci peut se poursuivre pendant plusieurs mois (Cuthbert, 2001). Les populations à risque sont les voyageurs dans les zones endémiques, les enfants en collectivité, les employés des égouts, le personnel soignant, ... L'exportation de nourriture qui ne supporte pas la stérilisation depuis des pays avec une forte endémie vers des pays avec un faible taux d'infection représente aussi une potentielle source d'infections (Cuthbert, 2001).

Epidémiologie :

La **figure 9** présente une estimation de la prévalence du virus de l'hépatite A à travers le monde en 2005. La prévalence du VHA est inférieure à 50% à 30 ans aux Etats-Unis, en Australie et en Europe, elle est donc considérée comme très faible. Dans les pays en voie de développement, les jeunes enfants sont exposés très tôt au VHA. En Afrique, Asie et Amérique latine le taux de prévalence est proche de 100%. Mais les progrès en matière d'hygiène tendent à diminuer l'incidence des infections.

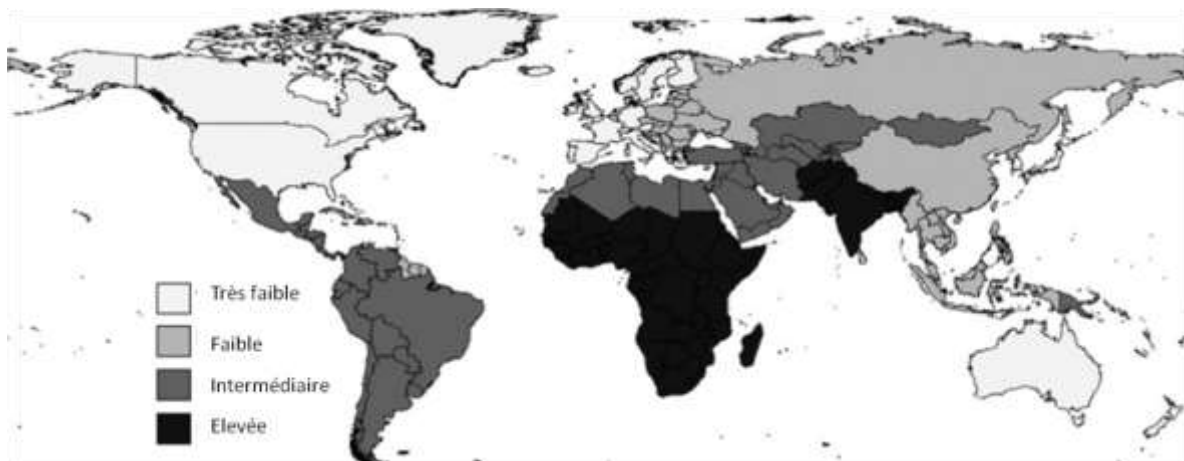


Figure 9 : Estimation de la prévalence du virus de l'hépatite A en 2005 (Jacobsen et Wiersma, 2010)

Prévalence élevée : immunité $\geq 90\%$ à 10 ans, prévalence intermédiaire : immunité $\geq 50\%$ à 15 ans, prévalence faible : immunité $\geq 50\%$ à 30 ans, prévalence très faible : immunité $< 50\%$ à 30 ans

Diagnostic et prévention :

Le diagnostic biologique est réalisé par détection des immunoglobulines spécifiques de type M par méthode ELISA. Le virus de l'hépatite A est difficilement cultivable notamment à partir d'isolats primaires. La lignée cellulaire FRhK-4 est utilisée pour la culture du VHA qui est longue car l'obtention d'un effet cytopathique nécessite 14 à 21 jours d'incubation.

Il n'existe pas de traitement curatif spécifique au VHA. En cas d'hépatite fulminante, une transplantation hépatique en urgence peut permettre la guérison.

La prophylaxie repose sur les mesures d'hygiène. Un vaccin inactivé administré par voie parentérale existe sous les noms commerciaux Havrix® et Avaxim®. Il est recommandé pour les enfants et les jeunes accueillis dans des établissements et services spécialisés et ceux nés de familles originaires d'un pays de haute endémicité. La vaccination est également recommandée pour les adultes vivant en situation d'hygiène précaire, ceux dont l'activité sexuelle les expose au risque et les personnes ayant une maladie hépatique chronique telle que la mucoviscidose ou une pathologie hépatobiliaire chronique pouvant évoluer vers une hépatopathie chronique. En présence d'un cas avéré d'hépatite A, la vaccination de l'entourage est aussi recommandée. Au niveau professionnel, la vaccination est recommandée pour les personnels de crèches, les assistantes maternelles, les personnels des structures d'accueil pour personnes handicapées, les professionnels impliqués dans la préparation alimentaire en restauration collective et les personnes chargées du traitement des eaux usées et des égouts (Calendrier vaccinal, 2013).

1.2.2- Virus de l'hépatite E

Le virus de l'hépatite E (VHE) appartient à la famille des *Hepeviridae*, il est le seul membre du genre *Hepevirus* (Purcell et Emerson, 2008). Les particules du VHE mesurent 30 nm de diamètre et contiennent un génome à ARN simple brin de polarité positive de 7 kilo bases. La **figure 10** schématise la structure du VHE et la **figure 11** correspond à des particules agrégées observées en microscopie électronique. Le VHE a été identifié en 1990 par des méthodes moléculaires (Reyes *et al.*, 1990). Auparavant, seul le VHA était reconnu comme ayant une transmission hydrique et la maladie liée au VHE était dénommée hépatite non-A non-B (Khuroo, 1980 ; Wong *et al.*, 1980). La découverte du virus de l'hépatite E s'est faite en appliquant des anticorps anti-VHA sur des sera de patients obtenus suite à une épidémie d'hépatites liées à l'eau en Inde.

Le VHE a tout d'abord été classé dans la famille des *Caliciviridae*. Toutefois, son génome ressemble de très près à celui du virus de la rubéole. Il est maintenant classé comme membre unique du genre *Hepevirus* qui est lui-même le seul genre de la famille des *Hepeviridae*. Bien que ce virus soit isolé aussi bien chez l'humain que chez certains animaux, il n'existe qu'un seul sérotype composé de quatre génotypes : 1 ou Burma qui est retrouvé essentiellement en Asie et Afrique, 2 ou Mexico retrouvé au Mexique, au Nigéria et au Chad, 3 ou USA qui est distribué dans les pays industrialisés et enfin 4 ou China qui est retrouvé exclusivement en Asie (Song *et al.*, 2014).

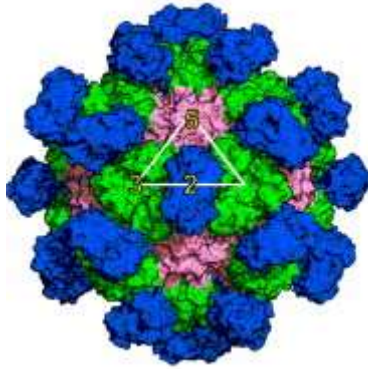


Figure 10 : Structure d'une particule du virus de l'hépatite E (Mori et Matsuura, 2011)

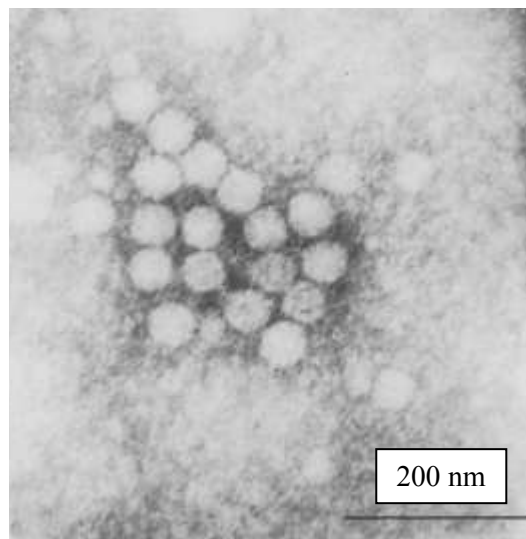


Figure 11 : Virus de l'hépatite E agrégés (souche A87) observés en microscopie électronique (Huang *et al.*, 1992)

Signes cliniques :

L'hépatite E est une infection aiguë, habituellement bénigne. L'incubation dure en moyenne 40 jours. Les formes ictériques sont observées dans 50% des cas et plus fréquemment chez l'adulte que l'enfant. Comme pour le VHA, il n'est pas observé d'hépatite chronique. Une forme d'hépatite fulminante existe, mais elle est rare et touche seulement 1% des personnes infectées. En revanche, le nombre d'hépatites fulminantes passe à 30% chez la femme enceinte (Purcell et Emerson, 2008). Le risque d'hépatite fulminante est également plus élevé chez les personnes avec une hépatopathie préexistante.

Voies de transmission :

Le virus de l'hépatite E se transmet via la voie féco-orale, surtout indirecte par l'eau contaminée (OMS, 2013b). L'excrétion du virus dans les selles des personnes infectées commence quatre à huit jours avant la phase ictérique et se poursuit jusqu'à 50 jours après les symptômes. Cette longue excrétion virale participe à la diffusion du virus notamment dans l'eau. Une transmission par le sang est théoriquement possible car une virémie de quelques jours apparaît suite à l'infection. Le VHE n'infecte pas que l'homme, de nombreuses espèces

animales comme le porc, le poulet, le rat, le chien, le cerf... peuvent être infectées et ce virus peut donc être zoonotique (Song *et al.*, 2014). Des cas de contamination par consommation de viande de porc contaminée ont été décrits au Japon (Yazaki *et al.*, 2003) mais aussi en France après la consommation de saucisses de foie de porc (figatelles) crues (Berto *et al.*, 2013).

Epidémiologie :

Le virus de l'hépatite E est l'une des principales causes d'hépatite clinique chez les adultes en Asie, au Moyen-Orient et en Afrique. Cette infection est rare dans les pays industrialisés (Purcell et Emerson, 2008). 20 millions d'infections par le VHE, plus de trois millions de cas d'hépatite aigüe et 57 000 décès sont dénombrés chaque année dans le monde. Le VHE sévit partout dans le monde mais sa prévalence est plus élevée en Asie de l'Est et du Sud (OMS, 2013b). Les personnes à risque d'infection sont les voyageurs en zone endémique. Chez la femme enceinte, une transmission au fœtus est possible, elle entraîne le plus souvent la mort *in utero* (Khuroo *et al.*, 1983).

Diagnostic et prévention :

Devant un manque de sensibilité des tests sérologiques, le diagnostic se fait par recherche du génome viral par RT-PCR. Il n'existe aucun traitement spécifique de cette infection. Un vaccin, le rHEV, a été développé et testé sur des volontaires de l'armée américaine et de l'armée du Népal (OMS, 2013b). Les effets indésirables observés étaient minimes. L'efficacité de ce vaccin est de 95,5% après injection de trois doses et de 87% après seulement deux doses (Safary, 2001 ; Shrestha *et al.*, 2007). Un autre vaccin, HEV-239, a fait l'objet d'un essai clinique de phase III en Chine. Sur une cohorte de 112 604 patients et avec un suivi sur 13 mois, aucun cas d'hépatite E n'a été rapporté dans le groupe vacciné contre 15 cas pour le groupe placebo. Ce vaccin est actuellement autorisé sur le marché chinois. Bien que ces deux vaccins aient fait preuve de leur efficacité et de leur innocuité, aucun n'est validé en Europe actuellement (Abravanel *et al.*, 2013).

1.3- Virus entériques responsables d'autres pathologies

Nous étudierons ici les virus entériques pathogènes qui ne provoquent ni gastro-entérite, ni hépatite. Ces virus peuvent être responsables de diverses pathologies allant d'infections respiratoires à des atteintes neuronales. Nous nous intéresserons tout d'abord aux entérovirus et aux paréchovirus de la famille des *Picornaviridae*, puis aux réovirus.

1.3.1- Les entérovirus et paréchovirus

La famille des *Picornaviridae* regroupe, comme nous l'avons vu avec le virus de l'hépatite A, des virus non enveloppés, avec une capsidie icosaédrique d'environ 28 nm de diamètre et un génome composé d'un ARN simple brin de polarité positive de 7 à 9 kilo bases (Tapparel *et al.*, 2013). Leur nom vient de leur taille (pico) et de leur génome (RNA). En 2012, le comité international de la taxonomie des virus (ICTV) reconnaît 28 espèces distribuées dans 12 genres au sein de cette famille (Knowles *et al.*, 2012). La famille des *Picornaviridae* inclut de

nombreux virus entériques responsables de pathologies diverses chez l'Homme appartenant aux genres *Enterovirus* et *Parechovirus*.

1.3.1.1- Le genre *Entérovirus*

Ce genre regroupe actuellement 103 types d'entérovirus humains. Si 95% des infections à entérovirus sont asymptomatiques, ils sont responsables de 20 syndromes cliniques très différents parmi lesquels la poliomyélite, des encéphalites, des méningites aseptiques, des myocardites et péricardites ainsi que des maladies respiratoires (Tapparel *et al.*, 2013). Les entérovirus sont responsables de plus de 90% des méningites virales (Irani, 2008). Un même virus peut causer des infections différentes selon les personnes. Bien que le tractus digestif soit le lieu privilégié de la réplication virale des entérovirus, les syndromes entériques tels que vomissements et diarrhée sont rares. De nombreux auteurs font état d'une association possible entre une infection à entérovirus et le développement d'un diabète de type 1 (Jaïdane et Hober, 2008), cependant cette question est encore soumise à controverse (Tapparel *et al.*, 2013).

Nous allons détailler les signes cliniques dus aux principaux entérovirus :

- **Poliovirus** : ce virus est responsable de la poliomyélite. C'est un virus lytique, c'est-à-dire que sa multiplication s'accompagne de la lyse de la cellule hôte. L'incubation dure en moyenne entre deux et cinq jours. La propagation du virus se fait du tractus intestinal vers le système nerveux central. La multiplication virale a lieu dans les neurones de la substance grise du cerveau et la moelle épinière. L'infection provoque une paralysie flasque caractéristique. Dans les formes les plus sévères on peut voir apparaître une poliomyélite bulbaire provoquant une paralysie des muscles respiratoires qui est à l'origine des « poumons d'acier », ancêtres des respirateurs modernes (Schaechter *et al.*, 1999).

- **Coxsackievirus A et B** : ces virus peuvent entraîner une méningite aseptique, ainsi que des paralysies, de la fièvre et des infections respiratoires (Tapparel *et al.*, 2013). Les coxsackievirus du groupe A peuvent également causer une pathologie appelée herpangine caractérisée par une fièvre d'apparition soudaine et la présence de vésicules et d'ulcères sur les amygdales et le palais. Les virus du groupe B sont impliqués dans des myocardites et péricardites.

- **Entérovirus A71** : ce virus est responsable du syndrome pied-main-bouche chez les enfants en particulier. Le premier isolement de ce virus s'est fait en 1969 au Etats-Unis et il représente un problème majeur de santé publique en Asie (Solomon *et al.*, 2010). En Chine, il a été responsable de plus de 1 600 000 cas et de 500 morts en 2011 (Shang *et al.*, 2013). En effet, dans un faible nombre de cas, l'infection peut évoluer vers des complications neurologiques et systémiques comme une méningite ou une encéphalite pouvant être fatale.

- **Echovirus** (Enteric Cytopathogenic Human Orphan Virus) : ces virus sont généralement moins infectieux que les autres entérovirus (Fong et Lipp, 2005). L'échovirus 16 est responsable de l'exanthème de Boston. L'échovirus 9 est responsable de la maladie de Crawford associant fièvre, vomissements, douleurs abdominales, céphalées et éruption rubéoliforme. Les autres échovirus peuvent provoquer des éruptions cutanées évoquant la

rubéole, des méningites aseptiques, des paralysies, des péricardites et myocardites, des diarrhées et vomissements ou encore des maladies respiratoires.

La transmission de ces virus suit la voie féco-orale, aussi bien directe qu'indirecte. L'eau et les aliments sont impliqués dans la transmission des entérovirus, notamment les framboises, les légumes et les coquillages bivalves filtreurs. Une surveillance étroite de ces derniers est réalisée par l'IFREMER (Institut Français de Recherche pour l'Exploitation de la Mer) (afssa, 2007).

Diagnostic et prévention :

Le diagnostic d'une infection à entérovirus peut se faire par culture cellulaire ou par détection du génome par RT-PCR. Ces virus sont pour la plupart cultivables sur des cultures de cellules HeLa ou Vero, hormis quelques entérovirus du génogroupe C.

La vaccination antipoliomyélitique est obligatoire en France depuis 1964. L'introduction de la vaccination contre la poliomyélite a eu des conséquences très importantes au niveau mondial sur la morbidité et la mortalité liées à cette maladie.

1.3.1.2- Le genre *Paréchovirus*

Les paréchovirus sont des virus à ARN de 27 nm de diamètre, leur capsid présente une forme plus aplatie que celle des entérovirus. Les paréchovirus ont été isolés pour la première fois en 1956 suite à une épidémie de diarrhée estivale (Wigand et Sabin, 1961). Ces virus initialement connus sous le nom d'échovirus 22 et 23 ont été nommés paréchovirus 1 et 2 en 1999 lorsque le genre *Parechovirus* a été créé (Legay *et al.*, 2003). Le nombre de génotypes est actuellement de huit (Harvala et Simmonds, 2009).

La plupart des infections à paréchovirus sont asymptomatiques, les formes symptomatiques sont des infections respiratoires, des gastro-entérites et quelques rares cas de paralysie flasque, de méningites aseptiques ou encore d'encéphalites (Legay *et al.*, 2003). Environ 30% des cas d'infection à paréchovirus 1 identifiés concernent des enfants présentant une gastro-entérite (Harvala et Simmonds, 2009).

Les paréchovirus sont présents dans toutes les régions du monde. Une prévalence élevée des infections durant la petite enfance est notée. Ainsi, plus de 60% des infections à paréchovirus surviennent avant l'âge de un an, contre 17% pour les entérovirus dans les pays en voie de développement (Grist *et al.*, 1978).

Le diagnostic peut se faire par la détection directe du virus par culture cellulaire ou encore par la recherche de génome viral par RT-PCR.

1.3.2- Les réovirus

Les réovirus appartiennent à la famille des *Reoviridae* et au genre *Orthoreovirus*. Ils sont constitués d'un ARN double brin segmenté de 18 à 30 kilo paires de base et d'une capsidie icosaédrique de 60 à 80 nm de diamètre. Ces virus sont cultivables sur cellules BGM (cellules de rein de singe vert Buffalo). L'acronyme réovirus a été proposé en 1959 par Sabin (Sabin, 1959) pour Respiratory Enteric Orphan Virus, il souligne leur origine intestinale et respiratoire et le fait qu'ils ne soient reliés à aucune pathologie clinique bien définie. Ils ont été isolés des voies respiratoires et digestives de personnes présentant un symptôme respiratoire ou entérique sans gravité, mais aussi chez des patients présentant des maladies du système nerveux central telles que des méningites, des encéphalites (Joske *et al.*, 1964 ; Johansson *et al.*, 1996; Tyler *et al.*, 2004) et des encéphalomyélites (Ouattara *et al.*, 2008). Aujourd'hui encore, il n'y a aucune certitude sur le fait qu'ils soient responsables de pathologies cliniques bien définies chez l'homme et aucune épidémie à réovirus n'a été rapportée à ce jour.

1.4- Autres virus potentiellement transmissibles par voie hydrique

Des virus nus appartenant notamment à deux familles : *Picornaviridae* et *Parvoviridae* sont considérés comme potentiellement transmissibles par voie hydrique du fait de leur présence dans les selles de personnes infectées, mais également dans le milieu hydrique.

1.4.1- *Picornaviridae*

Les rhinovirus humains, appartenant au genre *Enterovirus*, sont habituellement transmis de personne à personne par les aérosols, mais sont également excrétés dans les selles d'où une contamination de l'eau et une potentielle transmission par voie hydrique. Ils sont mis en évidence dans 9% des selles d'enfants ne présentant aucun symptômes et ils sont également détectés dans des échantillons de selles d'enfants avec des symptômes de gastro-entérite et une absence de signes respiratoires (Lau *et al.*, 2012 ; Honkanen *et al.*, 2013). Bien que de grandes quantités de génome soient retrouvées dans les selles des enfants et personnes âgées infectées, il n'existe actuellement aucune preuve d'une répllication virale entérique ni de son association avec des symptômes entériques (Harvala *et al.*, 2012).

Le genre *Cardiovirus* regroupe des virus potentiellement transmissibles par voie hydrique. Ces virus ont été isolés chez des patients présentant des gastro-entérites, des symptômes respiratoires, des paralysies flasques ou encore des inflammations du cervelet, mais le lien de causalité entre ces virus et les symptômes observés doit encore être démontré (Himeda et Ohara, 2012 ; Nielsen *et al.*, 2012 ; Tapparel *et al.*, 2013). Le virus Saffold (SAFV), du prénom de la personne qui l'a isolé, a été mis en évidence pour la première fois en 2007 par culture cellulaire à partir d'un échantillon de selles collecté en 1981 chez un enfant présentant une fièvre d'origine inconnue (Jones *et al.*, 2007). Aux Etats-Unis, 91% de la population adulte est porteuse d'anticorps anti SAFV-2 (Chiu *et al.*, 2010). La plupart des infections à cardiovirus sont probablement asymptomatiques.

Les virus du genre *Cosavirus*, pour common stool-associated picornavirus, ont été identifiés pour la première fois en 2008 dans les selles d'un enfant d'Asie du Sud atteint d'une paralysie flasque aigüe non due au poliovirus (Kapoor *et al.*, 2008). Ces virus ont depuis été identifiés chez des enfants souffrant de diarrhée aigüe en Australie (Holtz *et al.*, 2008) et chez des enfants présentant, ou non, une diarrhée en Chine et au Brésil (Dai *et al.*, 2010 ; Stöcker *et al.*, 2012). Ces virus ont été retrouvés dans les eaux usées aux Etats-Unis (Blinkova *et al.*, 2009) d'où une potentielle transmission par le milieu hydrique.

Les virus du genre *Salivirus* ont été identifiés pour la première fois en 2009 lors d'un séquençage à partir de selles d'enfants atteints de gastro-entérite aux Etats-Unis (Greninger *et al.*, 2009). Ces virus ont également été isolés dans les selles d'enfants atteints de paralysie flasque au Nigéria, dans les selles d'enfants atteints de diarrhée en Australie et dans les eaux usées en Espagne (Tapparel *et al.*, 2013).

1.4.2- Parvoviridae

Les virus des genres *Bocavirus* et *Parvovirus* sont des petits virus, « parvum » en latin signifiant petit, de 18 à 26 nm de diamètre. Leur génome est composé d'un simple brin d'ADN.

Les bocavirus ont été identifiés pour la première fois en 2005 en Suède, chez des enfants atteints de maladies respiratoires aigües (Allander *et al.*, 2005), puis chez des enfants présentant des atteintes respiratoires (Foulongne *et al.*, 2006 ; Kaplan *et al.*, 2006 ; Smuts et Hardie, 2006 ; Kesebir *et al.*, 2006 ; Sloots *et al.*, 2006 ; Ma *et al.*, 2006 ; Bastien *et al.*, 2007) ou une gastro-entérite (Levicán *et al.*, 2013). Ces virus ont également été détectés dans 40,8% des 120 échantillons provenant de deux rivières en Allemagne (Hamza *et al.*, 2009). Ces informations doivent faire évoquer une possible transmission par l'eau.

Les parvovirus ont quant à eux été associés avec des épidémies de gastro-entérites dans des écoles au Royaume-Uni et en Australie. Un parvovirus a aussi été identifié lors d'une épidémie au Royaume-Uni lié à la consommation de coquillages contaminés, ce virus a ainsi été nommé le « cockle agent » (Paver *et al.*, 1973 ; Christopher *et al.*, 1978 ; Appleton, 1987).

1.4.3- Autres virus

D'autres virus nus sont retrouvés dans le milieu hydrique et seraient potentiellement transmissibles par cette voie, il s'agit notamment des circovirus et des polyomavirus.

Les circovirus, de la famille des *Anelloviridae*, mesurent environ 30 nm de diamètre et possède un génome à ADN circulaire (Biagini, 2004). Le premier circovirus humain identifié est le virus Torque Teno ou virus TT (Nishizawa *et al.*, 1997), il a été retrouvé chez un patient présentant une hépatite post-transfusionnelle d'origine inconnue. Des circovirus ont ensuite été identifiés chez plusieurs patients sans pathologie apparente, incluant les donneurs de sang (Biagini *et al.*, 1998 ; Charlton *et al.*, 1998). Ces virus ont été détectés dans les eaux usées aux Etats-Unis (Blinkova *et al.*, 2009). Leur transmission peut se faire par voie parentérale, via des gouttelettes de salive mais aussi par voie féco-orale (Biagini, 2004). Le rôle de ces virus dans diverses pathologies est encore mal connu et nécessite des investigations.

Les polyomavirus de la famille des *Polyomaviridae* (Moret et Ingrand, 1997) sont des petits virus de 33 à 43 nm de diamètre possédant un génome à ADN double brin superenroulé très résistant à la chaleur. Ces virus sont impliqués dans des pathologies comme la leucoencéphalite multifocale progressive (LEMP), des néphropathies sévères et des cystites hémorragiques chez les patients transplantés, mais aussi dans des cancers comme le carcinome à cellules de Merkel (Dalianis et Hirsch, 2013) ou encore le cancer du côlon (Enam *et al.*, 2002). Bien que leur transmission semble surtout aérienne, ces virus sont excrétés dans les urines et une transmission par l'eau semble possible. Les polyomavirus sont détectés dans les eaux usées du monde entier (Bofill-Mas *et al.*, 2000 ; Bofill-Mas et Girones, 2003 ; Bofill-Mas *et al.*, 2010). Des investigations complémentaires sont nécessaires afin de déterminer le mode de transmission et les risques liés à ces virus et à l'eau.

La présence dans les selles et/ou dans l'eau de certains virus zoonotiques, bien qu'ils soient enveloppés et considérés comme moins résistants aux conditions environnementales, pose la question de leur possible transmission par voie hydrique.

Le coronavirus responsable du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère ou SRAS-CoV, décrit pour la première fois en 2002, est un virus enveloppé. Sa transmission par voie féco-orale semble possible en raison du nombre important de particules virales excrétées dans les selles des personnes infectées (Chu *et al.*, 2005). Environ 40% des personnes atteintes ont au moins un épisode de diarrhée pendant la maladie et le virus est détecté dans les selles jusqu'à 10 semaines après l'épisode infectieux (Leung *et al.*, 2003). Mais la question se pose d'une simple excrétion digestive du virus ou de sa responsabilité dans les symptômes entériques.

Le virus de la grippe H5N1 infecte les oiseaux qui l'excrètent dans leurs selles. Bien qu'une transmission des oiseaux à l'homme via de l'eau contaminée semble possible, elle n'est toujours pas confirmée (Zhang *et al.*, 2006 ; Worobey, 2008). La contamination de l'homme pourrait se faire par l'ingestion d'eau contaminée, ou encore par contact conjonctival ou intranasal avec cette dernière. Cependant, le manque de données sur les cas confirmés d'infection à H5N1 empêche d'évaluer les facteurs de risque potentiels tels que le rôle de l'eau dans la transmission du virus (Van Kerkhove, 2013).

2- Les voies de contamination

La présence de virus entériques pathogènes dans le milieu hydrique peut entraîner une contamination de l'homme selon différentes voies d'exposition. La **figure 12** représente les différentes voies de contamination humaine liées à l'eau par les virus entériques pathogènes. La contamination peut se faire par ingestion d'eau de boisson ou lors de contact avec des eaux dites « récréatives » comme les piscines. Mais l'homme peut aussi se contaminer via l'ingestion d'aliments comme des fruits ou légumes contaminés soit lors de l'irrigation des cultures, soit au moment de leur préparation. De nombreuses épidémies virales liées à la nourriture sont ainsi relevées chaque année dont des infections alimentaires liées au norovirus (Widdowson *et al.*, 2005).

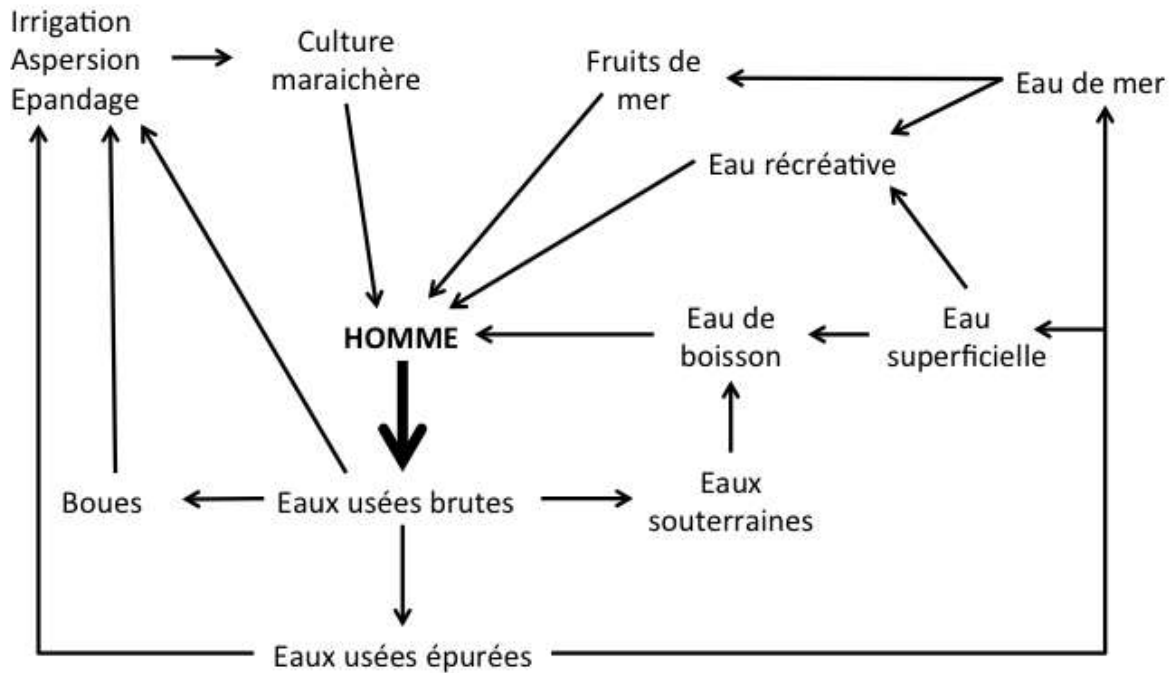


Figure 12 : Schéma du cycle de contamination virale du milieu hydrique (Schwartzbrod, 1991)

Les virus entériques sont retrouvés dans le milieu hydrique suite à leur excrétion par voie fécale à des concentrations élevées, pouvant atteindre 10^{11} particules virales par gramme de selles (Fong et Lipp, 2005). De plus, cette excrétion se poursuit souvent après la fin des symptômes. Le **tableau III** présente différents taux d'excrétion virale dans les selles en fonction du virus, ainsi que la durée moyenne d'excrétion.

Tableau III : Excrétion virale dans les selles (Schwarzbrod, 2000)

Virus	Durée moyenne d'excrétion	Concentration virale par gramme de selles
Rotavirus	10 jours	10^{10}
Norovirus et sapovirus	3 jours	$>10^6$
Astrovirus	12 jours	$>10^6$
Entérovirus	1 mois	10^3-10^6
Virus de l'hépatite A	3 semaines	10^9
Virus de l'hépatite E	2 semaines	10^9
Adénovirus	10 jours	$>10^6$

Il faut noter que la DI_{50} ou dose infectieuse qui provoque des symptômes dans 50% des cas est très faible pour les virus entériques. Ainsi, elle est de l'ordre de 10 particules pour les norovirus (Blanton *et al.*, 2006) et de cinq particules pour les rotavirus (Haas *et al.*, 1999).

Les particules virales sont excrétées dans les selles des personnes infectées, puis dans l'environnement suite au rejet des eaux usées traitées ou non et entraînent une contamination

des eaux récréatives, des eaux d'irrigation, voire des eaux destinées à la consommation. Le rejet d'effluents de stations d'épuration représente la première source de virus entériques pathogènes dans l'environnement (Okoh *et al.*, 2010). La présence de virus entériques dans le réseau de distribution ne peut être exclue en cas de défaillance du système de traitement de potabilisation ou du réseau de distribution. Une étude menée au Japon entre novembre 2003 et février 2004, s'est intéressée à la présence de génome de norovirus dans divers types d'eau (Ueki *et al.*, 2005). Les résultats montrent que 100% des eaux usées brutes (n=9), 89% des eaux usées traitées (n= 9) et 75% des eaux de rivière (n=8) sont positives en génome de norovirus.

La contamination humaine par les virus entériques pathogènes peut aussi être due à la consommation de coquillages, notamment les coquillages bivalves filtreurs. Ceux-ci concentrent les éléments présents dans l'eau de mer dont les particules virales lorsque l'eau est contaminée. Les coquillages concentrent les virus dans leurs tissus particulièrement au niveau de l'hépatopancréas. De nombreuses épidémies dues à la consommation de coquillages sont rapportées et documentées. Des épidémies de gastro-entérites à norovirus liées à la consommation d'huîtres sont ainsi décrites en France (Le Guyader *et al.*, 2006) ou au Japon. Dans ce pays, une étude a révélé un taux de contamination en génome de norovirus de 60% (n= 30) pour des huîtres (Ueki *et al.*, 2005). Mais la consommation de coquillages peut aussi être responsable d'épidémies d'hépatite A telle que celle décrite en Espagne en 2002 qui était liée à la consommation de palourdes (Sánchez *et al.*, 2002).

Aujourd'hui les infections virales liées à la consommation d'eau potable ne sont pas considérées comme un problème majeur de santé publique dans les pays développés. En revanche, la prévention des infections liées à des aliments contaminés est un challenge aussi bien dans les pays industrialisés que dans ceux en développement en raison du commerce mondial des aliments. Ainsi, en Pennsylvanie, une épidémie d'hépatite A liée à la consommation d'oignons verts en provenance du Mexique a été rapportée avec 601 cas et trois décès (Wheeler *et al.*, 2005). En France, une épidémie d'hépatite A a touché 59 personnes et était liée à la consommation de tomates semi-séchées importées de Turquie (Gallot *et al.*, 2011).

Ceci nous amène à nous intéresser plus particulièrement au problème de contamination lié à l'irrigation. Plusieurs études récentes se sont penchées sur le problème de l'irrigation des fruits et légumes par de l'eau contaminée et surtout sur la possibilité d'une entrée des virus dans la plante par les racines. Un virus internalisé dans la plante ne sera pas éliminé lors du nettoyage de celle-ci et ne sera pas détecté si l'analyse est limitée à la surface du végétal par les méthodes d'élution-concentration (cf partie 2). DiCaprio *et al.* (2012) ont rapporté que les norovirus humains et des calicivirus animaux, utilisés comme modèles, peuvent pénétrer dans de la laitue romaine pendant sa croissance dans de l'eau contaminée. Les racines des plantes de cultures vivrières peuvent absorber à la fois les virus et les bactéries (Hirneisen *et al.*, 2012). Deux facteurs semblent influencer l'internalisation des virus dans les plantes. D'une part, le type de culture semble être le facteur prépondérant dans l'internalisation de virus par des végétaux. Deux études ont constaté l'internalisation de norovirus murin et de VHA dans des épinard et des oignons verts uniquement pour des cultures hydroponiques ou hors-sol (Chancellor *et al.*, 2006 ; Hirneisen *et al.*, 2012). D'autre part, la qualité de l'eau semble jouer

un rôle important. Une eau présentant une faible concentration en matière en suspension semble plus favorable à l'internalisation du poliovirus dans des plants de tomates (Oron *et al.*, 1995).

3- Survie des virus entériques

L'étude de la survie des virus entériques pathogènes, c'est-à-dire le maintien de leur infectiosité, est d'une importance fondamentale pour l'évaluation du risque viral lié à l'eau et aux aliments. La survie varie selon l'environnement dans lequel se trouve la particule virale, elle ne sera pas la même si le virus se trouve en eau douce, en eau de mer, sur une surface sèche ou encore sur des aliments. La température mais aussi les UV ont une grande influence sur la persistance des particules virales. Ces particules peuvent également se fixer sur certains solides ou être influencées par la présence de prédateurs flagellés (Fong et Lipp, 2005) comme par exemple les nanoflagellés phagotrophiques du milieu marin (Suttle et Chen, 1992). Il est important de garder à l'esprit que les virus entériques pathogènes pour l'homme ne peuvent pas se multiplier dans l'environnement et donc, malgré leur grande résistance à l'environnement extérieur, le taux de virus présents dans le milieu hydrique ne peut que chuter après leur excrétion (Ganesh et Lin, 2013). De même, bien que les coquillages concentrent les particules virales présentes dans l'eau, aucune multiplication des virus ne peut y avoir lieu.

Le **tableau IV** regroupe des données concernant l'inactivation de virus entériques pathogènes après exposition à un traitement thermique, aux UV ou au chlore. A l'heure actuelle, seules les méthodes de culture cellulaire permettent de déterminer l'infectiosité des virus. Ainsi, la détection des norovirus infectieux et l'étude de leur persistance ne peuvent être réalisées avec les techniques actuelles. Les virus entériques sont détruits par une exposition à une température de 100°C. Il faut cependant noter la résistance remarquable du virus de l'hépatite A pour lequel l'inactivation est obtenue pour des températures avoisinant les 90°C (Millard *et al.*, 1987) voire 100°C selon certains auteurs (Croci *et al.*, 1999). Les adénovirus s'avèrent extrêmement résistants aux UV avec des doses quatre fois supérieures à celles nécessaires pour les autres virus pour observer une baisse d'une unité logarithmique. La persistance des virus sur les surfaces dépend de plusieurs paramètres tels que la présence ou non de matières fécales, les conditions d'humidité et de température. Beaucoup de virus peuvent rester infectieux de longues périodes sur des surfaces sèches. Ainsi, après 60 jours sur une surface en aluminium à 20°C avec un taux d'humidité d'environ 85%, le titre infectieux de suspensions séchées de poliovirus, de rotavirus humain et de VHA aura diminué de seulement deux \log_{10} sur les six initialement présents (Abad *et al.*, 1994b). Les temps de survie des virus dans le milieu hydrique varient d'une étude à l'autre et ceci reflète bien les différences dans les conditions expérimentales : le type d'eau, le pH, l'exposition à la lumière ou non, la turbidité...

Tableau IV : Inactivation virale en fonction de la température, de l'exposition aux UV ou au chlore

Virus	Inactivation par la température ^a (Temps en jours pour observer le premier log ₁₀ d'abattement) (Bertrand <i>et al.</i> , 2012)		Inactivation par les UV (mJ/cm ²) (Hijnen <i>et al.</i> , 2006)	Inactivation par le chlore (D'après Pelleieux, 2012 ; Abad <i>et al.</i> , 1994a ; Kahler <i>et al.</i> , 2010 ; Thurston-Enriquez <i>et al.</i> , 2003)					
	0-50°C	50-100°C		Dose requise pour obtenir une réduction de 1 log ₁₀	Milieu étudié	Température (°C)	pH	Concentration en chlore (mg/L)	Temps d'exposition (min)
VHA	316,2	5,1	6	Eau de distribution autoclavée	25	7,5	0,5-1	1,5	2
Poliovirus	7,9	1,3	7				0,2-0,5	>1	2
Coxsackievirus	63,1	1	8	Pas de données					
Echovirus	25,1	0,46		Eau souterraine	5-15	7-8	0,2	3,4	3
Rotavirus	25,1	0,46	10	Eau de rivière autoclavée	25	7,5	1	10	1,8
Adénovirus	125,9	2	42	Eau souterraine déchlorée	15	8-8,2	0,5	2,5	2
Astrovirus	79,4	1,3	Pas de données	Pas de données					

^a : tests effectués sur matrices simples (eau de boisson, eau souterraine ou milieux synthétiques)

4- Cas d'épidémies virales liées à l'eau ou aux aliments

4.1- Epidémies virales liées à l'eau

Le **tableau V** présente plusieurs cas d'infections virales d'origine hydrique, identifiées ces dernières années. Les infections virales d'origine hydrique sont liées soit à une consommation d'eau de distribution contaminée, soit à un contact avec des eaux récréatives contaminées. Le taux d'attaque ou taux d'atteinte représente la probabilité pour un sujet de développer la maladie lors du pic d'une épidémie. Il est calculé par le rapport entre le nombre de sujets atteints et le nombre de sujets exposés.

Les épidémies liées à une baignade en piscine sont le plus souvent dues à un problème de taux de chlore insuffisant et à des contrôles inadéquats. Des épidémies sont également observées après baignade dans des eaux naturelles. Ainsi une épidémie liée à une contamination multiple à coxsackievirus et échovirus a été rapportée chez des étudiants lors d'un voyage scolaire au Mexique avec 21 personnes malades après une baignade dans l'océan (n=29) (Begier *et al.*, 2008). Une étude menée sur la rivière du Colorado entre 1994 et 2004 a montré une corrélation entre la présence de norovirus dans l'eau et les épidémies de gastro-entérites rapportées chez des gens pratiquant le rafting sur la rivière avec six épidémies et plus de 400 cas de gastro-entérites rapportés en 10 ans (Jones *et al.*, 2009).

Jusqu'en 2005 la majorité des épidémies rapportées étaient liées aux eaux récréatives, mais depuis cette date, ce sont les eaux de distribution qui sont le plus souvent incriminées. Ceci peut s'expliquer par une meilleure gestion de la qualité des eaux récréatives ou par une amélioration de la détection des cas de gastro-entérites liés aux eaux de distribution. Les causes les plus fréquemment rencontrées lors d'une contamination de l'eau de boisson sont des défaillances du réseau de distribution ou une contamination de la source d'eau prélevée avant potabilisation.

Comme pour les eaux récréatives, ce sont les épidémies de gastro-entérites à norovirus qui sont le plus souvent rapportées. Ces épidémies peuvent avoir lieu sur des lieux de vacances, comme en Italie avec 344 personnes infectées par un norovirus lors de leurs vacances après une rupture au niveau du système de l'alimentation en eau et une détection de bactéries fécales dans les échantillons d'eau du robinet (Boccia *et al.*, 2002). Une épidémie a également été décrite dans une station de ski en Nouvelle Zélande, avec 218 cas de gastro-entérites à norovirus. Une fosse septique avait débordé dans le ruisseau où l'usine de production d'eau potable prenait l'eau de ressource en période de forte affluence (Hewitt *et al.*, 2007). Une épidémie de gastro-entérite liée au rotavirus a été rapportée en Turquie avec 9 907 personnes de tous âges atteintes de diarrhée, le taux de chlore résiduel relevé dans l'eau du robinet était beaucoup trop faible et l'eau d'un puits avait contaminé un réservoir d'eau potable (Koroglu *et al.*, 2011).

Tableau V : Les épidémies virales récentes d'origine hydrique au niveau mondial (Hamza *et al.*, 2011)

Année	Localisation	Source de contamination	Virus	Nb de cas	Taux d'attaque (%)	Référence
2000	Australie	Piscine	Adénovirus	NP	40	Harley <i>et al.</i> , 2001
	Italie	Eau de distribution	Norovirus	344	51,4	Boccia <i>et al.</i> , 2002
	Albanie	Eau de distribution	Rotavirus, astrovirus, adénovirus et norovirus	2722	NP	Villena <i>et al.</i> , 2003
2001	Afrique du Sud	Piscine	Echovirus	90	69,2	Yeats <i>et al.</i> , 2005
	Allemagne	Piscine	Echovirus	215	NP	Hauri <i>et al.</i> , 2005
	Finlande	Piscine	Norovirus, astrovirus	242	NP	Maunula <i>et al.</i> , 2004
	Minnesota	Lac	Norovirus	40	NP	Yoder <i>et al.</i> , 2004
	Wyoming	Eau de distribution	Norovirus	35	43,2	Anderson <i>et al.</i> , 2003
2002	Pays Bas	Fontaine	Norovirus	NP	47	Hoebe <i>et al.</i> , 2004
	Arizona	Rivière	Norovirus	400	NP	Jones <i>et al.</i> , 2009
	Minnesota	Piscine	Norovirus	36	NP	Yoder <i>et al.</i> , 2004
	Wisconsin	Lac	Norovirus	66	NP	
	Albanie	Eau de distribution	Rotavirus, astrovirus, adénovirus, calicivirus et VHA	2000 gastro-entérites 200 hépatites	NP	Divizia <i>et al.</i> , 2004
2004	Mexique	Océan	Coxsackievirus, échovirus	21	72,4	Begier <i>et al.</i> , 2008
	Vermont	Piscine	Norovirus	53	28	Podewils <i>et al.</i> , 2007
	Suède	Lac	Norovirus	163	NP	Sartorius <i>et al.</i> , 2007
2005	Inde	Eau de distribution	VHE	546	NP	Sarguna <i>et al.</i> , 2007
	Brésil	Eau de distribution	Rotavirus	816	NP	Siqueira <i>et al.</i> , 2010
	Irak	Eau de distribution	VHE	268	NP	Al-Nasrawi <i>et al.</i> , 2010
	Turquie	Eau de distribution	Rotavirus A	9907	NP	Koroglu <i>et al.</i> , 2011
2006	Nouvelle-Zélande	Eau de distribution	Norovirus	218	NP	Hewitt <i>et al.</i> , 2007
	Caroline du Nord	Eau de distribution	VHA	16	NP	Tallon <i>et al.</i> , 2008
	Inde	Eau de distribution	VHE	160	NP	Prinja <i>et al.</i> , 2008
	Chine	Eau de distribution	VHA	60	NP	Cao <i>et al.</i> , 2009
2007	Corée	Eau de distribution	VHA	70	NP	Lee <i>et al.</i> , 2008

2007	Belgique	Eau de distribution	Norovirus	NP	85	Waarbeek <i>et al.</i> , 2010
	Finlande	Eau de distribution	Rotavirus, calicivirus, Aichi virus, adénovirus et bocavirus	50	NP	Räsänen <i>et al.</i> , 2010
	Finlande	Eau de distribution	Norovirus, astrovirus, rotavirus, enterovirus et adénovirus	1000	NP	Maunula <i>et al.</i> , 2009a
2008	Monténégro	Eau de distribution	Norovirus, rotavirus et adénovirus	10 000 à 15 000	10	Werber <i>et al.</i> , 2009
2009	Italie	Eau de distribution	Norovirus, rotavirus, enterovirus et astrovirus	299	NP	Scarcella <i>et al.</i> , 2009
	Suède	Eau de distribution	Norovirus	200	NP	Riera-Montes <i>et al.</i> , 2011

NP : non précisé

Des épidémies d'hépatites A et E liées à l'eau sont également rapportées. En Chine, 60 cas d'hépatite A ont été rapportés après une contamination fécale du système de distribution d'eau potable (Cao *et al.*, 2009). En Corée, ce sont 70 cas d'hépatite A qui ont été observés chez des militaires qui se fournissaient en eau potable dans un ruisseau, après de fortes pluies. Suite à cette épidémie, la vaccination contre l'hépatite A des militaires a été mise en place, ainsi qu'un approvisionnement en eau par un système public (Lee *et al.*, 2008). Deux épidémies d'hépatite E ont été décrites en Inde, la première avec 546 cas regroupés à un endroit où les canalisations d'eau potable traversaient les égouts (Sarguna *et al.*, 2007) et la deuxième avec 160 cas due à une fuite des systèmes de distribution de l'eau courante à proximité de fossés à ciel ouvert contenant des ordures ménagères et des eaux usées. De plus, lors de la seconde épidémie, les auteurs ont noté une absence de chlore résiduel dans les eaux prélevées dans la zone d'épidémie (Prinja *et al.*, 2008).

Plusieurs épidémies dues à des contaminations multiples sont aussi décrites. La plus célèbre ayant eu lieu à Nokia où pendant deux jours les eaux usées sont passées dans le circuit d'eau potable suite à l'erreur d'un employé. Plus de 1 000 personnes ont été infectées (Maunula *et al.*, 2009a). A Podgorica, capitale du Monténégro, en 2008, environ 15 000 personnes ont présenté des symptômes de gastro-entérite, soit environ 10% de la population, suite à une contamination fécale du réseau d'eau de la ville (Werber *et al.*, 2009).

En France, entre 1998 et 2008, 10 épidémies de gastro-entérites d'origine hydrique ont été identifiées par l'Institut de veille sanitaire (InVS) (Therre *et al.*, 2009). En 2008, 142 cas de gastro-entérites liés à la consommation d'eau dans un camping en Ardèche ont été décrits avec un taux d'attaque de 51,5% (L'Azou et Duchon, 2012). En 2012, dans un village du Cantal, 477 cas de gastro-entérites à norovirus sont déclarés suite à une défaillance du système de fonctionnement et de surveillance d'une station d'épuration (Mouly *et al.*, 2013).

4.2- Epidémies virales liées aux aliments

Des épidémies virales liées à la consommation d'aliments contaminés sont également rapportées (**tableau VI**). Nous remarquons que ce sont principalement les norovirus qui sont incriminés et que l'aliment le plus « sensible » semble être les huîtres. La consommation d'huîtres ou de palourdes crues est mise en cause dans plusieurs épidémies de gastro-entérites aiguës. La cuisson des coquillages semble diminuer le risque de contamination, mais ne garantit pas leur innocuité. Lors d'une épidémie liée à la consommation de moules en Italie, le taux d'attaque était de 74,1% pour toutes les personnes ayant consommé des moules, cuites ou crues. Ce taux passe à 86,3% pour les personnes les ayant consommées crues (Prato *et al.*, 2004). Ainsi, la cuisson, si elle n'est pas réalisée à cœur à des températures suffisantes ne permet pas la destruction des virus. La congélation fréquemment appliquées pour des petits fruits rouges consommés crus ne permet pas d'inactiver les virus. Deux épidémies liées à la consommation de framboises congelées ont notamment été décrites (Le Guyader *et al.*, 2004 ; Maunula *et al.*, 2009b).

Tableau VI : Epidémies virales récentes liées à la consommation d'aliments contaminés (d'après Stals *et al.*, 2012)

Année	Localisation	Aliment contaminé	Virus	Nombre de cas	Taux d'attaque	Référence
2000	Etats-Unis	Palourdes	norovirus	5	NP	Kingsley <i>et al.</i> , 2002
	France	Huîtres	norovirus	14	NP	Le Guyader <i>et al.</i> , 2003
2001	Suède	Framboises	norovirus	30	NP	Le Guyader <i>et al.</i> , 2004
2002	Nouvelle-Zélande	Myrtilles	HAV	43	NP	Calder <i>et al.</i> , 2003
	France - Italie	Huîtres	norovirus	327	92-100%	Le Guyader <i>et al.</i> , 2006
	Italie	Moules	norovirus	103	74,1%	Prato <i>et al.</i> , 2004
2003	Australie	Huîtres	norovirus	83	NP	Webby <i>et al.</i> , 2007
	Singapour	Huîtres	norovirus	305	82%	Ng <i>et al.</i> , 2005
2004	Canada	Huîtres	norovirus	26	NP	David <i>et al.</i> , 2007
2007	Allemagne	Pommes de terre en ragout	rotavirus	6	NP	Mayr <i>et al.</i> , 2009
	Suède	Huîtres	norovirus	30	NP	Nenonen <i>et al.</i> , 2009
	Japon	Salade	norovirus	23	NP	Oogane <i>et al.</i> , 2008
2008	France	Huîtres	norovirus	23	68%	Le Guyader <i>et al.</i> , 2008
2009	Finlande	Framboises	norovirus	200	NP	Maunula <i>et al.</i> , 2009b
2010	Danemark	Laitue	norovirus	264	55%	Ethelberg <i>et al.</i> , 2010

NP : non précisé

Comme nous l'avons vu, les virus entériques pathogènes ont un réel impact sur la santé humaine, et ce, au niveau mondial. A ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique de ces infections. Hormis les mesures préventives comme le lavage des mains, une bonne hygiène ou encore la vaccination dans certains cas, le seul traitement de l'infection sera symptomatique avec une réhydratation dans les cas de gastro-entérite. Devant l'importance de ces infections, nous allons à présent nous intéresser aux méthodes de détection mises au point.

DEUXIEME PARTIE :

Méthodes actuelles de détection des virus entériques pathogènes dans l'eau et les aliments

Nous avons vu dans la première partie de ce document l'importance des virus entériques pathogènes en termes de santé publique et le rôle que l'eau et les aliments peuvent avoir dans leur transmission. Dans cette deuxième partie, nous allons nous intéresser aux méthodes de détection des virus entériques pathogènes, aussi bien dans l'eau que les aliments. Tout d'abord, nous nous intéresserons au contrôle sanitaire microbiologique en vigueur en France. Nous nous pencherons ensuite sur les méthodes actuelles de détection des virus entériques incluant les méthodes de concentration des particules virales et les méthodes de détection à proprement parlé. Nous aborderons également les méthodes normalisées actuelles et celles en préparation. Enfin nous nous intéresserons à l'interprétation d'un signal positif en génome viral.

1- Contrôle sanitaire microbiologique de l'eau et des aliments

Le code de la santé publique préconise que « *les eaux destinées à la consommation humaine doivent (...) ne pas contenir un nombre ou une concentration de micro-organismes, de parasites ou de toutes autres substances constituant un danger potentiel pour la santé des personnes.* » Des mesures portant sur l'ensemble du circuit de production et de distribution de l'eau permettent via des obligations de moyens et de résultats d'assurer la sécurité sanitaire des eaux de consommation. Nous allons ici nous intéresser au cadre réglementaire actuellement en place pour la présence de virus, aussi bien dans l'eau que dans les aliments, aux niveaux européen et français. L'OMS donne des recommandations qui sont prises en compte lors de l'édition de directives européennes. Ces directives sont ensuite traduites en droit français.

En 2013, l'OMS déclare qu'à l'heure actuelle, les seuls indicateurs de contamination microbiologique des eaux sont bactériens. Cependant, les virus ont une survie et une sensibilité à la désinfection totalement différente de celles des bactéries, c'est pourquoi la question se pose d'utiliser des virus entériques comme indicateurs de contamination virale. L'OMS indique ainsi qu'une surveillance basée sur un ou plusieurs virus entériques serait plus utile pour l'évaluation de la présence de virus entériques pathogènes dans l'eau que l'utilisation d'indicateurs bactériens. Cependant, aucun contrôle de routine ne s'effectue pour l'instant sur les virus. Les meilleurs candidats comme indicateurs viraux seraient les virus les plus facilement détectables comme les entérovirus, les adénovirus ou encore les orthoréovirus. Ils sont retrouvés en grand nombre dans les eaux soumises à une pollution fécale. Ces virus peuvent être concentrés sur laine de verre, élués, puis détectés par culture cellulaire avec la recherche d'un effet cytopathique (OMS, 2013c). L'OMS recommande la recherche des virus

entériques pour évaluer la performance d'un procédé de décontamination des eaux. En revanche, les temps d'incubation et la complexité relative des méthodes font qu'elles ne sont pas adaptées aux opérations de vérification et de surveillance en routine.

Au niveau européen, la directive 98/83/CE relative aux eaux destinées à la consommation humaine demande pour les analyses en routine une recherche exclusive d'indicateurs bactériens. La recherche de virus n'est pas demandée en routine, mais elle peut se faire en cas d'épidémie et/ou de suspicion de contamination des eaux.

En ce qui concerne les aliments, le règlement de la Commission Européenne du 15 novembre 2005 (CE n° 2073/2005) concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires est entré en application dans tous les états membres le 1^{er} janvier 2006. L'article 14 de ce règlement précise qu' « aucune denrée alimentaire n'est mise sur le marché si elle est dangereuse » et qu'« une denrée alimentaire est dite dangereuse si elle est considérée comme : a) préjudiciable à la santé, b) impropre à la consommation humaine. » De plus, ce règlement précise que « les denrées alimentaires ne doivent pas contenir de micro-organismes ni leurs toxines ou métabolites dans des quantités qui présentent un risque inacceptable pour la santé humaine. » Sont définis sous le terme de micro-organismes : « les bactéries, les virus, les levures, les moisissures, les algues, les protozoaires parasites, les helminthes parasites microscopiques ainsi que leurs toxines et métabolites. » Ainsi, les virus entrent dans le cadre de ce règlement. Cependant, aucun critère microbiologique réglementaire n'est encore fixé pour la détection des virus dans les denrées alimentaires et ceci faute de méthode d'analyse suffisamment fiable (afssa, 2007). Le règlement CE n° 2073/2005 précise ainsi qu' « il conviendrait en particulier de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants si les méthodes d'analyse sont suffisamment développées. » De plus, le règlement ajoute que « les 30 et 31 janvier 2002, le CSMVSP [Comité Scientifique des Mesures Vétérinaires en rapport avec la Santé Publique] a délivré un avis sur les virus de type Norwalk (ou norovirus). Dans son avis, le comité est parvenu à la conclusion que les indicateurs fécaux conventionnels n'étaient pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de virus de type Norwalk et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constituait une pratique dangereuse. Le comité a également recommandé d'utiliser *E. coli* au lieu des coliformes fécaux pour déterminer la contamination fécale dans les zones de ramassage des mollusques lorsque des indicateurs bactériens sont appliqués ». C'est donc à l'heure actuelle *Escherichia coli* qui est utilisée pour évaluer la qualité microbiologique des coquillages.

En France, pour assurer la sécurité sanitaire des eaux, les autorités sanitaires sont soumises à des obligations de moyens, mais aussi à des obligations de résultats et la qualité de l'eau est exigée au robinet du consommateur. L'article R. 1321 du Code de la Santé Publique recommande la mise en place d'un plan d'assurance qualité au sein du système de production et de distribution. Ce plan d'assurance qualité est basé sur l'analyse régulière des risques comportant notamment l'identification des points critiques et les actions permettant de maîtriser les risques, la mise en œuvre de vérifications et de suivis efficaces au niveau de ces points et enfin la formation et l'information des agents intervenant dans cette démarche. Le

Code de la Santé Publique distingue d'une part les limites de qualité pour les paramètres dont la présence présente des risques immédiats ou à long terme pour la santé du consommateur, et d'autre part les références de qualité pour les paramètres qui sont des témoins du fonctionnement des installations de production et distribution des eaux.

Les limites de qualité pour les eaux douces superficielles destinées à être utilisées pour la production d'eaux destinées à la consommation humaine sont déterminées par une recherche des coliformes totaux à 37°C, d'*Escherichia coli*, d'entérocoques et de salmonelles (afssa, 2007). Ces ressources sont classées en trois groupes en fonction de leur degré de contamination, chaque groupe nécessitant un traitement de potabilisation différent ; toutefois, elles ne doivent pas contenir plus de 50 000 coliformes totaux, plus de 20 000 *Escherichia coli* et plus de 10 000 entérocoques pour 100 mL (Arrêté du 11 janvier 2007). Lorsque la qualité des eaux brutes est altérée, le Code de la Santé Publique demande un renforcement des traitements.

Les limites et références de qualité pour les eaux distribuées sont soumises à des obligations de résultats ; le prélèvement s'effectue au robinet du consommateur et non plus en sortie de l'unité de production comme avant. Les critères microbiologiques auxquels ces eaux doivent répondre concernent la recherche d'*Escherichia coli* et d'entérocoques pour les limites de qualité, ces deux paramètres doivent être absents d'un prélèvement de 100 mL. Les références de qualité concernent la recherche de bactéries coliformes, de bactéries sulfito-réductrices et de leurs spores qui doivent aussi être absentes d'un prélèvement de 100 mL. Les références de qualité demandent aussi la numération des germes aérobies revivifiables à 22°C et 37°C à partir d'un mL d'eau, ici le résultat peut varier au maximum d'un rapport de 10 par rapport à la valeur habituelle (afssa, 2007). En cas de détection de la présence anormale d'un ou plusieurs indicateurs bactériens dépassant les valeurs réglementaires, une procédure proposée dans un avis émis en 2005 par le Conseil Supérieur d'Hygiène Publique en France (CSHPF) peut conduire à la recherche de virus dans l'eau.

En ce qui concerne les eaux embouteillées, les paramètres recherchés incluent cette fois encore *Escherichia coli*, les entérocoques, les coliformes totaux, ainsi que *Pseudomonas aeruginosa* pour lesquels la recherche s'effectue dans un échantillon de 250 mL. Les bactéries sulfito-réductrices et leurs spores sont recherchés dans un volume de 50 mL. Enfin, les germes aérobies revivifiables à 22°C et 37°C sont quantifiés dans un mL. La recherche d'autres micro-organismes pathogènes comme *Cryptosporidium*, *Giardia*, *Legionella species* et *Legionella pneumophila* peut être effectuée en cas de suspicion de contamination (afssa, 2007).

En ce qui concerne les aliments, comme pour les eaux, il n'existe pas en France à l'heure actuelle, de textes réglementaires prenant en compte les virus. Des agents pathogènes à rechercher sont définis par catégorie de denrée alimentaire d'après le règlement CE 2073/2005.

Aux Etats-Unis, l'US-EPA (US Environmental Protection Agency) indique qu'en routine, pour le contrôle des eaux pour lesquelles le traitement appliqué ne permet pas d'assurer quatre unités logarithmiques d'abattement en virus, seule la recherche d'indicateurs de contamination fécale est demandée (US-EPA, 2000). En situation dégradée, une démarche spécifique est proposée. Au Canada, Santé Canada déclare en avril 2004 que « *même si les*

entérovirus reconnus pour infecter les êtres humains peuvent causer des maladies graves et parfois mortelles, il est impossible pour le moment d'en déterminer les concentrations maximales acceptables dans l'eau potable. (...) Lorsqu'un traitement est nécessaire, les techniques de traitement devraient réduire ou inactiver la charge virale dans une proportion d'au moins quatre log.»

En conclusion, nous avons donc vu que les virus entériques ne font pas l'objet d'une surveillance en routine bien qu'il soit reconnu que l'utilisation des indicateurs bactériens n'est pas adaptée pour l'évaluation d'une contamination virale. Aussi bien au niveau français qu'européen, il n'existe à l'heure actuelle aucun texte réglementaire demandant la détection des virus entériques pathogènes dans les eaux et les aliments.

2- Méthodes actuelles pour la recherche des virus entériques dans l'eau et les aliments

L'analyse virologique de l'eau et des aliments doit tenir compte lors du développement des protocoles des faibles concentrations en particules virales, mais aussi de la présence possible d'inhibiteurs. Cette analyse repose sur une étape de concentration des particules virales pour les eaux, ou d'élution-concentration pour les aliments et les boues suivie d'une étape de détection. Une étape de décontamination associée ou non à une détoxification pour l'élimination des bactéries, micromycètes et substances toxiques peut également être envisagée lors d'une détection par culture cellulaire (Schwartzbrod, 2000). Nous allons tout d'abord nous intéresser aux méthodes de concentration et d'élution-concentration utilisées pour les analyses d'eau, de boues ou d'aliments, puis nous aborderons les différentes méthodes de détection des virus.

2.1- Méthodes de concentration et d'élution-concentration

2.1.1- Méthodes de concentration pour l'analyse d'échantillons hydriques

L'objectif de l'étape de concentration est d'obtenir tous les virus présents dans l'échantillon dans un faible volume final. La concentration des particules virales présentes dans un échantillon est une des étapes essentielles à maîtriser lors de l'analyse virologique du milieu hydrique. Elle doit répondre à deux problématiques : la faible concentration en virus et la présence d'inhibiteurs. La méthode doit permettre de concentrer les virus présents à de très faibles concentrations. En effet, contrairement aux prélèvements cliniques, les échantillons environnementaux contiennent généralement de très faibles taux de virus, souvent proches des limites de détection des méthodes. Cette étape de concentration doit également permettre une élimination maximale des inhibiteurs présents dans l'environnement qui pourraient influencer les méthodes de détection. Une bonne méthode de concentration doit répondre à plusieurs exigences : elle doit être rapide, techniquement simple, permettre un bon taux de récupération

en virus, être adaptée à un large éventail de virus entériques, donner un faible volume après concentration et être peu coûteuse. A l'heure actuelle, aucune méthode ne répond à l'ensemble de ces critères. La sélection du système le plus approprié se fera selon le type d'échantillon et la méthode de détection.

Méthodes basées sur l'adsorption-élution

Le principe de ces méthodes repose sur la capacité des virus à se fixer sur différents supports et à s'en décrocher lorsque les conditions électrochimiques varient (Vilagines *et al.*, 1979). Plusieurs facteurs présentent un rôle important dans ces méthodes d'adsorption-élution : la composition chimique du support, les conditions de force ionique, le pH, la présence ou non de matières organiques ou de protéines et la charge de la particule virale (**figure 13**). De nombreux matériaux peuvent être utilisés comme support pour l'adsorption virale. La poudre de verre, la laine de verre (Vilagines *et al.* 1988 ; Wyn-Jones *et al.*, 2011), l'oxyde de fer, le phosphate de calcium, l'hydroxyde d'aluminium (Wallis et Melnick, 1967), mais aussi des silicates minéraux ou encore du charbon actif peuvent être utilisés (Schwartzbrod, 2000). Ces matériaux sur lesquels sont filtrés les échantillons d'eau sont chargés positivement ou négativement. L'utilisation de supports chargés négativement est limitée car elle nécessite une acidification du milieu qui peut provoquer une inactivation virale. En effet, comme représenté sur la **figure 13**, pour obtenir une charge globale virale positive, il faut que le pH soit inférieur au point isoélectrique du virus. Les valeurs du point isoélectrique de quelques virus entériques pathogènes sont présentées dans le **tableau VII**. Au contraire, l'adsorption des virus sur des surfaces chargées positivement ne nécessite aucun traitement préalable de l'échantillon. Les virus sont élués à l'aide de solutions protéinées ou non, en général à un pH alcalin, l'extrait de bœuf ou un tampon glycine sont fréquemment utilisés. Ces méthodes d'adsorption-élution sont les mieux adaptées pour l'analyse de grands volumes d'eau. En effet, elles permettent de concentrer les particules virales présentes dans 20 à 1 000 litres d'eau dans un volume final de quelques centaines de millilitres (Rodier, 2009).

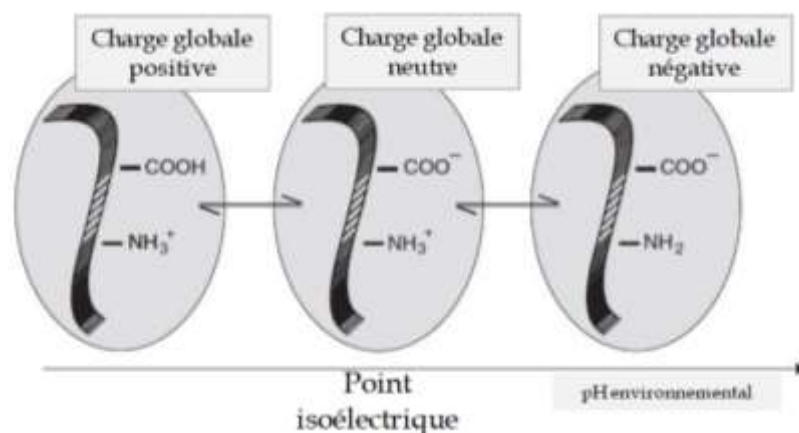


Figure 13 : Représentation schématique de l'état d'ionisation des protéines en fonction du pH (Michen et Graule, 2010)

Tableau VII : Points isoélectriques (pI) expérimentaux de certains virus entériques (d'après Dika, 2013)

Virus	pI	Références
Poliovirus 1 (Sabin LSc)	6,6	Zerda, 1982
Coxsackievirus A21	6,1 ; 4,8	Murray et Parks, 1980
Virus de l'hépatite A	5,8	Kukavica-Ibrulj <i>et al.</i> , 2004
Parvovirus AA4.x14	2,6	Salo et Mayor, 1978

Méthodes basées sur la filtration

Ces méthodes permettent la séparation des particules en fonction de leur taille. Tout d'abord, nous citerons deux méthodes historiques mais qui ne sont plus utilisées actuellement : la méthode des gazes et l'électro-osmose ou électrophorèse.

Une méthode basée sur la filtration actuellement utilisée est l'ultrafiltration. Cette méthode utilise une membrane dont le diamètre des pores est inférieur à la taille des virus que l'on veut concentrer. L'ultrafiltration peut se faire sous pression, par circulation tangentielle continue ou en appliquant une pression osmotique. Ces méthodes permettent d'obtenir un rendement élevé, mais le colmatage des filtres est possible et le débit de filtration demeure faible. Le risque de colmatage des membranes est limité en ultrafiltration tangentielle qui consiste à faire passer le fluide tangentiellement à la surface du filtre, contrairement à la filtration frontale.

Méthode basée sur la centrifugation : l'ultracentrifugation

Cette méthode repose sur un principe de sédimentation physique des particules virales. Ainsi, si on applique une force supérieure à 100 000 g pendant une heure, les particules virales sont concentrées dans le culot (Schwartzbrod, 2000). Il est de plus possible d'appliquer un gradient de densité, par exemple au chlorure de césium (Redman *et al.*, 1997) pour récupérer uniquement la fraction de densité identique aux particules virales recherchées. L'inconvénient de cette méthode est que l'appareillage est très coûteux et qu'elle est limitée à de faibles volumes. Elle est donc employée comme méthode de concentration secondaire des particules virales.

Méthodes basées sur la précipitation

- Précipitation au polyéthylène glycol (PEG) : le polyéthylène glycol est un polymère synthétique soluble dans l'eau qui agit en piégeant l'eau autour des virus ce qui provoque leur précipitation. Le précipité ainsi formé est récupéré par centrifugation (Markwell et Shortridge, 1982). Cette méthode est simple et économique, son rendement est proche de 100% quels que soient les solutions et les virus testés (Schwartzbrod, 2000).

- Flocculation organique ou minérale : c'est une méthode d'adsorption des virus sur des précipités ou floccs produits par ajout d'ions minéraux ou organiques. La flocculation minérale peut être réalisée avec le sulfate d'ammonium, le sulfate de protamine, le chlorure ferrique, le chlorure de cobalt ou encore le sulfate d'alumine. La flocculation organique utilise le plus souvent de l'extrait de bœuf. Cette méthode est simple mais présente une efficacité variable et l'extrait de bœuf peut entraîner une inhibition des méthodes de détection, il peut de plus se

révéler cytotoxique. Cette méthode est surtout adaptée pour la concentration secondaire ou pour les échantillons très chargés en matière en suspension.

Méthodes basées sur la lyophilisation

La lyophilisation ou cryodessiccation est basée sur la sublimation du solvant, ici l'eau, pour concentrer les particules. Cette méthode est efficace pour les échantillons très sales ou comme méthode de concentration secondaire. Elle est coûteuse et très peu utilisée (Gajardo *et al.*, 1995).

En règle générale, les méthodes le plus souvent employées pour la concentration primaire sont des méthodes d'adsorption-élution, surtout sur poudre de verre et laine de verre, ou encore des méthodes d'ultrafiltration tangentielle. Pour la concentration secondaire, seront préférées les méthodes utilisant la floculation organique, la précipitation au PEG et l'ultracentrifugation (Schwartzbrod, 2000). Une méthode normalisée (AFNOR XP T90-451, 1996) décrit la recherche des entérovirus dans les eaux, elle est présentée dans la partie 2.4.

2.1.2- Analyse virologique d'aliments

Les virus sont recherchés dans des aliments classés en trois catégories : les fruits de mer, les aliments principalement composés de protéines-lipides ou aliments « prêts à consommer » et les aliments principalement composés de glucides et d'eau comme les fruits et légumes (Stals *et al.*, 2012). Lors de l'analyse d'aliments il est nécessaire de réaliser une étape d'élution pour « décrocher » les virus des aliments. La méthode qui peut être utilisée pour tous les types d'aliments est une technique d'élution-concentration. Les particules virales présentes à la surface des aliments seront éluées grâce à un tampon qui est généralement de pH alcalin compris entre 9 et 10,5. Une fois cette étape d'élution effectuée, la concentration des virus est réalisée par précipitation au PEG, ultrafiltration, ultracentrifugation, séparation cationique ou immuno-concentration (Stals *et al.*, 2012).

Dans les mollusques bivalves, les virus peuvent être présents au niveau de plusieurs tissus comme la muqueuse du tube digestif ou l'hépatopancréas. L'analyse est réalisée soit sur l'ensemble des tissus, soit uniquement sur l'hépatopancréas après dissection. Les tissus sont broyés et les virus sont récupérés par élution-concentration (Schwartzbrod, 2000).

Summa *et al.* (2012) ont comparé quatre méthodes d'élution-concentration afin de détecter des norovirus sur des laitues fraîches, du jambon et des framboises congelées. Les virus sont élués des aliments dans une solution tampon avant de subir l'étape de concentration par ultrafiltration, séparation immunomagnétique, ultracentrifugation ou encore précipitation au PEG. La solution tampon utilisée pour l'élution dépend de la méthode de concentration. Ainsi, les auteurs utilisent un tampon glycine à 50 mM pour l'ultrafiltration, le tampon de lavage fourni dans le kit Norocheck IMS® pour la séparation immunomagnétique, un tampon NaHCO₃ à 1 M avec 1% de protéines de soja pour l'ultracentrifugation et enfin un tampon TGBE (100 mM Tris, 50 mM glycine, 1% Extrait de Bœuf) pour la précipitation au PEG.

Après concentration, le génome viral est extrait puis détecté par RT-PCR. La répétabilité et l'application de la méthode à tous les aliments sont meilleures avec la précipitation au PEG avec des rendements de 19% pour la laitue, 47% pour le jambon et 28% pour les framboises. L'ultracentrifugation permet d'obtenir les rendements les plus élevés pour la laitue et le jambon avec des rendements respectifs de 19% et 70%. Une dilution au dixième de l'ARN extrait a été systématiquement nécessaire pour diminuer le taux d'inhibiteurs de la RT-PCR.

2.1.3- Analyse virologique des boues

Pour analyser les particules virales présentes dans les boues, il est nécessaire en amont de la concentration virale, d'ajouter une étape d'éluion-extraction. Cette dernière doit permettre de rompre la liaison entre les virus et les particules de boues. Les solutions éluantes utilisées doivent donc modifier les conditions du milieu, soit en modifiant le pH, soit en ajoutant des ions, pour permettre ainsi la libération des particules virales dans la phase liquide. Plusieurs solutions peuvent être utilisées comme des solutions d'extrait de bœuf et de glycine, de borate ou encore du lait écrémé. La phase liquide est récupérée après centrifugation et les virus seront alors concentrés généralement par floculation organique ou par précipitation au PEG (Schwartzbrod, 2000).

2.2- Méthodes d'extraction des acides nucléiques

L'extraction du matériel génétique à partir des particules virales éluées et concentrées doit permettre la récupération et la purification de l'ARN ou de l'ADN viral. Elle utilise des agents dénaturant des protéines qui vont permettre la dégradation de la capsid virale mais aussi l'inactivation des ribonucléases. L'extraction peut se faire par lyse enzymatique ou lyse chimique et sera suivie d'une purification du génome extrait.

La lyse chimique utilise des réactifs comme le thiocyanate de guanidium. La lyse enzymatique se fait par action d'une protéinase K couplée à un détergent comme le SDS 1% et nécessite une incubation de 30 minutes à 65°C. Cette technique de lyse enzymatique se révèle applicable aux coquillages. Ainsi, Le Guyader *et al.* (2003) détectent les norovirus dans des huîtres et utilisent une extraction de l'ARN viral par protéinase K. Après dissection des huîtres, les tissus digestifs sont récupérés et mixés, les virus sont élués et concentrés par action de chloroforme-butanol et de PEG. Les acides nucléiques sont extraits par action d'une protéinase K et sont détectés par RT-PCR. La lyse enzymatique par la protéinase K a été sélectionnée comme méthode de référence par le groupe de travail européen CEN/TC275/WG6/TAG4 pour l'extraction du génome des virus entériques pathogènes les plus communs à partir de tissus digestifs de coquillages (Lee *et al.*, 2010).

2.3- Méthodes de détection des virus

2.3.1- Détection par culture cellulaire

La culture cellulaire est une technique qui permet de ne détecter que les particules virales infectieuses. L'infectiosité virale peut être décrite comme la capacité des virus à entrer dans des cellules hôtes et à utiliser la machinerie cellulaire pour produire de nouvelles particules virales infectieuses ou virions (Black, 1996). Pour être infectieux, un virus nécessite une capsidie et un génome intacts (Knight *et al.*, 2013). Le génome doit en effet être intact pour correctement employer la machinerie de la cellule hôte à la production de nouveaux virions. La capsidie joue elle aussi un rôle essentiel, c'est elle qui protège le génome lorsque le virus est en dehors de la cellule hôte et qui permet l'initiation de l'infection lorsque le virus entre en contact avec un récepteur d'une cellule hôte (Cliver, 2009). La capsidie semble donc essentielle pour assurer la protection du génome de la dégradation, cependant, plusieurs études ont noté que l'ARN viral peut être infectieux *in vitro* (Bachrach, 1959 ; Holland *et al.*, 1960 ; Nuanualsuwan et Cliver, 2002 ; Brandenburg *et al.*, 2007). Nuanualsuwan et Cliver (2002) ont extrait l'ARN de poliovirus et l'ont déposé sur une culture cellulaire permissive. Ils ont observé la formation de plages de lyse mais la dose infectieuse était alors 100 000 fois supérieure à celle de virions intacts et seuls les virus avec un génome à ARN de polarité positive peuvent initier une infection à partir d'ARN libre.

La culture cellulaire est une méthode sensible, spécifique et quantitative. Elle est à l'heure actuelle la méthode de référence de détection des virus dans l'eau, les aliments et l'environnement car c'est la seule méthode qui permet d'affirmer le caractère infectieux des particules virales (Hamza *et al.*, 2011). On considère comme infectieux un virus qui va répliquer son génome et/ou entraîner la synthèse de protéines virales dans la cellule hôte qu'il provoque ou non l'apparition de lésions de la cellule. Il existe deux moyens de visualiser la multiplication virale sur culture cellulaire, soit de façon directe en observant des lésions au niveau du tapis cellulaire appelées effet cytopathique ou ECP, soit de façon indirecte grâce à des techniques immunologiques ou de biologie moléculaire qui seront détaillées dans la Partie 3 du manuscrit. En effet, tous les virus qui sont capables de multiplication sur culture cellulaire ne provoquent pas forcément d'ECP visible, c'est le cas par exemple de certains coxsackievirus, des échovirus ou encore de certains adénovirus (afssa, 2007). Lorsque la culture s'effectue en milieu liquide, les virions libérés par les cellules infectées peuvent se propager dans toutes les cellules du milieu provoquant ainsi leur destruction massive. En revanche, en milieu solide, les virus nouvellement formés ne peuvent pas se disperser dans tout le tapis cellulaire, ils vont infecter seulement les cellules adjacentes et provoquer l'apparition de plages de lyse. Avant de déposer les virus sur une culture cellulaire, il convient d'éliminer les bactéries et micromycètes par filtration et ajout d'antibiotiques et antifongiques.

L'avantage de la culture cellulaire est qu'elle permet également de quantifier les virus infectieux. En milieu solide c'est une méthode de type énumératif qui sera utilisée avec un comptage des plages de lyse cellulaire provoquées par le virus. L'unité utilisée sera l'UFP

pour unité formant plaque. En milieu liquide, il s'agit ici de méthodes de type quantique et les résultats sont exprimés soit en NPPUC (Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques), soit en TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose ou dose infectieuse médiane en culture cellulaire). La méthode du NPPUC est réalisée en microplaque, des dilutions successives du virus sont mises en contact avec la lignée cellulaire adaptée (Hugues, 1981). Jusqu'à 40 puits sont utilisés par dilution et sont comptés comme « positifs » les puits dans lesquels un effet cytopathique est observé. La détermination du NPPUC est ensuite faite à partir des trois dernières dilutions ayant permis d'obtenir des ECP. La détermination du titre infectieux en TCID₅₀ est également réalisée en milieu liquide avec 8 à 16 puits par dilution. La valeur de TCID₅₀ obtenue correspond à la concentration en virus permettant d'obtenir un ECP dans 50% des puits.

Les limites de la culture cellulaire sont surtout dues à l'absence de lignée universelle et au fait que tous les virus entériques pathogènes n'ont pas forcément de lignée cellulaire permissive identifiée. Le **tableau VIII** présente des lignées cellulaires permettant la multiplication de virus entériques citées dans la littérature. Certains virus comme les entérovirus sont très faciles à propager sur culture cellulaire. Pour d'autres, la culture s'avère plus longue et plus complexe notamment pour les rotavirus et le VHA pour lequel la culture cellulaire reste limitée à quelques souches de laboratoire. Enfin pour les norovirus aucune lignée cellulaire permissive n'a encore été trouvée à ce jour. En 2007, Straub et collaborateurs ont réalisé un essai d'infectiosité avec du norovirus humain sur des cultures en trois dimensions de cellules hautement différenciées d'épithélium intestinal embryonnaire humain (Straub *et al.*, 2007). Cet essai est difficilement réalisable en routine car cette lignée cellulaire est peu répandue et la technique utilisée est très particulière.

Un autre paramètre à prendre en compte lors de l'utilisation de la culture cellulaire est la possibilité d'une agrégation virale. Dans l'environnement, les virus peuvent avoir tendance à s'agréger en fonction du pH et cette agrégation peut influencer les résultats de façon notable (Langlet *et al.*, 2007). Le pH joue un grand rôle dans l'agrégation des particules virales car c'est de lui que dépend la charge des protéines de surface du virion. Lorsque le pH correspond au point isoélectrique, la charge des particules est nulle et ces dernières ont tendance à s'agréger. L'agrégation des particules virales infectieuses modifie la relation dose-réponse et donc l'estimation de l'infectiosité du virus. Ainsi, lors d'une culture cellulaire, un seul virus isolé peut infecter une seule cellule, un agrégat pouvant contenir jusqu'à des centaines de virus infectieux va lui aussi infecter une seule cellule. Teunis *et al.* (2008) ont évalué les DI₅₀ (dose rendant malade 50% des sujets exposés) du virus de Norwalk en fonction de l'agrégation des particules déterminée par microscopie électronique. Ils ont trouvé des valeurs de DI₅₀ de 18 pour des particules virales isolées et 2,6 pour des virus agrégés.

Tableau VIII : Exemples de lignées cellulaires permettant la détection de virus entériques (d'après afssa, 2007)

Cellules	Virus isolés	Échantillons	Références
BGM	<i>Poliovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999 Hoyt et Margolin, 2000
	<i>Enterovirus</i>	Eaux du robinet Eaux de surface Eaux de mer Eaux usées	Vilaginès <i>et al.</i> , 1979, 1982, 1989, 1993 et 1997 Enriquez <i>et al.</i> , 1995 Muscillo <i>et al.</i> , 1997 Reynolds <i>et al.</i> , 2001
	<i>Reovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999
CaCo-2	<i>Enterovirus</i>	Eaux de surface	Chapron <i>et al.</i> , 2000
	<i>Astrovirus</i> ,		
	<i>Rotavirus</i>	Selles Eaux potables	Abad <i>et al.</i> , 1998
FRhK	<i>VHA</i>	Eaux de surface Eaux de mer Eaux usées	Reynolds <i>et al.</i> , 2001
Hep-2	<i>Poliovirus</i>	Échantillons cliniques	Wood et Hull, 1999
	<i>Enterovirus</i>	Eaux de mer	Muscillo <i>et al.</i> , 1997
L20B	<i>Poliovirus</i>	Eaux usées Échantillons cliniques	Grabow <i>et al.</i> , 1999 Wood et Hull, 1999
	<i>Reovirus</i> <i>Enterovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999
MA-104	<i>Rotavirus</i>	Eaux potables Selles	Abad <i>et al.</i> , 1998
Vero Hela	<i>Enterovirus</i> , <i>Echovirus</i>	Boues	Caillou <i>et al.</i> , 1998
PLC/PRF/5	<i>HAV</i>	Eaux du robinet Eaux de mer Eaux usées	Enriquez <i>et al.</i> , 1995
	<i>Adenovirus 40 et 41</i>		
	<i>Poliovirus</i>		
	<i>Enterovirus</i> <i>Reovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999
RD	<i>Poliovirus</i>	Échantillons cliniques	Wood et Hull, 1999
PVK	<i>Poliovirus</i>	Eaux usées	Grabow <i>et al.</i> , 1999
	<i>Enterovirus</i>		
	<i>Reovirus</i>		

La culture cellulaire est la méthode de référence pour la détection des virus entériques dans l'eau, les aliments et les échantillons environnementaux car elle est la seule technique qui témoigne de leur caractère infectieux. Cependant, elle n'est pas applicable à tous les virus entériques pathogènes. Malgré de récentes publications sur des lignées cellulaires permettant

une multiplication plus rapide du virus de l'hépatite A (Konduru et Kaplan, 2006) et une multiplication du norovirus (Straub *et al.*, 2007), des questions liées à la complexité de ces essais, à leur rentabilité et à leur validité pour détecter un large éventail de souches se posent encore. De plus, il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur les lignées cellulaires à utiliser et un manque de standardisation de la méthode est aussi à déplorer. Enfin, la culture cellulaire est une technique souvent longue pouvant nécessiter plusieurs jours ou semaines d'incubation avant l'observation d'un effet cytopathique et elle nécessite du personnel qualifié. C'est pourquoi les techniques utilisant la biologie moléculaire, et plus spécifiquement la (RT)-PCR, sont actuellement les plus utilisées pour la détection des virus dans l'eau.

2.3.2- Détection du génome viral par RT-PCR

Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet la détection spécifique d'acides nucléiques. Elle permet d'amplifier *in vitro* une séquence nucléotidique définie grâce à des amorces qui lui sont spécifiques. Pour les virus à ARN, soit la majorité des virus entériques, une étape de transcription inverse ou rétro-transcription (RT) est nécessaire en amont pour obtenir l'ADN complémentaire (ADNc). Les séquences obtenues peuvent ensuite être identifiées soit par électrophorèse sur gel d'agarose en présence d'un agent intercalant tel que le bromure d'éthidium (BET) avec une séparation en fonction de leur taille, soit par hybridation moléculaire avec une sonde complémentaire de la séquence cible liée à un fluorochrome. Un cycle de PCR est composé de trois étapes : la dénaturation du génome, avec notamment la dénaturation des doubles brins à 94-96°C, l'hybridation des amorces à chaque extrémité de la séquence à amplifier à 50-60°C et enfin l'élongation ou synthèse des brins complémentaires par une polymérase à partir des amorces à 60-72°C. Une PCR est composée de 20 à 40 cycles successifs qui permettent en théorie d'obtenir 2^{20} à 2^{40} copies de la séquence cible.

Les techniques de PCR permettent une analyse rapide et spécifique, elles sont très sensibles et reproductibles mais restent cependant coûteuses surtout au niveau de l'étape de rétro-transcription. Ces techniques permettent de plus de détecter tous les virus pourvu que la séquence de leur génome soit connue.

La PCR quantitative

La PCR quantitative (qPCR) permet de déterminer la quantité de génome cible initialement présent dans un échantillon (Heid *et al.* 1996 ; Gibson *et al.* 1996). Elle repose sur le suivi en temps réel de la PCR contrairement à la PCR classique aussi appelée PCR en point final. Cette technique repose sur la mesure de la fluorescence émise au cours de la PCR. La courbe d'intensité de fluorescence obtenue pour un échantillon positif à une allure sigmoïdale (**figure 14**). Suite à la PCR, chaque échantillon est caractérisé par une valeur de Ct (threshold cycle ou cycle seuil) qui correspond au cycle de la PCR à partir duquel la fluorescence est considérée comme significativement supérieure à la ligne de base. Plus un échantillon contient de génome cible, plus sa valeur de Ct est faible. Ainsi la valeur de Ct est

inversement proportionnelle à la quantité de copies d'ADN contenues dans l'échantillon. Pour être quantitative cette méthode nécessite l'amplification d'une gamme étalon simultanément aux échantillons.

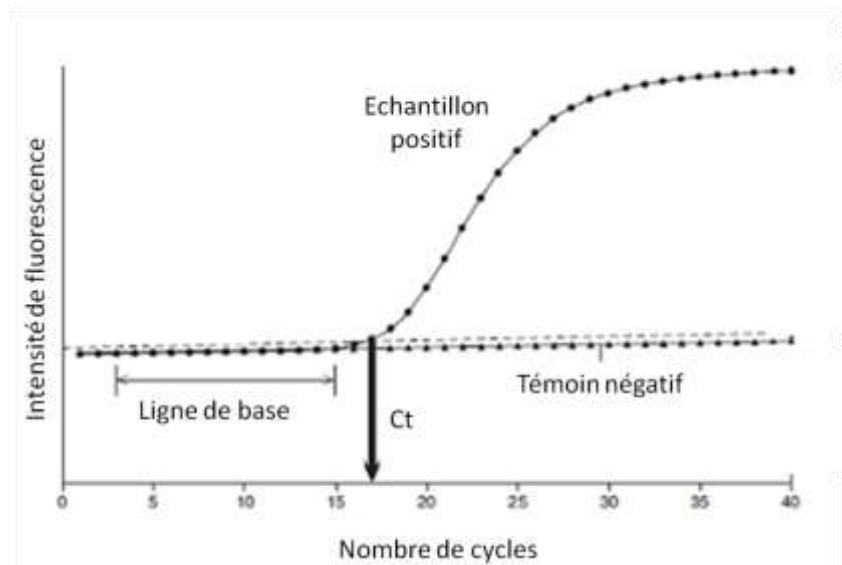


Figure 14: Evolution de la fluorescence au cours d'une PCR en temps réel en fonction du nombre de cycle

Deux systèmes sont utilisés pour produire la fluorescence, soit un agent intercalant, soit une sonde moléculaire couplée à un fluorochrome. Ainsi, la fluorescence peut être le résultat d'une interaction non spécifique entre l'ADN et un agent intercalant. Le SYBRGreen est le plus utilisé actuellement du fait d'une meilleure sensibilité et d'une plus faible toxicité. L'inconvénient principal des agents intercalant est leur absence totale de spécificité. Il est donc nécessaire de réaliser une courbe de fusion en fin de réaction pour vérifier qu'il n'y a bien qu'un seul produit de PCR amplifié. Les amplicons produits sont soumis à une température augmentant par palier de 0,5°C entre 55 à 95°C, avec une mesure de l'intensité fluorescente en continu. La T_m (Temperature melting) ou température de fusion des amplicons correspond à la température à laquelle 50% des doubles brins d'ADN sont dissociés. La valeur de T_m est spécifique d'un fragment nucléotidique, elle dépend en effet de la taille et de la séquence du fragment. L'autre méthode de production de la fluorescence est basée sur l'utilisation d'une sonde spécifique complémentaire de l'ADN cible, marquée chimiquement par un fluorochrome. Les sondes TaqMan® sont marquées à leur extrémité 5' par un fluorochrome ou "Reporter" et à leur extrémité 3' par un "Quencher". Le quencher inhibe l'émission de fluorescence par un phénomène de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) lorsque la sonde est intacte. Durant l'étape d'hybridation de chaque cycle de la PCR (**figure 15**), les amorces et sonde TaqMan s'hybrident à la cible. Lors de la phase d'élongation, la sonde est clivée grâce à l'activité 5'-3' exonucléasique de la Taq polymérase ce qui permet la séparation entre le quencher et le reporter provoquant alors une émission de fluorescence. D'autres types de sonde peuvent être utilisés en PCR temps réel. L'utilisation d'une sonde couplée à un fluorochrome permet d'augmenter la spécificité de la réaction de PCR par rapport à l'utilisation d'un agent intercalant.

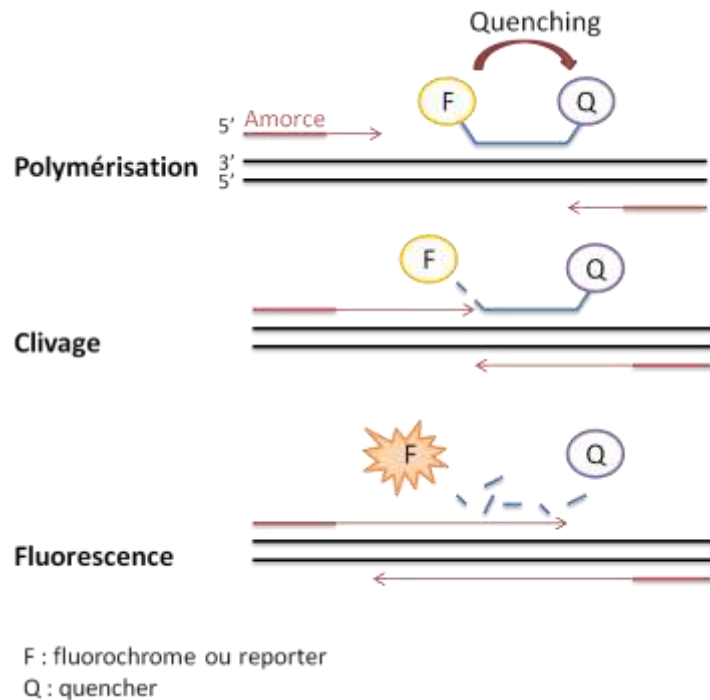


Figure 15 : Représentation schématique du principe de la PCR en temps réel avec une sonde TaqMan

Autres techniques de PCR : les puces à ADN

Les puces à ADN ou biopuces sont constituées d'un ensemble de molécules d'ADN fixées de façon ordonnée sur une petite surface de plastique, verre ou silicium. Le principe de ces puces repose sur la propriété que possède l'ADN dénaturé à reformer spontanément sa double hélice lorsqu'il est en présence d'un brin complémentaire : c'est la réaction d'hybridation. L'ADN ou l'ARN est donc extrait de l'échantillon puis amplifié afin d'avoir suffisamment de matériel à détecter. Les produits d'amplification sont ensuite déposés sur la puce. Chaque point ou spot de la puce va être analysé individuellement par un scanner aux longueurs d'onde d'excitation des fluorochromes. Le principe des puces à ADN est expliqué sur la **figure 16**.

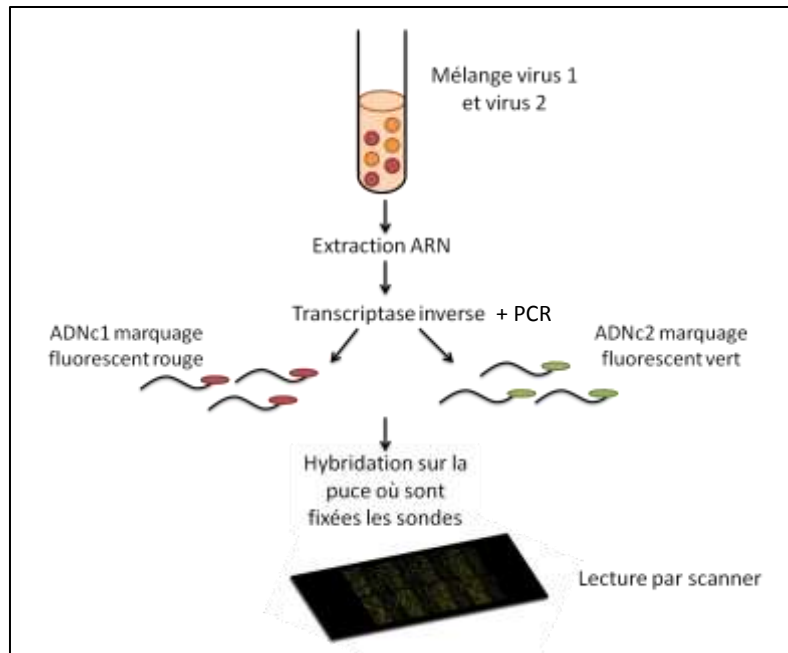


Figure 16 : Principe des puces à ADN

Chizhikov *et al.* (2002) ont développé une puce pour la détection et le génotypage de rotavirus du groupe A. La puce permet d'obtenir des informations sur la souche, contrairement à la PCR classique. Les puces à ADN combinent en effet la haute spécificité de la PCR à la sélectivité de l'hybridation ADN-ADN. Cette puce permettrait d'identifier sans ambiguïté toutes les souches de rotavirus. Une étape de PCR utilisant les primers communs à tous les rotavirus du groupe A précède la détection sur puce. Une puce à ADN pour la détection d'entérovirus 71 et de coxsackievirus A16 a également été mise au point (Chen *et al.*, 2006) et s'est révélée utile pour l'analyse des échantillons cliniques. Jääskeläinen et Maunula (2006) ont développé une puce permettant la détection de norovirus et astrovirus. Sur les 74 échantillons de selles analysés, 45 se sont révélés positifs *via* la puce contre seulement 35 avec une RT-PCR classique. Brinkman et Fout (2009) ont développé et évalué une puce pour la détection et le génotypage de norovirus. Cette puce permet de cibler 10 génotypes et les résultats sont prometteurs puisque chaque génotype conduit à un seul profil d'hybridation. Avec cette puce, la détection de norovirus s'est révélée possible dans des échantillons enrichis d'eau de rivière. Cependant, un ensemble plus exhaustif de sondes recouvrant tous les génotypes connus est encore requis avant une application réelle dans l'environnement.

Les puces à ADN se révèlent donc utiles pour la détection, le génotypage et les études épidémiologiques sur les virus entériques pathogènes, aussi bien dans l'environnement que dans des échantillons cliniques.

Ainsi, les techniques moléculaires de RT-PCR permettent la détection de souches virales dont la séquence nucléotidique est connue. Ces techniques sont rapides, spécifiques et peuvent être quantitatives. Girones *et al.* (2010) recensent les avantages et les inconvénients

des techniques moléculaires pour la détection des virus dans l'eau. La (RT)-PCR est ainsi, pour certains virus, la seule méthode permettant de les détecter et de les quantifier devant l'absence de protocoles de culture efficaces. Les techniques moléculaires peuvent être utilisées pour l'identification de souches virales et de génotypes spécifiques. La combinaison de la PCR et du séquençage peut fournir des informations sur les caractéristiques phylogénétiques de la souche identifiée. L'utilisation de la qPCR permet de faciliter l'évaluation de l'efficacité des traitements de désinfection de l'eau. En effet, une diminution voire une disparition de la quantité de génome détecté témoigne de l'efficacité du traitement. Les techniques moléculaires se révèlent enfin être des outils très utiles pour identifier les sources d'une contamination fécale du milieu hydrique lors d'investigations recherchant la cause d'une épidémie de gastro-entérites avec la présence de génome de la même souche virale présent simultanément dans les selles des personnes malades et dans l'eau ou les aliments incriminés. Cependant, les techniques moléculaires présentent également des inconvénients, le principal étant que la détection du génome ne fournit aucune information sur l'infectiosité et donc le niveau de risque en termes de Santé Publique (Girones *et al.*, 2010). La PCR détecte le génome qu'il provienne d'une particule virale infectieuse, inactivée, ou qu'il soit à l'état libre dans l'environnement (Richards, 1999). Une simple amplification du génome ne fournit pas d'informations sur l'intégrité de la capsid virale et elle ne s'intéresse qu'à une petite partie de ce génome donc elle n'apporte pas d'information sur l'intégrité du génome. Enfin, il ne faut pas négliger le fait que les méthodes moléculaires peuvent donner des résultats faussement négatifs du fait de la présence dans l'environnement d'inhibiteurs enzymatiques tels que les composés humiques ou du fait du fait d'une faible concentration virale dans l'échantillon.

2.4- Méthodes normalisées existantes et en préparation pour la détection de virus dans l'eau et les aliments

Il existe actuellement une méthode normalisée pour la détection des entérovirus infectieux dans les eaux et des normes en préparation pour la détection du génome de norovirus et du virus de l'hépatite A dans les aliments et les eaux embouteillées.

2.4.1- Méthode normalisée pour la recherche des entérovirus dans les eaux : Normes XP T90-451

Une norme existe en France pour la recherche d'entérovirus dans l'eau depuis plusieurs années (XPT90-451, 1996). Cette méthode est basée sur la concentration des virus sur laine de verre et détection par culture cellulaire. Les entérovirus détectables avec cette méthode sont les virus de la poliomyélite (3 sérotypes), les coxsackievirus A et B (23 et 6 sérotypes), les échovirus (32 sérotypes) et les entérovirus 68, 69, 70 et 71. Cette méthode d'analyse se déroule en quatre étapes. Les particules virales sont tout d'abord concentrées par adsorption sur laine de verre, 62 à 75% des entérovirus présents dans l'échantillon sont récupérés à partir de grands volumes allant de 100 à 1 000 litres (Vilagines *et al.*, 1993). La deuxième étape consiste en une élution grâce à une solution d'extrait de bœuf et de glycine à pH 9,5. La

troisième étape est une concentration secondaire des particules virales par floculation organique et enfin une étape de détection par mise en culture sur tapis cellulaire de cellules BGM en microplaque. Le dénombrement se fait avec la méthode du Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques (NPPUC) après 5 jours d'incubation. La caractérisation des virus se fait en observant au microscope les lésions liées à l'effet cytopathique.

2.4.2- Méthode normalisée en développement pour la détection du virus de l'hépatite A et du norovirus dans les aliments et les eaux embouteillées

Depuis plusieurs années des groupes d'experts tentent d'établir un ordre de priorité de couples virus-aliments en matière de santé publique en se basant sur la gravité de l'infection, son coût en matière de santé publique, sa prévalence... L'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) a désigné les norovirus et le VHA comme les virus devant être considérés en priorité dans les mollusques bivalves, les légumes frais mais aussi les aliments prêts à consommer (EFSA, 2011).

Devant l'impossibilité d'une détection en routine par culture cellulaire pour les norovirus et le VHA, le groupe de travail CEN/TC275/WG6/TAG4 a été mis en place pour valider une méthode de détection du génome de ces virus dans les aliments en utilisant la RT-PCR en temps réel. En 2010, ce groupe a rendu un rapport affirmant que la PCR en temps réel doit servir de standard pour la détection des norovirus et du virus de l'hépatite A dans les aliments (Lees, 2010). Se pose encore le problème de définition d'un seuil limite en génome de ces virus pour l'évaluation du risque sanitaire. La méthode devrait encadrer la détection des norovirus et du VHA dans les eaux embouteillées et les aliments par RT-PCR en temps réel.

La norme expérimentale CEN ISO TS/XP 15216 (ISO/TS 15216, 2013 part 1 et 2) proposée par le groupe CEN/TC275/WG6/TAG4 est parue en 2013. Elle décrit une méthode de recherche du VHA et des norovirus dans les aliments, les eaux embouteillées et sur les surfaces alimentaires par RT-PCR en temps réel. Pour les fruits rouges et salades, l'élution des virus se fait dans un tampon TGBE (Tris, Glycine, 1% Extrait de Bœuf), sous agitation, puis précipitation au PEG et NaCl. Pour les mollusques et coquillages bivalves, le virus est extrait des tissus des glandes digestives par traitement avec une solution de protéinase K. Les virus présents dans les eaux embouteillées sont adsorbés sur une membrane chargée positivement, élués, puis concentrés par ultrafiltration. Le prélèvement sur les surfaces alimentaires se fait par écouvillonnage suivi d'une élution. Après ces étapes d'élution, concentration et extraction du génome viral, ce dernier est détecté par RT-qPCR. Le virus Mengo qui est un virus murin de la famille des *Picornaviridae* est préconisé comme témoin du processus, il permet de déterminer le rendement d'extraction qui est jugé correct lorsqu'il est supérieur à 1%. Un contrôle de l'efficacité de l'amplification sera effectué, de même que des courbes étalons permettront la quantification. Cette norme est actuellement au stade de norme expérimentale et des essais inter-laboratoire (EIL) sont en cours.

2.5- Comparaison des concentrations en virus entériques dans l'eau et les aliments déterminées par culture cellulaire et RT-PCR

Le **tableau IX** regroupe des données de la littérature comparant la culture cellulaire à la (RT)-PCR pour la détection de virus entériques dans des aliments et des prélèvements environnementaux.

Tableau IX : Comparaison de la culture cellulaire et de la RT-PCR pour la détection de virus entériques dans des aliments et des échantillons environnementaux

Virus	Echantillons	Echantillons positifs par culture cellulaire	Echantillons positifs par (RT)-PCR	Références
Entérovirus	Eau de rivière	2,9% (2/68)	88,2% (60/68)	Hot <i>et al.</i> , 2003
	Eaux souterraines	8,7% (13/150)	26,7% (40/150)	Abbaszadegan <i>et al.</i> , 1999
	Eaux usées	38,5% (10/26)	50% (13/26)	Sdiri <i>et al.</i> , 2006
	Coquillages	28,6% (16/56)	42,9% (24/56)	
	Huîtres	5,45%	10,9%	Choo et Kim, 2006
Virus de l'hépatite A	Framboises surgelées	20%	17%	Dubois <i>et al.</i> , 2002
Poliovirus		15%	45-100%	
Adénovirus	Huîtres	23,6%	89,1%	Choo et Kim, 2006

En règle générale, la (RT)-PCR détecte plus d'échantillons positifs que la culture cellulaire. Hot *et al.* (2003) utilisent la RT-PCR pour détecter du génome d'entérovirus dans 68 échantillons d'eau de rivière. Soixante échantillons sont trouvés positifs aux entérovirus par RT-PCR alors que seulement deux échantillons s'avèrent positifs par culture cellulaire. Lors de la recherche d'entérovirus dans des eaux souterraines, Abbaszadegan *et al.* (1999) trouvent 13 échantillons positifs par culture cellulaire contre 40 pour la RT-PCR sur un total de 150 échantillons avec une absence de corrélation entre ces deux méthodes. En effet, sur les 13 échantillons positifs par culture cellulaire, six sont négatifs par RT-PCR. Cette absence de concordance est aussi retrouvée par Sdiri *et al.* (2006) qui recherchent des entérovirus dans des eaux usées et des coquillages. Les auteurs retrouvent une concordance de seulement 57,3%, avec 28% des échantillons positifs uniquement par RT-PCR et 14,6% positifs uniquement par culture cellulaire. Les échantillons positifs uniquement après détection par biologie moléculaire peuvent s'expliquer par le fait que le génome viral détecté peut provenir de particules non infectieuses. En ce qui concerne les échantillons positifs uniquement par culture cellulaire, ce résultat peut s'expliquer par la présence d'inhibiteurs de la réaction de RT-PCR et éventuellement par le fait que la culture cellulaire permet d'analyser des volumes d'échantillons plus importants.

Des études ont porté sur la comparaison entre l'inactivation de virus entériques, c'est-à-dire la perte d'infectiosité, et la dégradation de leur génome. Ces cinétiques sont très différentes. Ainsi, Gassilloud *et al.* (2003) ont montré une persistance plus grande du génome viral dans le milieu hydrique que de l'infectiosité pour le poliovirus 1 et le calicivirus félin f9, et ce quelle que soit la température (4 à 35°C). D'après leurs résultats, le poliovirus subit une inactivation de 4 log₁₀ en 20 jours alors que la dégradation du génome ne diminue que de 2 log₁₀ en 80 jours. La **Figure 17** illustre cette différence dans la cinétique de dégradation du génome et de perte d'infectiosité.

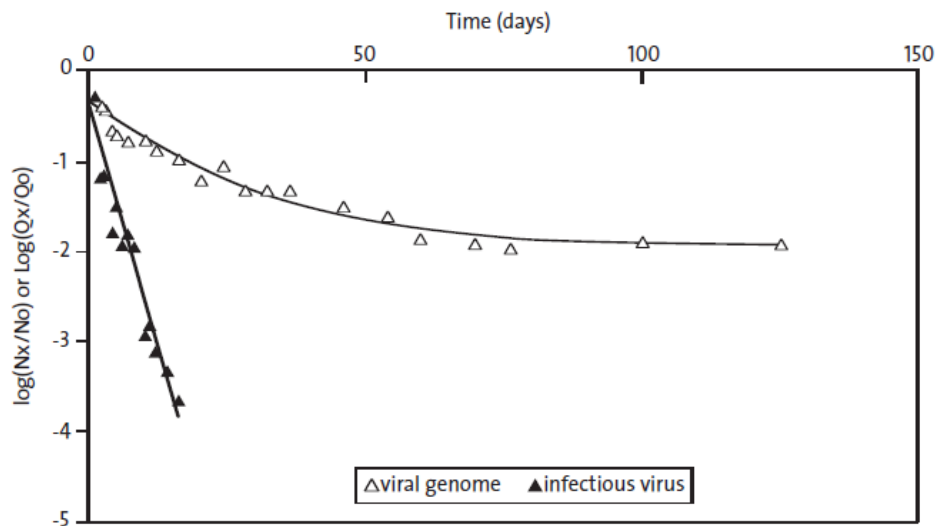


Figure 17 : Inactivation du *Poliovirus 1* infectieux (infectious virus) détecté par culture cellulaire et dégradation de son génome (viral genome) détecté par RT-PCR en temps réel à 35°C dans une eau minérale (Gassilloud *et al.*, 2003)

Bertrand *et al.* (2012) ont comparé des publications concernant l'inactivation de virus entériques par la chaleur. Cette revue de la littérature montre bien une persistance supérieure du génome par rapport à l'infectiosité. De plus, les virus à ADN seraient plus résistants à un traitement thermique que les virus à ARN. Plus l'origine de la contamination est ancienne et plus la discordance entre génome et particules infectieuses peut être importante. Il semble donc encore difficile de relier la détection de génome viral à la présence de virus infectieux. En revanche, la présence de génome viral dans l'environnement peut témoigner d'une contamination virale plus ou moins ancienne.

Au vu de cette persistance du génome, il est logique que les études portant sur la détection de virus uniquement par (RT)-PCR aboutissent à des prévalences élevées. Baert *et al.* (2011) combinent les données recueillies en France, Belgique et au Canada sur la présence de génome de norovirus sur des aliments. L'analyse par RT-PCR donne des résultats positifs en génome de norovirus pour 28,2 à 50% des légumes-feuille (salade, épinard, chou), pour 6,7 à 34,5% des fruits rouges et pour 55,5% des autres fruits. Dans les coquillages, des études récentes détectent du génome de norovirus dans 51,4% des coquillages testés en Italie (Suffredini *et al.*, 2012) et 76,2% des huîtres testées au Royaume-Uni (Lowther *et al.*, 2012b). En ce qui concerne le virus de l'hépatite A, ce dernier est détecté dans 32% des coquillages en Tunisie (Amri *et al.*, 2011) et aussi sur des dattes au Portugal (Boxman *et al.*, 2012).

La plus grande persistance du génome viral en comparaison avec l'infectiosité pose la question de l'interprétation d'un signal positif par RT-PCR.

2.6- Interprétation d'un signal positif en génome en termes de danger viral

Si l'obtention d'un résultat négatif par les techniques de biologie moléculaire permet de conclure, dans les conditions d'assurance qualité adaptées, à l'absence de virus infectieux, l'obtention d'un résultat positif nécessite une analyse plus poussée. Il est alors apparu nécessaire pour l'afssa, actuellement anses (agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail), de proposer un logigramme d'interprétation des résultats positifs par les techniques de biologie moléculaire. Ce logigramme (**figure 18**) est un outil pratique et concret à destination des gestionnaires de risques.

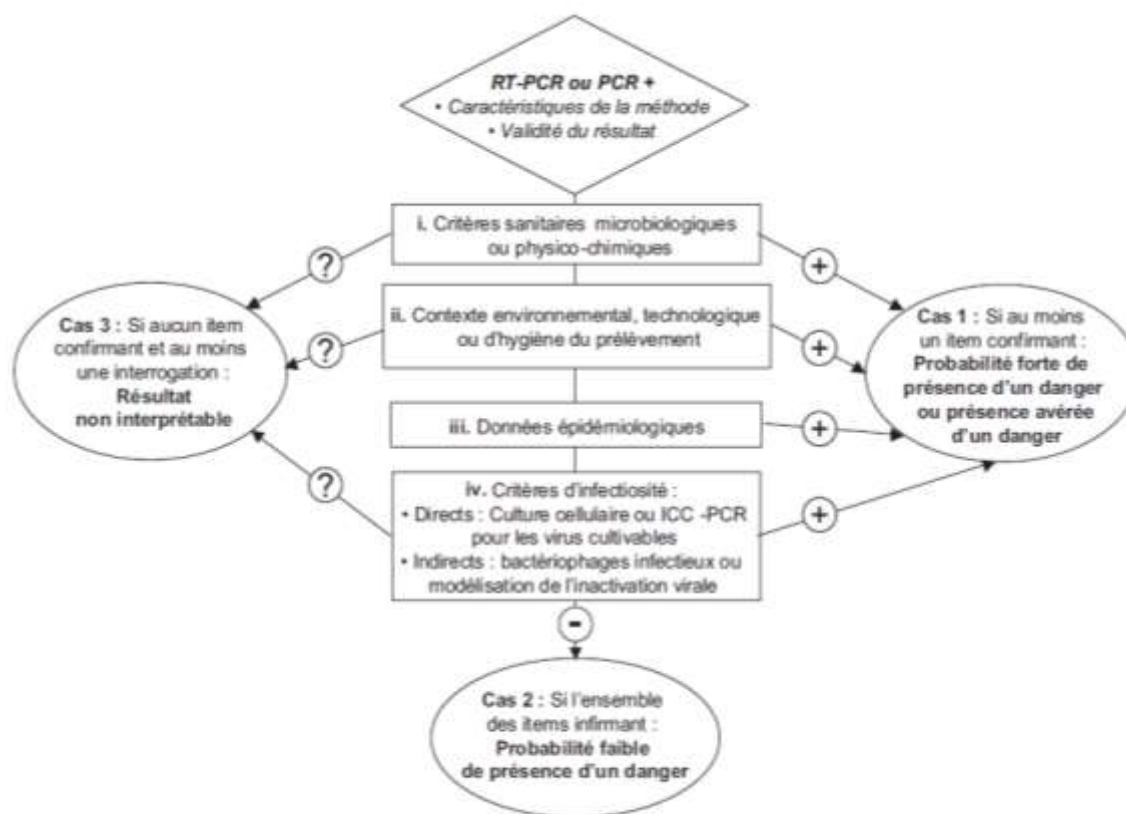


Figure 18 : Logigramme d'interprétation d'un résultat positif par les techniques de biologie moléculaire (afssa, 2007)

L'anses recommande de conduire en simultanément les compléments d'analyse et les enquêtes permettant l'appréciation du risque infectieux. La conclusion d'une présence d'un danger infectieux est possible à chaque étape et de façon indépendante. Les analyses complémentaires à effectuer et qui sont représentées sur la **figure 18** sont les suivantes :

i. Vérifier le respect, ou non, des critères réglementaires microbiologiques et physico-chimiques pouvant indiquer une contamination microbienne récente.

- ii. Rechercher des facteurs environnementaux ou technologiques ou encore d'hygiène pouvant indiquer l'origine de la contamination virale de l'aliment ou de l'eau, sa date et éventuellement la durée d'exposition des denrées ou de l'eau aux virus.
- iii. La prise en compte des données épidémiologiques disponibles peut également permettre de caractériser le danger. Exemples : foyers épidémiques dans les populations exposées aux aliments ou à l'eau, déclarations d'infection récente chez les préparateurs...
- iv. Afin d'apprécier la probabilité de présence de virus infectieux et donc d'un danger, rechercher la présence, dans les lots positifs par RT-PCR (ou PCR pour les virus à ADN), de virus entériques infectieux (principalement les entérovirus, éventuellement les réovirus, rotavirus, adénovirus, astrovirus, virus de l'hépatite A ; voire les norovirus et sapovirus si des modèles cellulaires deviennent disponibles). Une caractérisation indirecte du maintien du pouvoir infectieux des virus est possible, en démontrant la présence de bactériophages infectieux (bactériophages ARN F-spécifiques et/ou coliphages somatiques).

Ensuite se pose la question de l'interprétation des résultats. L'ANSES donne les clés suivantes :

Cas 1 : Si au moins l'un de ces items fournit des arguments en faveur d'une contamination microbienne récente ou démontre le caractère infectieux du virus incriminé, alors il peut être conclu à une **probabilité forte de présence d'un danger ou à la présence avérée d'un danger.**

Cas 2 : Si l'ensemble de ces items fournit des arguments en faveur de l'absence d'une contamination récente et du pouvoir infectieux du virus incriminé, il est possible de conclure à une **probabilité apparemment faible de présence d'un danger.**

Cas 3 : Si une interrogation subsiste sur les items i. (critères sanitaires microbiologiques ou physico-chimiques), ii. (contexte environnemental, technologique ou d'hygiène du prélèvement) ou iv. (critères d'infectiosité directs ou indirects) et qu'aucun des items ne fournit d'arguments en faveur d'une contamination récente, alors le résultat positif de (RT)-PCR **n'est pas interprétable quant à la présence d'un danger.** Néanmoins, dans ce cas, la surveillance des denrées (ou de l'eau) et des procédés de production doit être accrue pendant la durée qui sera nécessaire pour démontrer la maîtrise durable des éventuelles sources de contamination microbienne.

Comme nous l'avons vu précédemment, la présence de génome viral dans l'eau et les aliments peut atteindre des taux élevés et son interprétation est complexe. Plusieurs aspects doivent être pris en compte lors de l'interprétation des résultats (Stals *et al.*, 2013). L'interprétation des résultats de PCR doit tout d'abord se faire d'un point de vue strictement technique (D'Agostino *et al.*, 2011), il faut surtout vérifier l'emploi de contrôles négatifs, vu la grande sensibilité des méthodes moléculaires et le risque de contamination, et donc de faux positifs. Bien que l'utilisation de valeurs seuil ne soit pas idéale car elles peuvent conduire à des résultats faussement positifs ou négatifs, le guide MIQE (information minimum pour la publication de résultats d'expériences de PCR quantitative en temps réel) recommande de considérer les valeurs de Ct supérieures à 40 comme suspectes et de ne pas les rapporter. En effet, ces valeurs témoignent d'une faible efficacité de PCR (Bustin *et al.*, 2009).

Stals *et al.* (2013) suggèrent trois approches pour améliorer l'interprétation d'un résultat de PCR positif : l'utilisation d'une limite acceptable (ou limite d'acceptation critique), la confirmation du résultat positif et le lien entre le résultat positif et la présence d'autres organismes fécaux.

La limite acceptable définit les valeurs maximales ou minimales qui seront acceptées. Lowther *et al.* (2012a) discutent de l'application d'une telle limite pour les taux de norovirus détectés dans la nourriture. Les auteurs comparent les taux d'ARN de norovirus présents dans des huîtres responsables ou non d'épidémies à norovirus. Ils retrouvent des taux moyens de 1 048 copies de génome par gramme dans les huîtres responsables d'épidémies contre seulement 121 pour les huîtres non impliquées dans une épidémie. Une autre étude montre que les huîtres contenant moins de 200 copies de génome de norovirus n'ont vu aucune maladie reportée après leur consommation en revanche, les huîtres contenant plus de 1 000 copies de génome sont significativement reliées avec des cas de maladie (Doré *et al.*, 2010). En ce qui concerne le VHA, des taux de $4,9.10^3$ copies de génome pour 25 grammes d'huître ont été impliqués dans des épidémies alors qu'aucun cas d'infection n'a été recensé pour des huîtres contenant $4,6.10^2$ copies de génomes pour 25 grammes (Woods et Burkhardt, 2010). Pouvoir définir une limite acceptable pour les norovirus et le VHA détectés par RT-PCR dans les coquillages permettrait donc une interprétation plus aisée d'un résultat de PCR positif. L'EFSA a discuté en 2012 de la création d'une limite acceptable en déclarant que cette dernière doit être discutée en termes de conséquences aussi bien économiques que sur la santé publique. Plus de données doivent être collectées sur la contamination virale et sur différents supports (eau, aliments) afin de pouvoir définir clairement et utiliser une telle limite. Des auteurs suggèrent qu'un résultat positif en génome de norovirus doit être confirmé en procédant à une nouvelle RT-qPCR utilisant d'autres amorces et sondes ou par un séquençage de l'amplicon obtenu (Baert *et al.*, 2011).

Le lien entre le résultat de PCR et la présence d'indicateurs de contamination fécale a déjà été étudié de nombreuses fois avec des résultats divergeant. Certaines études trouvent effectivement un lien entre la présence de norovirus et celle d'indicateurs de contamination fécale comme *E. coli* (Suffredini *et al.* 2012 ; Lowther *et al.* 2012b) mais les concentrations de norovirus et d'*E. coli* ne sont pas corrélées. Si les indicateurs bactériens sont retrouvés de façon constante en cas de contamination fécale, les norovirus ne sont retrouvés que lors des périodes d'épidémies. Il ne semble donc pas y avoir de possibilité de fixer une concentration maximale d'*E.coli* ou d'un autre marqueur de contamination fécale qui soit corrélée au risque viral. Des études ont montré un lien entre la présence de norovirus ou d'adénovirus et celle de bactériophages F-spécifiques (Allwood *et al.*, 2003 ; Lowther *et al.*, 2008 ; Ogorzaly *et al.*, 2009). Mais une telle association n'est pas toujours retrouvée (Stals *et al.* 2011 ; Amri *et al.* 2011). A noter que l'utilisation de virus comme indicateurs de contamination virale est aujourd'hui discutée avec les adénovirus humains (Silva *et al.*, 2011).

Devant les limites de la culture cellulaire pour détecter tous les virus entériques pathogènes infectieux et l'impossibilité de déterminer cette infectiosité par PCR, il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes de détection des virus entériques pathogènes dans le milieu hydrique.

TROISIEME PARTIE :

Détection des virus entériques infectieux : méthodes en développement et perspectives

Comme nous l'avons détaillé précédemment, les défis majeurs rencontrés lors de l'analyse d'échantillons environnementaux sont la faible concentration en particules virales qui impose d'utiliser des méthodes sensibles, la présence d'inhibiteurs des méthodes de détection, mais aussi l'émergence de nouveaux variants qui nécessite une adaptation des méthodes employées et enfin l'absence de corrélation entre la présence de génome viral et l'infectiosité (Gassilloud *et al.*, 2003 ; Gensberger et Kostić, 2013). Des méthodes de détection sensibles, spécifiques et robustes sont donc nécessaires, après une préparation adéquate de l'échantillon. Devant l'incapacité de la culture cellulaire à détecter tous les virus entériques pathogènes et l'impossibilité de détecter les virus infectieux par les méthodes de biologie moléculaire, le développement de nouvelles méthodes de détection semble essentiel.

Nous allons tout d'abord nous intéresser aux méthodes associées à la culture cellulaire qui permettent d'observer l'infection ou non des cellules par le virus. Les virus entériques pathogènes étant constitués uniquement d'une capsidite et d'un génome, nous nous intéresserons ensuite aux méthodes étudiant l'intégrité de la capsidite et/ou du génome.

1- Méthodes basées sur la culture cellulaire

Comme nous l'avons vu, un virus est qualifié d'infectieux lorsqu'il est capable d'infecter des cellules et de s'y répliquer. Les différentes étapes du cycle viral sont l'attachement ou la liaison du virus à la cellule hôte, son entrée et sa décapsidation, la production de protéines virales, la répllication du génome viral, l'assemblage et la maturation de nouveaux virions et enfin leur libération de la cellule infectée. Cette infection de la cellule hôte peut entraîner, ou non, l'apparition de lésions sur la cellule ou effet cytopathique (ECP). Avant l'apparition de cet ECP, la mise en évidence de l'infection peut se faire par détection du génome ou des protéines du virus dans la cellule infectée. Pour toutes ces méthodes, une lignée cellulaire permissive au virus étudié reste indispensable.

1.1- Détection de génome viral dans des cellules infectées

La détection et surtout l'augmentation de la quantité de génome viral dans une cellule infectée *in vitro* signe l'infection. En effet, la répllication du génome viral dans la cellule prouve bien l'utilisation par ce dernier de la machinerie cellulaire à son avantage et précède l'apparition d'un ECP sur la cellule et la libération de virions. La détection de génome viral et son augmentation sur quelques jours d'incubation permet donc de connaître plus rapidement le statut infectieux du virus par rapport à l'attente d'un ECP. La détection du génome viral dans les cellules hôtes peut se faire soit avec une amplification de ce génome par utilisation de la

(RT)-PCR, soit par hybridation *in situ* c'est-à-dire sans amplification. Un cas particulier dans les virus entériques pathogènes concerne les adénovirus qui sont des virus à ADN. L'expression de leur génome viral implique la transcription de l'ADN en ARNm qui sera ensuite traduit en protéines virales par la cellule. L'infectiosité des adénovirus peut donc être corrélée à la détection de leur ARNm dans les cellules infectées.

1.1.1- Détection avec amplification : RT-PCR

Cette technique associe la culture cellulaire à la RT-PCR et permet la détection de virus entériques pathogènes en seulement quelques jours (Hamza *et al.*, 2011). On parle de culture cellulaire couplée à la RT-PCR ou ICC-RT-PCR pour « integrated cell culture-reverse-transcription-polymerase chain reaction ». Après infection des cellules en culture de nouvelles particules virales vont être formées et leur matériel génétique va pouvoir être détecté de façon spécifique. La RT-PCR permet ainsi la détection du génome viral dans les cellules infectées. Cette méthode permet de diminuer le délai de réponse tout en augmentant la sensibilité de la méthode de culture initialement utilisée. La **figure 19** présente les étapes de l'ICC-RT-PCR. Tout d'abord, l'échantillon est inoculé sur une monocouche de cellules qui sont ensuite lavées pour éliminer les particules virales non adhérentes aux récepteurs cellulaires. Après quelques heures ou quelques jours d'incubation suivant le virus recherché, une extraction des acides nucléiques est réalisée sur les cellules et le génome viral est recherché par RT-PCR. La quantité de génome viral détecté sera comparée à celle présente immédiatement après l'infection (T_0). En effet, c'est l'augmentation de la quantité de génome viral qui signe la réplication virale et donc l'infection.

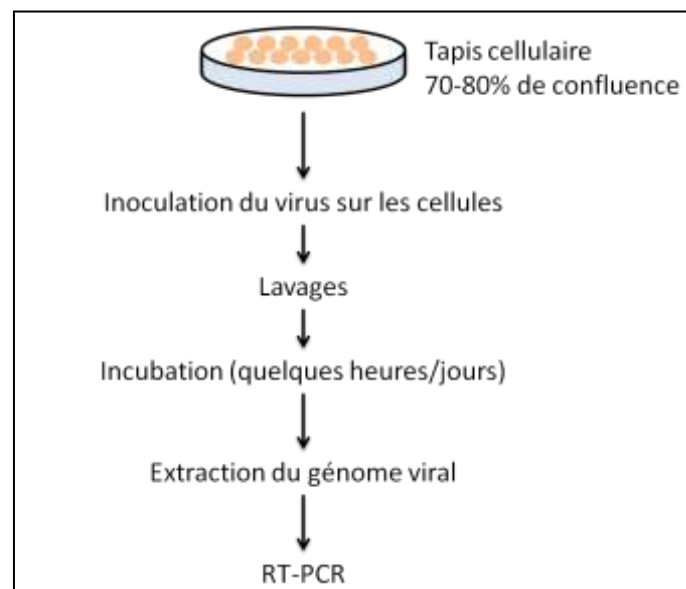


Figure 19 : Principe de la culture cellulaire couplée à la RT-PCR

Reynolds *et al.* (1996) ont effectué le premier test d'ICC-RT-PCR pour détecter des entérovirus dans le milieu hydrique. Grâce à cette méthode, la présence de virus infectieux

peut être confirmée en 24h seulement, comparé à trois jours ou plus par culture cellulaire seule. Ce gain de temps est un avantage pour l'analyse des échantillons environnementaux.

Li *et al.* (2010b) ont mis au point une technique d'ICC-RT-qPCR pour la détection de rotavirus. Les auteurs utilisent ici des cellules MA-104 pour la prolifération virale. Après incubation, l'ARN viral est extrait de la monocouche cellulaire et analysé par RT-qPCR. Les limites de détection obtenues dépendent de la durée d'incubation. Ainsi, après un jour d'incubation la limite de détection est de 2 UFP/mL et cette limite passe à 0,2 UFP/mL après deux jours d'incubation. Ces limites sont meilleures que celle obtenue par la culture cellulaire seule qui est de 1 UFP/mL après sept jours d'incubation.

Li *et al.* (2010b) ont également testé la capacité de cette méthode à différencier les particules virales infectieuses et non infectieuses. Ainsi, lors d'une inactivation de rotavirus par exposition à une température de 95°C, les quantités de génome détectées par ICC-RT-PCR chutent rapidement après une minute d'exposition et deviennent indétectables après cinq minutes contrairement à la quantité de génome détectée par RT-PCR seule qui reste inchangée même après 10 minutes d'exposition à 95°C. D'autres auteurs se sont également intéressés à l'utilisation de l'ICC-RT-PCR pour évaluer l'inactivation virale. Ainsi, Blackmer *et al.* (2000) utilisent l'ICC-RT-PCR sur des cellules BGM pour évaluer l'inactivation du poliovirus par le chlore. D'après l'analyse par culture cellulaire seule, deux minutes de contact avec 0,5 mg de chlore/L entraînent une inactivation complète du poliovirus pour une concentration initiale de $2,3 \cdot 10^2$ UFP/mL. En utilisant l'ICC-RT-PCR, les auteurs détectent toujours du virus infectieux après 8 minutes de contact avec le chlore. Selon cette méthode, 10 min de contact avec le chlore à 0,5 mg/L sont nécessaires pour inactiver totalement le poliovirus. Ces résultats d'ICC-RT-PCR sont confirmés par un second passage en culture cellulaire, les cellules du premier passage sont lysées et leur surnageant est déposé sur une nouvelle culture cellulaire. Cette culture cellulaire en « double passage » permet l'observation d'un ECP même après 8 minutes de contact entre le virus et le chlore. La culture cellulaire utilisée seule semble surestimer l'inactivation virale et l'ICC-RT-PCR est une méthode sensible et rapide pour détecter les virus infectieux après une inactivation au chlore. Li *et al.* (2009) ont étudié quant à eux la résistance du rotavirus aux UV en comparant l'ICC-RT-PCR, la culture cellulaire et la RT-qPCR. La culture cellulaire conventionnelle sous-estime ici aussi la dose d'UV nécessaire pour obtenir un certain niveau d'inactivation. La RT-qPCR seule n'est pas corrélée à l'infectiosité du virus, du génome viral est toujours détecté après l'inactivation de la totalité des virions. L'ICC-RT-PCR apparaît comme une méthode plus adaptée que la RT-PCR classique et plus rapide que la culture cellulaire seule pour estimer la résistance du rotavirus aux UV.

En ce qui concerne l'application de l'ICC-RT-PCR à des échantillons environnementaux, Chapron *et al.* (2000) l'utilisent pour détecter des astrovirus, entérovirus et adénovirus 40 et 41 lors d'une analyse de 29 échantillons d'eaux de surface. L'ICC-(RT)-PCR et la culture cellulaire seule sont réalisées sur une lignée cellulaire CaCo-2 pour les astrovirus et sur une lignée BGM pour les adénovirus et entérovirus. L'incubation est de 5 jours à 37°C pour les deux méthodes. Par ICC-(RT)-PCR, les auteurs ont trouvé 51,7% des échantillons positifs aux astrovirus, 58,6% positifs aux entérovirus et 48,3% positifs à la présence d'adénovirus. La culture cellulaire seule ne détecte que 17% d'échantillons positifs,

tous virus confondus. Pour la recherche de rotavirus infectieux dans l'environnement, Li *et al.* (2010b) ont effectué des analyses comparatives sur 24 échantillons d'eaux usées. Des rotavirus sont trouvés dans 42% des échantillons en utilisant l'ICC-RT-qPCR contre 21% pour la culture cellulaire seule après 2 jours d'incubation. Les concentrations en rotavirus de cet effluent ont été estimées entre 1 et 30 UFP/L grâce à l'ICC-RT-PCR. Seulement 12% des échantillons sont positifs après analyse par RT-qPCR seule, ce faible pourcentage peut être dû à la présence d'inhibiteurs de la RT-qPCR dans les échantillons environnementaux ainsi qu'à la faible concentration virale dans l'environnement.

Ainsi, l'ICC-(RT)-PCR permet d'augmenter la sensibilité de détection des virus entériques infectieux par rapport à la culture cellulaire seule lors de l'analyse d'échantillons environnementaux.

Cas particulier des adénovirus :

Comme nous l'avons vu précédemment, les adénovirus sont les seuls virus entériques pathogènes ayant un génome à d'ADN. Malheureusement, la culture des adénovirus 40 et 41, responsables de gastro-entérites aiguës, nécessite 10 à 15 jours d'incubation pour l'obtention d'un ECP. Deux méthodes sont possibles avec ces virus, soit pratiquer une ICC-PCR et rechercher l'augmentation d'ADN viral, soit pratiquer une ICC-RT-PCR et rechercher la présence d'ARNm.

Ogorzaly *et al.* (2013a) couplent ainsi la culture cellulaire sur cellules 293A à la qPCR afin de détecter des adénovirus humains infectieux. Les cellules de la lignée HEK 293A permettent la croissance des adénovirus humains y compris de l'adénovirus 41. Une modification est apportée à ce protocole par rapport aux protocoles conventionnels d'ICC-PCR, il s'agit de l'extraction des acides nucléiques directement à partir des cellules infectées sans étape de congélation-décongélation comme cela est habituellement pratiqué. Ce protocole permet de détecter des virus infectieux en deux jours au lieu de cinq pour les autres protocoles d'ICC-PCR. Les adénovirus infectieux sont détectés grâce à une augmentation de la quantité de leur ADN mis en évidence dans les cellules par qPCR. Ainsi, la comparaison entre les temps T_0 et T_{48h} montre une multiplication par 100 de la quantité d'ADN d'adénovirus dans les cellules infectées. Le protocole mis en place permet d'atteindre une sensibilité de seulement 1 NPPUC/mL après deux jours d'incubation pour l'adénovirus 2 et après seulement un jour pour l'adénovirus 41. Cette méthode peut être appliquée aux échantillons environnementaux et permet la détection d'adénovirus aussi bien dans les eaux usées que les eaux de rivière. Ainsi, après deux jours d'incubation, 8 échantillons sur 8 sont positifs aux adénovirus pour une eau usée en entrée de station d'épuration et 6 sur 8 sont positifs pour de l'eau usée traitée. En ce qui concerne l'eau de rivière, 9 échantillons sur 10 sont positifs aux adénovirus. Pour la détection d'adénovirus dans les huîtres, Riggotto *et al.* (2005) ont comparé trois méthodes sur des échantillons artificiellement contaminés : la PCR conventionnelle, la nested-PCR et l'ICC-PCR. La nested-PCR est composée de deux PCR successives, avec deux couples d'amorces différents. Cette technique permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité mais augmente aussi le risque de contamination. La limite de détection trouvée par les auteurs pour la PCR conventionnelle et la nested-PCR est de $1,2 \cdot 10^2$ UFP/gramme de tissus. Cette limite passe à 1,2 UFP/gramme de tissus pour l'ICC-PCR après 3 jours d'incubation. L'ICC-PCR augmente donc la sensibilité de détection des adénovirus

dans les huîtres. Les auteurs ont également démontré la possibilité d'application de cette méthode à des échantillons environnementaux.

L'infectiosité des virus à ADN peut aussi être déterminée par la détection d'ARNm viral dans les cellules hôtes. Une étape importante de cette détection est l'ajout d'une DNase afin d'éliminer l'ADN viral et de ne détecter que l'ARNm lors de la RT-PCR. Cette technique a été développée pour permettre la détection de souches de laboratoire d'adénovirus humains infectieux de type 2 et 41 (Ko *et al.*, 2003). Les adénovirus inactivés par le chlore ou les UV sont toujours détectés par PCR classique mais comme ils n'infectent pas les cellules, il n'y aura pas de production d'ARNm et donc pas de détection par RT-PCR. Les auteurs détectent ici de l'ARNm d'adénovirus 2 dès six heures d'incubation après l'infection de 10^7 cellules par 10^6 unités infectieuses. Cette détection d'ARNm est corrélée avec la présence de virus infectieux prouvée par culture cellulaire et observation d'un effet cytopathique. La détection de l'ARNm est beaucoup plus rapide que la culture cellulaire seule. Ainsi, après 24 heures d'incubation l'ARNm de l'adénovirus 41 est détecté pour une concentration de 10^6 unités infectieuses pour 10^7 cellules. Une incubation de trois jours permet de détecter des taux aussi faibles que cinq unités infectieuses d'adénovirus 41 pour une flasque contenant 10^7 cellules de la lignée HEK 293 (Ko *et al.*, 2005). Rodríguez *et al.* (2013) ont réalisé une quantification de l'ARNm d'adénovirus 41 par ICC-RT-qPCR pour des échantillons d'eau usée. Des résultats positifs étaient observables dès trois jours alors que la culture cellulaire seule nécessite plus de 14 jours. Dans le cas des adénovirus, la détection de l'ARNm viral permet donc révéler la présence de virus infectieux dans les échantillons environnementaux.

Globalement, l'ICC-RT-PCR serait un peu moins sensible que l'ICC-PCR qui permet la détection d'une seule unité infectieuse par flasque en deux jours pour l'adénovirus 2 et en un seul jour pour l'adénovirus 41 (Ogorzaly *et al.*, 2013a). La détection de l'ARNm d'adénovirus présente par contre l'avantage de ne pas nécessiter de comparaison par rapport à une valeur obtenue à T_0 , la présence d'ARNm d'adénovirus révélant l'infectiosité des virus.

L'ICC-(RT)-PCR est aujourd'hui décrite pour la détection d'un grand nombre de virus entériques pathogènes dans le milieu hydrique : entérovirus, rotavirus, virus de l'hépatite A, astrovirus, réovirus et adénovirus (Hamza *et al.*, 2011). Cette méthode permet de diminuer le temps nécessaire à la détection de virus infectieux. Cependant, elle est coûteuse et l'étape de culture cellulaire limite le nombre de virus pouvant être détectés par cette méthode. Le couplage de la culture cellulaire à la PCR ne permet pas à l'heure actuelle de quantifier les virus infectieux, il permet uniquement de conclure à la présence ou absence de virus infectieux dans un échantillon de façon plus rapide et plus sensible que la culture cellulaire utilisée seule. La prochaine étape d'évolution de ce type de méthode serait de pouvoir quantifier les particules virales infectieuses.

1.1.2- Détection de génome viral dans des cellules infectées par hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* permet la détection du génome viral dans les cellules hôtes sans appliquer d'étape d'amplification. Cette détection est réalisée par l'hybridation d'un oligonucléotide marqué au génome viral, une émission de fluorescence sera alors détectée dans les cellules infectées. Ici ce sont des cellules fluorescentes qui seront observées après infection par le virus en utilisant la microscopie à épifluorescence ou la cytométrie en flux. Des sondes moléculaires (ou molecular beacons) sont utilisées, elles sont caractérisées par une structure en épingle à cheveux comportant un fluorochrome ou reporter à une extrémité et un quencher à l'autre extrémité. Tant que la sonde ne s'est pas hybridée à sa séquence cible, le quencher absorbe la fluorescence du reporter par un transfert d'énergie de type FRET. Lorsque la sonde s'hybride à la cible, elle s'ouvre, ce qui provoque un éloignement du quencher et du reporter. Le principe de cette méthode est présenté sur la **figure 20**. Après l'infection de la cellule par le virus, un traitement lui sera appliqué afin de rendre sa membrane perméable aux sondes moléculaires.

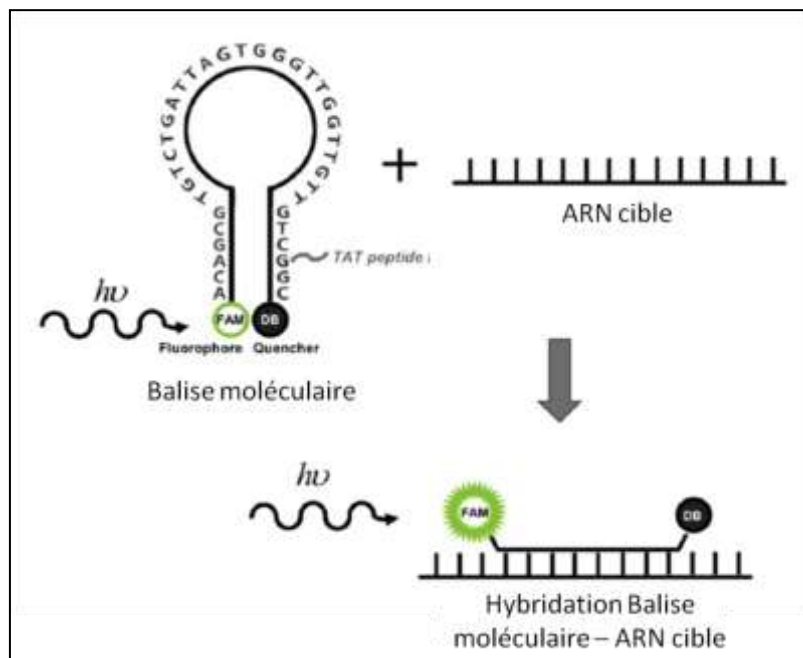


Figure 20 : Principe des sondes moléculaires (d'après Ganguli *et al.*, 2011)

La première utilisation de sondes moléculaires pour la détection de virus entériques a été réalisée par Yeh *et al.* (2008a) pour la détection du VHA sur des cellules FRhK-4 par microscopie à épifluorescence. Dans cette étude, une sonde moléculaire ciblant une région spécifique de 20 paires de bases de la région 5' non codante du VHA a été utilisée. La sonde moléculaire est internalisée dans la cellule par action de Triton X-100 à 0,1%, ce détergent permet la perméabilisation des membranes cellulaires. Les auteurs détectent une particule virale infectieuse pour 0,5 mL après six heures d'incubation. Cet essai a permis de diviser par 32 le temps de détection par rapport à la culture cellulaire seule qui nécessite huit jours d'incubation, tout en gardant une capacité quantitative similaire. Les auteurs ont aussi montré que lorsqu'ils utilisent une sonde moléculaire non spécifique d'une séquence cible, la

fluorescence observée est nulle. Cependant, un problème se pose lorsqu'une surveillance à long terme de la réplication virale est nécessaire, de faux positifs peuvent alors être observés. Ceci peut être dû à la faible demi-vie de ces sondes qui est d'environ 30 minutes et s'explique par leur dégradation rapide par les nucléases cellulaires. Pour remédier à ce problème, une sonde moléculaire résistante aux nucléases a été développée (Yeh *et al.*, 2008b), elle contient des bases modifiées par greffage de groupements 2' O-méthyl et des liaisons phosphorothioate internucléotidiques ce qui augmente sa résistance vis-à-vis des enzymes cellulaires. Afin d'améliorer l'internalisation de la sonde moléculaire, celle-ci peut être couplée à un peptide TAT qui dérive du VIH et qui est capable de pénétrer dans les cellules. Ce peptide permet de surmonter la barrière lipophile des membranes cellulaires et de faire entrer des molécules dans les cellules. Le couplage à ce peptide TAT permet une internalisation d'environ 100% des sondes moléculaires en 15 minutes dans des cellules BGM (Yeh *et al.*, 2008b). Ganguli *et al.* (2011) ont mis au point une sonde moléculaire couplée à un peptide TAT pour la détection du norovirus murin 1 (MNV-1) utilisé comme modèle du norovirus humain. Cette méthode permet la détection d'une seule particule virale infectieuse 6 heures seulement après l'infection, soit une diminution d'un facteur 12 du temps habituellement nécessaire pour la détection et la quantification de ce virus par comptage des plages de lyse. Dunams *et al.* (2012) ont réalisé une étude sur la détection de l'adénovirus humain de sérotype 2 et des échovirus grâce à des sondes moléculaires résistantes aux nucléases et couplées à un peptide TAT. Des cellules A549 sont infectées simultanément par ces deux virus avec et la détection se fait par microscopie à épifluorescence. Les auteurs détectent une particule virale infectieuse d'adénovirus après seulement sept heures d'incubation et 100 particules infectieuses après seulement deux heures. Les résultats montrent que la majorité des cellules sont contaminées par les deux virus. Les sondes moléculaires couplées à une détection par microscopie à épifluorescence permettent ainsi de suivre en temps réel l'infection des cellules par un virus.

La cytométrie en flux permet également de détecter les cellules infectées marquées par une sonde moléculaire. Cette technique permet de faire défiler des particules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. La lumière réémise soit par diffusion soit par fluorescence permet de classer la population cellulaire selon plusieurs critères comme la taille ou l'émission de fluorescence et de la trier. C'est une méthode rapide qui permet la détection à haut débit et la quantification des cellules infectées pour de nombreuses populations cellulaires. Sivaraman *et al.* (2013) couplent la cytométrie en flux à une sonde moléculaire liée à un peptide TAT pour la détection de cellules BGM infectées par du poliovirus. Une fluorescence est détectée dès 30 secondes après l'infection. La sensibilité de la méthode permet de détecter une cellule infectée pour 10 000 cellules observées. Cette méthode a donc un grand potentiel, elle permet la détection de cellules infectées par un inoculum contenant une très faible concentration en virus et elle peut être automatisée contrairement à la microscopie à épifluorescence. Cependant, elle reste encore coûteuse et nécessite des opérateurs formés à son utilisation.

Toutes ces études utilisant les sondes moléculaires ont établi une corrélation entre le nombre de particules virales infectieuses et le nombre de cellules infectées.

1.2- Détection de protéines virales dans les cellules infectées

Les protéines virales nouvellement formées dans une cellule infectée peuvent également signer l'infectiosité virale. Deux types de protéines peuvent être recherchés : les protéines structurales et les protéines non structurales. Toutes les protéines virales incorporées dans la particule virale sont considérées comme des protéines de structure, même pour celles ne participant pas à la morphologie ou à la stabilité de la particule, on y retrouve donc entre autres les protéines de capsid. Les protéines non structurales sont des protéines qui sont exprimées dans la cellule infectées mais qui ne seront pas incorporées dans la particule virale nouvellement formée.

1.2.1- Détection de protéines virales structurales

La détection des protéines structurales virales dans la cellule hôte infectée fait appel à des anticorps spécifiques à ces protéines, marqués par un colorant fluorescent. On parle alors d'immunofluorescence assay ou IFA.

Dès 1982, des auteurs décrivent cette technique d'immunofluorescence pour la détection de rotavirus infectieux dans les eaux usées (Smith et Gerba, 1982), la détection se fait par microscopie à épifluorescence. La réplication des virus s'effectue sur des cellules MA104. C'est une immunofluorescence dite indirecte qui est employée ici, c'est-à-dire que deux anticorps différents sont utilisés. L'internalisation des anticorps se fait après fixation des cellules au méthanol à -4°C pendant cinq minutes puis leur réhydratation par du PBS et ajout des anticorps. Le premier anticorps est obtenu après immunisation d'un cochon d'Inde à une souche de rotavirus SA11 (souche simienne). Cet anticorps reconnaît les rotavirus simiens, humains, bovins et porcins. Le second anticorps est une immunoglobuline de chèvre « anti-cochon d'Inde » marquée avec de l'isothiocyanate de fluorescéine qui se fixera sur le premier anticorps et permettra la détection des cellules infectées après exposition à une lumière de 450 à 490 nm de longueur d'onde. L'immunofluorescence permet ici la détection de très faibles concentrations allant jusqu'à 10 particules virales infectieuses par litre après 24 heures d'incubation. Cette méthode est aussi utilisée pour la détection de réovirus (Ridinger *et al.*, 1982), elle permet de détecter des concentrations de l'ordre de 10^4 particules virales infectieuses par litre. L'efficacité de l'essai dépend de la sensibilité de la lignée cellulaire utilisée vis-à-vis des réovirus. L'IFA permet une détection plus sensible, mais aussi plus rapide que la culture cellulaire seule avec une détection des réovirus dès 10 heures d'incubation contre quatre à sept jours pour la culture cellulaire. Plus récemment, l'IFA a été décrite pour la détection d'adénovirus humains infectieux des sérotypes 2 et 41 et du polyomavirus JC dans des échantillons d'eaux usées et d'eau de rivière (Calgua *et al.*, 2011). Cette étude compare l'IFA aux autres techniques couramment utilisées : méthode des plages de lyse, détermination du titre infectieux en TCID₅₀, qPCR. L'IFA se révèle plus sensible pour la détection des particules virales infectieuses que les autres méthodes utilisant la culture cellulaire. Elle donne des résultats négatifs après inactivation du virus par les UV ou la chaleur prouvant bien sa capacité à ne détecter que les particules virales infectieuses. La lecture optimale s'effectue au quatrième jour pour l'adénovirus humain de sérotype 2 et au

bout de huit jours pour l'adénovirus 41 et le polyomavirus. L'IFA possède une sensibilité de détection des adénovirus 10 fois supérieure à celle obtenue par les méthodes de culture cellulaire.

Comme pour les sondes moléculaires vues précédemment, la détection de l'immunofluorescence peut également être réalisée par cytométrie en flux. Barardi *et al.* (1998) et Abad *et al.* (1998) utilisent la cytométrie en flux pour détecter des cellules CaCo-2 et MA-104 contaminées par du rotavirus. Cette méthode permet de détecter la présence de rotavirus infectieux dans l'environnement tout en étant rapide même pour les virus à croissance lente. Cette méthode permet la détection de rotavirus dans des échantillons environnementaux aussi bien que dans des échantillons cliniques (Abad *et al.*, 1998). Pour la détection d'adénovirus, des auteurs ont utilisé des anticorps marqués dirigés contre l'hexon qui est une protéine de la capsid (Li *et al.*, 2010a). La détection de quantités aussi faibles qu'une unité infectieuse par puits contenant 3.10^5 cellules HEK-293A est possible après trois jours d'incubation pour des adénovirus des sérotypes 2, 5 et 41.

L'immunofluorescence associée à la culture cellulaire est donc une méthode rapide, sensible, spécifique et standardisable pour la détection des virus infectieux dans les échantillons d'eau, elle reste cependant coûteuse du fait de l'utilisation d'anticorps spécifiques du virus recherché.

1.2.2- Détection de protéines virales non structurales

Pour se libérer du besoin d'anticorps coûteux, des étapes laborieuses d'immunomarquage et de la difficulté d'obtenir l'internalisation de l'anticorps dans la cellule, un système de FRET ou Transfert d'énergie par résonance en fluorescence a été décrit par Hwang *et al.* (2006) pour la détection de protéines virales non structurales. Le principe est identique à celui décrit pour la PCR en temps réel, mais ici le FRET s'effectue entre deux protéines, la CFP (Cyan Fluorescent Protein) et l'YFP (Yellow Fluorescent Protein). Une interruption du FRET entre ces deux protéines a lieu après action de la protéase virale, elle indique donc la synthèse de cette protéase virale et l'infection de la cellule (**figure 21**). La cellule infectée émet alors une fluorescence à 475 nm.

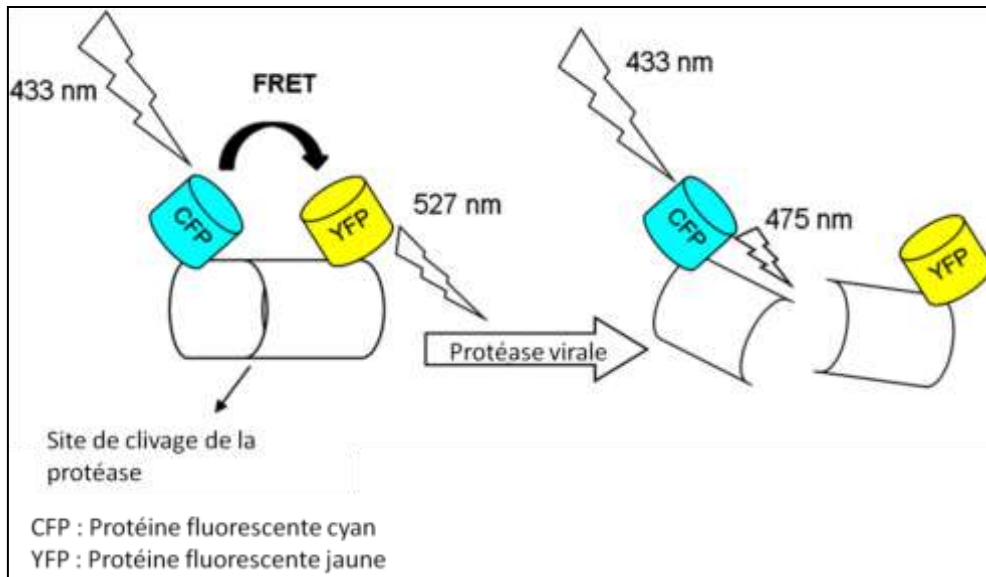


Figure 21 : Principe du FRET appliqué à la détection d'une protéase virale dans des cellules infectées (d'après Hamza *et al.*, 2011)

Hwang *et al.* (2006) détectent des entérovirus infectieux en utilisant des cellules BGМК modifiées génétiquement pour exprimer un peptide qui sera clivé par la protéase virale 2A. Cette protéase 2A entre en activité lors de l'infection virale et clive le peptide provoquant l'émission de fluorescence. La fluorescence émise dans la cellule infectée est détectée par microscopie à épifluorescence. Ce couplage FRET-microscope à épifluorescence permet une détection rapide, en 7,5 heures, de faibles quantités allant jusqu'à moins de 10 unités infectieuses d'entérovirus pour 10^5 cellules BGМК. Cette technique de FRET possède un même niveau de sensibilité que la technique de culture cellulaire avec comptage des plages de lyse (Hwang *et al.*, 2007), elle est rapide et permet la détection de faibles quantités de virus infectieux.

La cytométrie en flux peut aussi être utilisée pour la détection de la fluorescence (Cantera *et al.*, 2010). Ici les auteurs utilisent également des cellules BGМК exprimant une protéine CFP reliée à une protéine YFP par un site de clivage. Ce site est reconnu par la protéase du poliovirus. La combinaison à la cytométrie en flux permet de déterminer le nombre de cellules infectées présentant une augmentation du rapport CFP/YFP. Après seulement cinq heures post-infection, un nombre significatif de cellules est déjà détecté par la cytométrie en flux. Pour démontrer le potentiel de cette méthode appliquée à l'environnement, des échantillons d'eau avec un titre connu en poliovirus 1 ont été analysés. L'essai, basé sur l'association FRET-cytométrie en flux, montre un niveau de sensibilité semblable à un essai de culture cellulaire seule.

1. 3- Détection de modifications cellulaires lors de l'infection virale

Lors de l'infection d'une cellule par un virus, celle-ci va subir différentes modifications. Ces modifications peuvent être recherchées par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier ou FTIR. La FTIR est basée sur l'absorption d'un rayonnement par un échantillon déposé sur

un cristal faiblement absorbant avec un indice de réfraction élevé. Le faisceau infrarouge va pénétrer le cristal et être réfléchi plusieurs fois à l'interface cristal-échantillon. A chaque réflexion, le faisceau pénètre sur une courte distance dans l'échantillon en provoquant des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques de l'échantillon. C'est donc une réelle signature chimique de l'échantillon qui est obtenue sous la forme de spectres infrarouges. La **figure 22** présente le principe de cette méthode d'identification qui peut être qualitative et quantitative.

Un protocole associant la FTIR à la culture cellulaire a été utilisé par Lee-Montiel *et al.* (2011) pour détecter l'infection de cellules BGMK par le poliovirus. L'absorbance spécifique suit les changements des composants cellulaires (lipides, protéines, acides nucléiques, sucres) après infection par le virus. Différents titres infectieux compris entre 0 à 10^6 UFP/mL ont été testés avec un suivi sur une à 12 heures post-infection. Si les premiers changements de spectre suite à l'infection sont observés dès deux heures d'incubation, les meilleures performances sont obtenues après huit heures d'incubation et permettent une meilleure prédiction du titre viral. Des modèles de régression ont été développés afin de corréliser les changements de spectre avec la durée de l'infection, les meilleurs résultats sont obtenus pour une observation réalisée 8 heures post-infection. Les auteurs ont remarqué que la mesure spectroscopique des changements des composants cellulaires est plus précise pour de faibles concentrations virales de l'ordre de 10^1 à 10^2 UFP/mL, le processus d'infection virale y est sûrement plus uniforme.

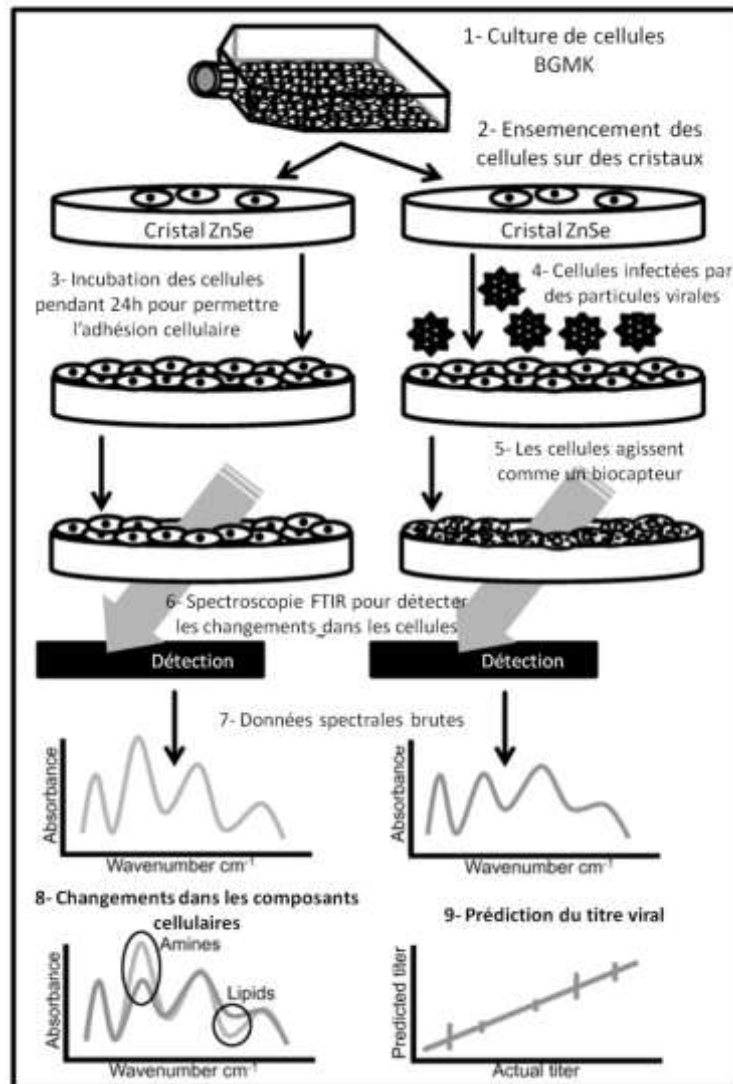


Figure 22 : Principe de la FTIR couplée à la culture cellulaire (d'après Lee-Montiel *et al.* 2011)

Cette méthode permet une détection des virus infectieux par les changements qu'ils entraînent dans leur cellule hôte. Cependant, si elle permet de conclure à l'infection ou non de la cellule hôte, elle ne permet pas l'identification du virus.

1.4- Adhésion virale sur cellules permissives

La fixation du virus à un récepteur viral cellulaire est la première étape de l'infection, elle peut donc être utilisée pour la détection de particules virales infectieuses. Seules les particules virales avec une capsid fonctionnelle devraient se fixer à la cellule hôte.

Les particules virales sont mises en contact de cellules permissives, des lavages sont ensuite effectués pour éliminer les particules virales non adhérentes aux cellules et la détection des virus adhérents aux cellules est réalisée par RT-PCR. Seules les particules virales ayant adhéré à leur cellule hôte, considérées comme potentiellement infectieuses sont alors détectées. Li *et al.* (2011) ont étudié l'adhésion du norovirus murin 1 (MNV-1) sur les lignées

cellulaires RAW 264.7 et GD1a, ainsi que celle du norovirus humain sur des cellules Caco-2 et des cellules de mucine gastrique de porc. La liaison sur BSA (albumine de sérum de bœuf) est également testée pour évaluer la liaison non spécifique. Les auteurs notent une meilleure discrimination de l'infectiosité grâce à la liaison cellulaire. En effet, les quantités de génome de MNV-1 détectées après adhésion sur cellules hôtes sont inférieures de deux \log_{10} à celles détectées par RT-PCR seule. Le nombre de copies de génome détectées après adhésion sur cellules hôtes est supérieur d'un \log_{10} à la quantité de virus infectieux trouvée par culture cellulaire. En ce qui concerne le norovirus humain, la quantité de génome détectée après adhésion sur cellules hôtes est inférieure de deux à trois \log_{10} à celle détectée par RT-PCR seule. Les auteurs ont ensuite comparé le taux d'adhésion sur cellules hôtes, la culture cellulaire et la RT-PCR après exposition soit à un traitement thermique de 70°C pendant trois minutes, soit au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à 2,1% pendant cinq minutes. Ils observent une diminution du titre de MNV-1 supérieure à 6 \log_{10} par culture cellulaire, alors que la diminution mesurée par RT-PCR et adhésion sur cellules hôtes est inférieure à 3 \log_{10} . La comparaison entre l'adhésion sur cellules hôtes et sur BSA montre toutefois qu'il y a une plus forte diminution de la liaison spécifique par rapport à la liaison non spécifique après inactivation, quel que soit le traitement employé.

L'étude de l'adhésion du virus à sa cellule hôte pourrait permettre de s'approcher de l'étude de l'infectiosité virale. En revanche, l'adhésion à la cellule n'est que la première étape de l'infection, elle n'est donc pas le reflet stricte de la capacité du virus à se multiplier dans sa cellule hôte et peut, de par ce fait, entraîner une surestimation de l'infectiosité.

Les méthodes associées à l'infectiosité sur culture cellulaire se révèlent intéressantes notamment en termes de rapidité et de sensibilité de détection, mais elles ne permettent pas de détecter des virus importants en santé publique tels que les norovirus et nécessitent la mise en œuvre de techniques de culture cellulaire.

2- Evaluation de l'intégrité de la capsid virale

L'intégrité de la capsid peut constituer une approche pour estimer l'infectiosité des particules virales. Cette intégrité peut être définie de deux façons, soit il s'agit de son intégrité de structure et donc de son rôle de protection du génome viral, soit il peut s'agir de l'intégrité de ses fonctions antigéniques. Nous allons tout d'abord nous intéresser à l'intégrité de la structure de la capsid avec l'utilisation de traitement enzymatique et d'agents intercalants, puis nous étudierons les méthodes qui s'intéressent aux fonctions antigéniques de cette capsid.

2.1- Traitement enzymatique

Une des méthodes d'évaluation de l'intégrité de la capsid virale est basée sur l'application d'un traitement enzymatique avant détection du génome viral. Deux enzymes peuvent être utilisées, une protéase qui va s'attaquer aux capsides fragilisées et une RNase capable de

dégrader le génome libre ou contenu dans des particules aux capsides fragilisées. Les capsides des virus intacts sont supposées ne pas être endommagées par les enzymes, le génome reste donc intact et peut ensuite être détecté par RT-PCR. Le principe de ce traitement enzymatique est présenté sur la **figure 23**.

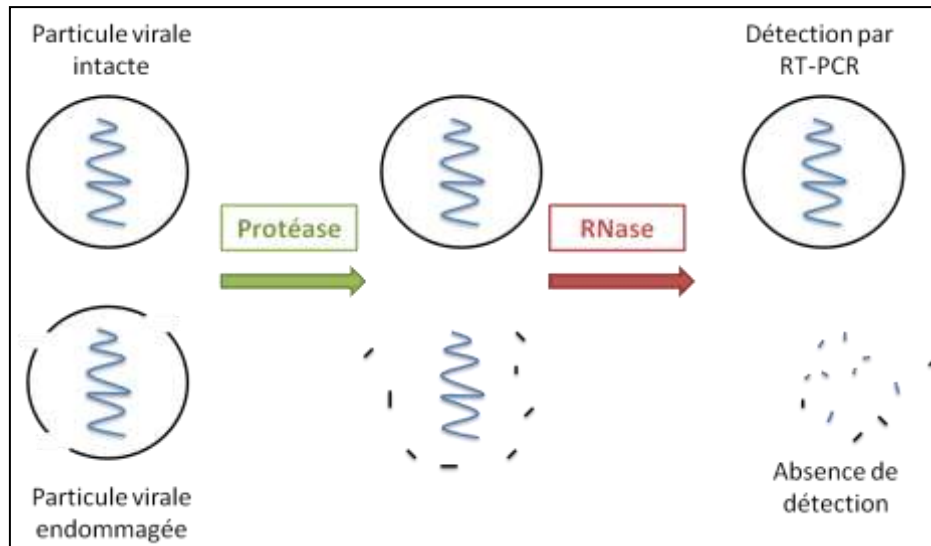


Figure 23 : Principe du traitement enzymatique avant détection par PCR

Nuanualsuwan et Cliver (2002) furent les premiers à proposer un traitement enzymatique d'échantillons contenant des virus entériques pathogènes. Les auteurs ont évalué ce traitement sur des échantillons contaminés par du virus de l'hépatite A, du poliovirus 1 et un calicivirus félin avec un titre initial d'environ 10^3 UFP/mL. Les virus ont été inactivés par trois traitements : la température avec une exposition à 72°C pendant 56 secondes pour le VHA, 17 s pour le poliovirus et 23 s pour le calicivirus, les UV avec des doses de 252 mWs/cm^2 , 180 mWs/cm^2 et 357 mWs/cm^2 et l'hypochlorite de sodium à des valeurs de CT (concentration x temps de contact) de 21 mg/L.min, 2,15 mg/L.min et 1,2 mg/L.min. Ces traitements entraînent une inactivation complète des échantillons soit une perte de trois \log_{10} en infectiosité. Le traitement des échantillons par une protéinase K et une ribonucléase pendant 30 minutes à 37°C aboutit à des résultats négatifs par RT-PCR. Les mêmes auteurs, en 2003, montrent que ce traitement enzymatique se révèle utile pour des *Picornaviridae* comme le virus de l'hépatite A et le poliovirus 1, ainsi que pour un calicivirus félin inactivés après une exposition à 72°C entraînant une perte de trois \log_{10} en infectiosité. Par contre, l'inactivation de ces mêmes virus par une température de 37°C provoquant également une perte de trois \log_{10} en infectiosité n'entraîne pas de diminution du signal par RT-PCR (Nuanualsuwan et Cliver, 2003). Ainsi, cette méthode enzymatique ne semble pas applicable pour des échantillons environnementaux dans lesquels les virus entériques sont exposés à des températures généralement inférieures à 37°C .

Pecson *et al.* (2009) ont étudié l'inactivation par la chaleur à 72°C , l'oxygène singulet ou les radiations UV d'un bactériophage utilisé comme modèle des virus entériques, le phage MS2. En partant d'un échantillon contenant 10^{10} UFP/mL et après une exposition de trois minutes à 72°C , les auteurs n'observent pas de diminution du nombre de copies de génome

détectées par RT-qPCR. En revanche, la culture cellulaire révèle une perte d'infectiosité supérieure à $8 \log_{10}$. L'application d'un traitement par RNase avant la RT-PCR permet quant à lui de diminuer la quantité de génome détectée de $5,2 \log_{10}$ au maximum par rapport à la RT-qPCR seule. Après une inactivation par exposition à l'oxygène singulet à une concentration de 4.10^{-12} mol/L, la perte de matériel génétique reste inférieure à $4 \log_{10}$ même après une exposition de 180 minutes alors que la perte d'infectiosité relevée par culture cellulaire est totale soit environ $10 \log_{10}$. La quantité de génome détectée reste la même avec ou sans traitement enzymatique. L'exposition aux UV à une dose de 5900 J/m^2 entraîne une perte d'infectiosité supérieure à $8 \log_{10}$, la perte au niveau du matériel génétique trouvée par la RT-qPCR seule est de l'ordre de $2 \log_{10}$ et passe à $4 \log_{10}$ lorsqu'il y a traitement enzymatique. Pour les auteurs, l'ajout d'un traitement enzymatique par une RNase permettrait de diminuer la quantité de génome détectée par rapport à la RT-qPCR seule. Baert *et al.* (2008) ont travaillé sur un modèle du norovirus humain, le norovirus murin 1 (MNV-1) à une concentration initiale de 10^7 équivalent UFP/mL. A la différence de Pecson *et al.* (2009), ils n'observent pas de diminution de la quantité de génome de ce virus après exposition à une température de 80°C pendant au minimum 150 secondes et application d'un traitement enzymatique par protéinase K et RNase. Une forte concentration en génome, supérieure à 10^6 équivalents UFP/mL, est toujours détectée alors qu'aucune particule virale infectieuse n'est mise en évidence par culture cellulaire.

Pecson *et al.* (2009) ont appliqué le traitement enzymatique à des échantillons d'eau du lac de Genève. Après une filtration sur une membrane de $0,45 \mu\text{m}$ de porosité, les échantillons d'eau du lac ont été artificiellement contaminés par 10^8 UFP/mL de bactériophage MS2. Ces échantillons ont ensuite été exposés aux UV à une dose de 3200 J/m^2 . Une solution tampon contenant 10^8 UFP de MS2 par mL est utilisée comme témoin. Les auteurs relèvent que bien que la perte d'infectiosité soit totale, la quantité de génome détectée par RT-qPCR avec ou sans traitement enzymatique ne diffère pas entre les échantillons et le témoin. Les constantes des vitesses d'inactivation pour la RT-qPCR avec et sans traitement enzymatique ne sont pas différentes significativement entre les échantillons et le témoin. Le traitement enzymatique par RNase permet de diminuer de façon identique les quantités de génome détectées dans le témoin de laboratoire et dans les échantillons environnementaux. Les auteurs concluent que les résultats obtenus en laboratoire avec le traitement par RNase suivie par une RT-qPCR semblent directement transférables aux échantillons environnementaux.

Li *et al.* (2012) ont comparé l'utilisation de RNases et la liaison à la cellule hôte avant détection par RT-PCR pour la détection de MNV-1. La lignée cellulaire RAW 264.7 était utilisée pour l'évaluation de la liaison cellulaire. Après inactivation à la chaleur à 70°C ou 85°C pendant deux minutes, la quantité de génome détectée est plus faible suite au test d'adhésion sur cellule hôte qu'après traitement avec une RNase. Les auteurs concluent qu'il est préférable de s'intéresser au maintien des fonctions de la capsid plutôt qu'à son intégrité.

Un traitement enzymatique appliqué avant extraction du génome viral et quantification par (RT)-PCR permet dans certains cas de diminuer la quantité de génome détectée, mais cette diminution n'est pas équivalente à la perte d'infectiosité. Ce type de traitement peut toutefois s'avérer intéressant pour des traitements puissants provoquant des dégâts majeurs au niveau de la capsid. Par contre, l'utilisation d'un traitement enzymatique semble

difficilement applicable à la détection de virus entériques infectieux dans des échantillons environnementaux.

2.2- Agents intercalants

Des travaux récents se sont intéressés à l'utilisation d'agents intercalants pour l'estimation de l'intégrité de la capsid virale. Les agents intercalants utilisés pour ces expérimentations sont l'éthidium-monoazide (EMA) et le propidium-monoazide (PMA). Lorsque ces molécules sont fixées au génome, elles inhibent son amplification et donc sa détection par PCR. Ces molécules ont tout d'abord été expérimentées sur des bactéries et protozoaires. Le principe d'action de ces agents intercalants pour la distinction entre virus endommagés et virus infectieux est présenté sur la **figure 24**. Ces agents intercalants seraient capables de pénétrer dans les particules virales uniquement si leur capsid est endommagée. Ils se lient ensuite aux acides nucléiques par une liaison rendue covalente par photoactivation (Fittipaldi *et al.*, 2012). Cette fixation covalente au génome empêche ensuite sa dénaturation lors de la PCR et le rend indétectable. La distinction entre virus infectieux et non infectieux est alors basée sur l'intégrité de la capsid. La liaison covalente de l'agent intercalant aux acides nucléiques se fait par exposition à la lumière. Un groupement azide est alors convertit en radical hydrogène hautement réactif (DeTraglia *et al.*, 1978) qui réagit avec toutes les molécules organiques à sa proximité. La réaction avec l'ADN ou l'ARN est supposée se produire avec une grande probabilité vu la proximité spatiale entre l'agent intercalant et le génome. Il a été prouvé que cette modification inhibe fortement l'amplification du génome (Nocker *et al.*, 2006 ; Rudi *et al.*, 2005). De plus, l'excès d'agent intercalant réagit avec les molécules d'eau et n'est plus réactif ce qui prévient une éventuelle réaction avec les acides nucléiques lors de l'extraction du génome des virus intacts (Graves *et al.* 1981 ; Nocker et Camper, 2009).

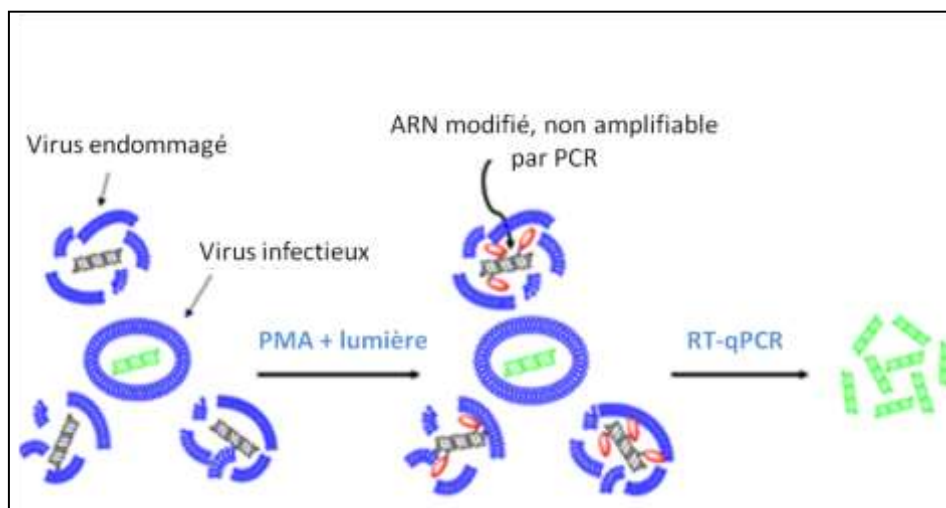


Figure 24 : Mode d'action des agents intercalant EMA ou PMA (d'après Nocker *et al.*, 2006).

Le PMA et l'EMA ont été tout d'abord utilisés pour la détection de bactéries et de protozoaires infectieux. Rudi *et al.* (2005) utilisent l'EMA-PCR pour la détection de *Campylobacter jejuni*. La quantification des bactéries vivantes et mortes par cette méthode est fiable quelles que soient les conditions testées : échantillons environnementaux, survie sur les aliments, survie après désinfection ou traitement antibiotique. Par contre, Flekna *et al.* (2007) qui utilisent l'EMA-PCR pour la détection de *Campylobacter jejuni* et *Listeria monocytogenes* notent que l'utilisation de l'agent intercalant sous-estime la viabilité des bactéries par rapport aux méthodes de culture. L'EMA serait capable de pénétrer dans des bactéries viables. Nocker *et al.* (2007) testent la PMA-PCR sur un mélange de communautés bactériennes, comprenant des cellules intactes et non intactes. Ils concluent que l'utilisation du PMA peut se faire sur des échantillons environnementaux et qu'il inhibe l'amplification de l'ADN des bactéries non viables. En revanche, le PMA ne pourrait pas être utilisé pour évaluer la viabilité bactérienne après exposition aux UV qui provoquent des dommages au niveau de l'ADN sans affecter directement la paroi bactérienne (Nocker *et al.*, 2007). L'utilisation du PMA couplé à une qPCR pour la détection de *Bacteroides fragilis* permet de fournir des informations plus précises que la PCR seule sur la prédiction du risque sanitaire lié à une contamination fécale (Bae et Wuertz, 2009). Le PMA a aussi été employé pour déterminer la viabilité d'oocystes de *Cryptosporidium* (Brescia *et al.*, 2009). L'agent intercalant pénètre ici uniquement dans les oocystes morts et empêche l'amplification de leur ADN par PCR.

Quelques études se sont intéressées à la possibilité de transposer cette méthode aux virus. Graiver *et al.* (2010) ont étudié ainsi le taux de survie du virus de la grippe aviaire dans l'eau en comparant la culture cellulaire avec un titrage des virus infectieux et la RT-qPCR avec ou sans prétraitement par l'EMA. La culture cellulaire donne des titres beaucoup plus faibles que la PCR et aucune différence significative n'est observée entre les quantités de génome détectées par qPCR avec ou sans prétraitement par EMA. L'EMA semble ici incapable de discriminer les particules virales infectieuses et non infectieuses. Ceci peut être lié à un problème d'entrée de l'agent intercalant dans le virus ou à un défaut de fixation sur le génome viral. Cette dernière hypothèse semble exclue car l'utilisation d'EMA sur du génome extrait entraîne bien une absence de détection de l'ARN viral. Cependant les auteurs soulignent le fait que l'ARN extrait peut avoir formé des structures secondaires voire des brins doubles partiels en solution, facilitant la liaison de l'agent intercalant. Ainsi, l'EMA pourrait se fixer sur l'ARN en solution mais être incapable de se fixer sur le génome à l'intérieur de capsides inactivées du virus de la grippe aviaire.

La première utilisation du PMA sur des virus entériques est décrite par Parshionikar *et al.* (2010). Les expérimentations sont réalisées sur le coxsackievirus B5, le poliovirus, l'échovirus 7 et le norovirus humain exposés à des traitements thermique à 72, 37 et 19°C ou à l'hypochlorite de sodium. Les échantillons étudiés contiennent tous une concentration en virus de 10³ UFP/mL. Lors de l'inactivation à 19°C et 37°C, l'infectiosité est analysée toutes les semaines par culture cellulaire jusqu'à l'obtention d'une inactivation totale. Lors de l'inactivation à 72°C, des prélèvements sont effectués au bout de 5 min, 5,5 min, 6 min et 6,5 min et l'infectiosité est testée par culture cellulaire. Il en est de même pour l'inactivation par l'hypochlorite de sodium, les virus sont exposés à une concentration en chlore libre de 0,5

mg/L pendant une durée de 0,5 min, 1 min, 2 min, 5 min, 10 min et 20 min. Le premier échantillon de chaque virus pour lequel une inactivation totale est observée est étudié. En ce qui concerne le norovirus, puisque sa culture est impossible, les auteurs ont estimé que 4 semaines d'exposition à 19°C et 2 semaines à 37°C entraînaient une perte totale d'infectiosité. Le PMA permettrait la discrimination entre les particules virales infectieuses et non infectieuses lorsque les virus sont exposés à une température de 72°C. Ainsi, dès 30 secondes d'exposition à 72°C, les auteurs notent une absence de détection du génome de norovirus après utilisation du PMA. De même, le génome viral n'est pas détecté pour le poliovirus, le coxsackievirus B5, le norovirus et l'échovirus après une inactivation à la chaleur aussi bien à 72°C et 37°C qu'après action d'hypochlorite de sodium. En revanche, lors d'une inactivation à 19°C, malgré l'utilisation de PMA, la RT-PCR détecte toujours du génome pour des entérovirus pourtant totalement inactivés. Les auteurs ont ensuite étudié l'application de cette méthode sur des matrices environnementales. Après une contamination artificielle d'eau de rivière par 100 UFP de poliovirus infectieux ou inactivé à 37°C, les auteurs concluent que l'utilisation du PMA permet de bien faire la distinction entre les particules virales infectieuses et non infectieuses dans une matrice environnementale. Kim *et al.* (2011) ont obtenu des résultats identiques entre l'EMA-RT-qPCR et la culture cellulaire lors de la détection de poliovirus 1 exposé à des traitements thermiques à 45, 55, 65 et 75°C. La PMA-RT-qPCR appliquée au virus de l'hépatite A permettrait de distinguer les particules infectieuses et non infectieuses après un traitement à 99°C pendant 5 min avec une diminution de la quantité de génome détectée de 2,40 log₁₀ et se révèle plus efficace qu'un traitement enzymatique avec une RNase qui ne permet d'observer qu'une diminution de 0,55 log₁₀ de la quantité de génome détectée (Sánchez *et al.*, 2012). Les auteurs concluent ici que le traitement par PMA semble être une alternative prometteuse pour conclure sur l'infectiosité du virus de l'hépatite A après une inactivation par la chaleur à 99°C. Par contre, la discrimination entre bactériophages T4 infectieux et non infectieux par PMA-qPCR s'est révélée impossible (Fittipaldi *et al.*, 2010) et ce même après une inactivation à 85°C pendant 20 minutes et un prétraitement par une protéinase. Coudray-Meunier *et al.* (2013) ont associé un agent intercalant à un surfactant pour la détection de particules infectieuses de virus de l'hépatite A et de rotavirus souches SA11 et Wa. Ainsi, l'EMA et le PMA sont associés à trois surfactants, l'IGEPAL CA-630, le Tween 20 et le Triton X-100. La cinétique d'inactivation de ces virus est suivie pour des températures de 37, 68, 72 et 80°C après 0, 1, 5, 10 et 20 min par culture cellulaire et RT-qPCR associée ou non à un pré-traitement. Lors d'une inactivation à 37°C la RT-qPCR détecte la même quantité de génome qu'elle soit associée, ou non, à l'utilisation d'un agent intercalant. En revanche, lors des expositions à 68, 72 et 80°C pour des temps d'incubation compris entre 0 et 20 minutes, la quantité de génome détectée par RT-qPCR associée à un agent intercalant est identique au titre infectieux. Les conditions donnant les résultats les plus probants combinent l'EMA à IGEPAL CA-630 à une concentration de 0,5% pour le VHA. Par contre, pour le rotavirus, l'EMA et le PMA utilisés seuls donnent les meilleurs résultats pour les souches Wa et SA11, respectivement.

Les résultats obtenus après action d'un agent intercalant dépendent donc du facteur inactivant et de son intensité. Cette approche doit être adaptée spécifiquement et prudemment à chaque organisme cible. Pour améliorer cette technique il est possible de modifier la

concentration en agent intercalant, la durée d'exposition à la source lumineuse ainsi que l'origine et la distance entre la source lumineuse et l'échantillon. La limite de cette méthode est qu'elle dépend de l'intégrité de la capsidie qui n'est pas forcément corrélée à l'infectiosité. En effet, l'inactivation peut se faire par la perte d'autres fonctions ou propriétés indépendantes de l'intégrité de la capsidie, notamment pour des virus maintenus à une température de 19°C (Hamza *et al.*, 2011). Ainsi, si une inactivation « forte » permet de ne plus détecter le génome viral par RT-PCR associée à un agent intercalant, ce ne sera pas le cas pour des inactivations plus proches des conditions environnementales.

2.3- Techniques immunologiques

Les virus sont constitués d'une capsidie protéique pouvant faire l'objet d'une reconnaissance immune par des anticorps spécifiques. Les techniques immunologiques s'intéressent à l'intégrité de la capsidie en termes de fonctions antigéniques. L'hypothèse sur laquelle repose ces méthodes est qu'un virus inactivé va perdre les propriétés antigéniques de sa capsidie. Plusieurs types d'anticorps peuvent être utilisés pour la détection des antigènes viraux, il peut s'agir soit d'anticorps polyclonaux d'origine humaine produits à l'occasion d'une infection naturelle, soit dans le cas le plus fréquent d'anticorps monoclonaux d'origine animale obtenus par immunisation expérimentale. De plus en plus, ce sont des anticorps monoclonaux qui sont utilisés. Ils sont le plus souvent d'origine murine et leur intérêt réside dans la grande précision de l'épitope reconnu. Ces anticorps peuvent être fixés sur des billes magnétiques pour la séparation immuno-magnétique ou des puits pour l'immunocapture, la détection est ensuite réalisée par RT-PCR. Ces anticorps peuvent également être fixés sur des plaques dans le cas de la méthode ELISA, la détection repose alors sur une réaction colorée.

2.3.1- Détection par RT-PCR

2.3.1.1- Séparation immuno-magnétique

La séparation immuno-magnétique (IMS) a notamment été décrite pour la détection de virus entériques dans des échantillons environnementaux. Son principe est expliqué sur la **figure 25**. Des billes magnétiques sont recouvertes d'anticorps spécifiques du virus recherché. Ces anticorps vont se lier aux protéines de capsidie et les billes sur lesquelles se sont fixés les virus sont ensuite concentrées grâce à un aimant. Cette méthode a été proposée afin d'éliminer les inhibiteurs enzymatiques présents dans l'environnement en s'affranchissant des étapes de purification, mais aussi pour éliminer le génome viral libre voire les particules virales non infectieuses.

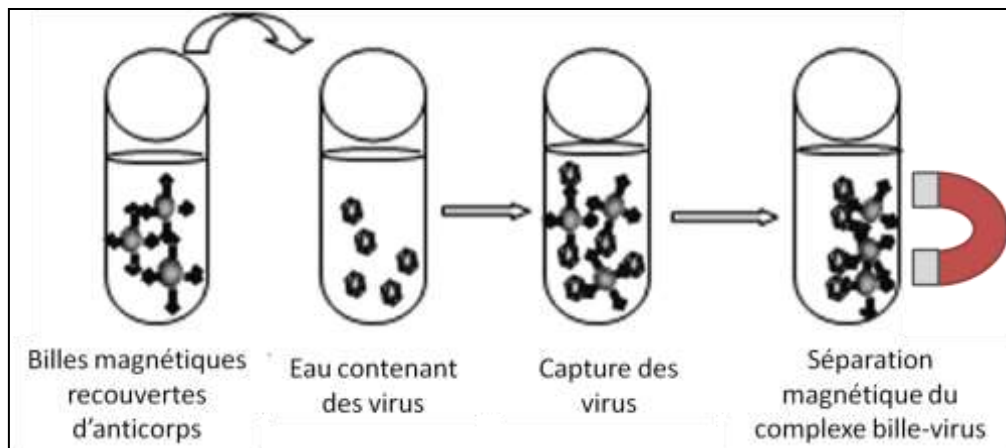


Figure 25 : Principe de la séparation immuno-magnétique (d'après Hamza *et al.*, 2011)

Plusieurs études ont porté uniquement sur les capacités de purification de la séparation immuno-magnétique, sans s'intéresser à la discrimination des particules virales infectieuses et non infectieuses. Ainsi, le couplage de l'IMS à la RT-qPCR est une méthode qui s'avère efficace et sensible pour détecter les rotavirus dans le milieu hydrique (Yang *et al.*, 2011). Cette méthode permet d'augmenter la sensibilité par rapport à l'utilisation des kits classiques d'extraction de l'ARN utilisés seuls et permet la purification et la détection de rotavirus présents dans des eaux usées. Des billes magnétiques recouvertes d'anticorps de lapin anti-norovirus du groupe I ont été mises au point (Myrmel *et al.*, 2000). La RT-PCR n'est alors plus influencée par la présence d'acides humiques pouvant inhiber la PCR, la méthode peut donc être employée pour la purification d'échantillons environnementaux. Cette méthode, couplée à une extraction de l'ARN à la chaleur (99°C pendant cinq minutes), offre une meilleure efficacité qu'une extraction classique de l'ARN par de l'isothiocyanate de guanidium. En revanche, la diversité antigénique des norovirus peut poser problème. Gilpatrick *et al.* (2000) utilisent également la séparation immuno-magnétique pour la détection et purification de norovirus. En comparant 100 échantillons cliniques contaminés par du norovirus les auteurs détectent 65 échantillons positifs par IMS couplée à une RT-PCR, 38 sur 99 sont positifs après extraction à la chaleur et RT-PCR. La présence d'autres virus tel que le virus de l'hépatite A en forte concentration (10^4 UFP) ne modifie en rien cette limite de détection. La séparation immuno-magnétique offre donc une capacité à éliminer les inhibiteurs de PCR et à concentrer les virus qui lui confère un grand avantage par rapport à l'extraction à la chaleur.

En ce qui concerne l'application de cette méthode pour l'étude de l'infectiosité, une étude menée par Hwang *et al.* (2007) pour la recherche d'entérovirus infectieux, compare le couplage IMS-RT-qPCR à la détection des cellules infectées par microscopie à épifluorescence grâce à une technique reposant sur le FRET et la production de la protéase 2A virale dans les cellules infectées. Les deux techniques offrent la même sensibilité de détection. Ces deux techniques, appliquées à des échantillons environnementaux d'eau de surface contaminés, détectent les virus infectieux aux mêmes concentrations que la technique des plages de lyse. La séparation immuno-magnétique pourrait donc fournir des informations sur l'infectiosité des virus détectés.

2.3.1.2- Immunocapture

L'immunocapture utilise également des anticorps pour fixer les particules virales infectieuses, cependant ils ne sont pas fixés sur des billes magnétiques mais au fond de puits de microplaques. Schwab *et al.* (1996) ont développé une méthode d'immunocapture pour la concentration et la purification de virus entériques. Sur 11 échantillons environnementaux d'eau contaminée par des matières fécales, et après double précipitation des particules virales au PEG, neuf échantillons se sont révélés positifs par immunocapture-RT-CR contre seulement quatre par extraction au thiocyanate de guanidium suivie d'une RT-PCR ou par culture cellulaire. Une absence de corrélation est observée entre les échantillons positifs après extraction au thiocyanate de guanidium et ceux positifs après culture cellulaire. En revanche, les échantillons négatifs après immunocapture, le sont également avec les deux autres méthodes.

Concernant l'infectiosité des virus détectés, Nuanualsuwan et Cliver (2003) étudient la capture spécifique par des anticorps dirigés contre le poliovirus, le virus de l'hépatite A et le calicivirus félin. Une diminution de l'infectiosité de trois \log_{10} est obtenue par les UV (1,60 à 1,70 mW/cm²), le chlore (1,20 à 1,25 mg/L) ou la température (72°C et 37°C) afin de déterminer si l'immunocapture permet ou non la discrimination entre virus infectieux et non infectieux. La comparaison de l'immunocapture à l'adhésion à la cellule hôte montre que le VHA et le calicivirus félin inactivés n'ont plus la capacité à se lier à leur cellule hôte, mais sont toujours capturés par des anticorps. En effet, ces deux virus seront toujours capturés par des anticorps quelle que soit la méthode d'inactivation. En revanche, pour le poliovirus, l'inactivation est synonyme de perte de capacité à se lier à des anticorps pour une inactivation par les UV, le chlore ou une température de 72°C. Ceci n'est plus vrai pour une inactivation à 37°C car les auteurs remarquent alors une immunocapture partielle du virus. Pour le poliovirus, l'immunocapture semble donc pouvoir permettre la discrimination entre les particules infectieuses et non infectieuses pour certains traitements inactivants. Ogorzaly *et al.* (2013b) mentionnent parmi les avantages de l'immunocapture-PCR qu'elle permet de détecter les deux composants majeurs du virus : la capsid et le génome. Ainsi, la détection de l'intégrité de la capsid fera intervenir l'immunocapture et le génome sera détecté par la PCR. Cependant, il faut bien garder à l'esprit que la PCR ne permet de détecter que de petits fragments de génome et ne prouve en rien son intégrité. Les auteurs ont étudié l'application de cette méthode sur 10 échantillons environnementaux d'eau de rivière. L'immunocapture couplée à la qPCR permet la détection de particules d'adénovirus dans 100% des échantillons et les adénovirus sont même quantifiables dans 70% des échantillons. La qPCR seule détecte quant à elle du génome d'adénovirus dans 100% des échantillons et à des concentrations plus élevées que l'immunocapture-qPCR.

2.3.2- Détection par réaction colorée : méthode ELISA

La méthode ELISA pour « *enzyme-linked immunosorbent assay* » est une méthode immuno-enzymatique dont le principe est présenté sur la **figure 26**.

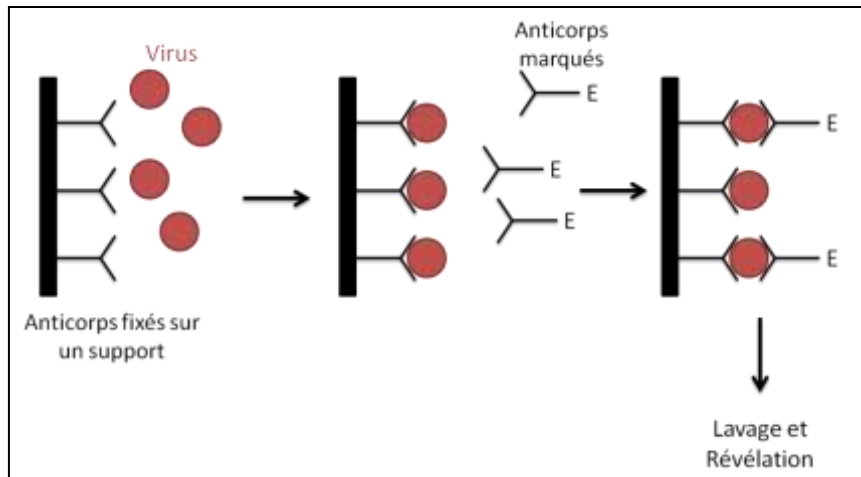


Figure 26 : Principe de la méthode ELISA, il s'agit ici de la méthode ELISA sandwich.

L'un des anticorps est spécifique de l'antigène recherché, ici une protéine de la capsid virale, tandis que le deuxième anticorps réagit ensuite avec le complexe immunitaire antigène-anticorps et est couplé à une enzyme qui va catalyser une réaction provoquant la libération d'un substrat chromogène ou fluorogène. La méthode ELISA permet la détection de virus entériques dans les selles et plusieurs tests sont actuellement commercialisés. Concernant les norovirus ceux-ci possèdent une grande diversité antigénique et il est donc complexe d'identifier des épitopes antigéniques conservés pour le développement d'anticorps spécifiques. En général, une combinaison d'anticorps capable de reconnaître une large gamme de norovirus est utilisée pour la technique ELISA. De nombreuses études se sont intéressées aux résultats obtenus en utilisant les tests ELISA disponibles dans le commerce pour la détection des norovirus humains. Hardy *et al.* (1995) observent que les tests ELISA disponibles à cette époque ne permettent pas de faire la distinction entre des particules virales infectieuses, des capsides vides ou des antigènes libres de norovirus humain dans les selles des individus infectés. Costantini *et al.* (2010) montrent que les résultats obtenus par test ELISA ne sont pas corrélés à ceux de la RT-qPCR car ces tests possèdent une faible sensibilité (57,6%) et une faible valeur prédictive négative (VPN). La faible sensibilité des tests ELISA par rapport à la RT-PCR a été montrée par plusieurs études, un résultat négatif suite à un test ELISA devrait être confirmé par RT-PCR. (Burton-MacLeod *et al.* 2004 ; De Bruin *et al.*, 2006 ; Bruggink *et al.*, 2011 ; Kele *et al.*, 2011). Ces tests nécessitent au moins 10^7 particules virales par gramme de selle pour l'obtention d'un résultat positif (Costantini *et al.*, 2010) et ne sont donc pas suffisamment sensibles pour la détection directe des contaminations de l'environnement ou des aliments. Une étape de concentration du pathogène est nécessaire. En comparant un couplage immunocapture-PCR à un test ELISA utilisant les mêmes anticorps pour la détection d'adénovirus des sérotypes 2 et 41, Ogorzaly *et al.* (2013b) trouvent une sensibilité de la PCR 100 fois supérieure à celle de l'ELISA. Lors de travaux réalisés avec le norovirus murin comme modèle du norovirus humain, Hirneisen et Kniel (2012) n'observent pas de diminution de la liaison aux protéines de mucine gastrique utilisées pour le test ELISA après inactivation virale par haute pression à 500 MPa pendant trois minutes, ozone à 6,25 ppm pendant 10 minutes ou UV à une dose de 1000 mWs/cm² et ce malgré une perte de 7 log₁₀ d'infectiosité. En revanche, lors d'une inactivation à la chaleur,

les auteurs notent une diminution de la liaison du virus aux protéines pour des expositions à des températures de 70°C, 80°C et 100°C pendant cinq minutes. Bien qu'il y ait perte totale d'infectiosité de l'échantillon avec une diminution de 7 log₁₀, il subsiste toujours des virus se liant aux protéines.

La méthode ELISA ne se révèle pour l'heure pas assez sensible et les kits disponibles dans le commerce ne peuvent servir qu'au screening rapide en cas d'épidémie. Un résultat négatif via ELISA devra toujours être reconfirmé par PCR.

En résumé, le couplage d'une méthode de séparation immunologique telle que la séparation immuno-magnétique ou encore l'immunocapture, à une détection par PCR permettrait de purifier et concentrer les virus présents dans l'environnement. Lors de l'utilisation de méthodes immunologiques, il ne faut pas négliger les variations de la sensibilité de la liaison anticorps-antigène en fonction de différents paramètres comme le pH ou la présence de particules colloïdales, ainsi que le rôle joué par le traitement d'inactivation qui va permettre, ou non, le maintien des propriétés antigéniques de la capsid virale bien que le virus ne soit plus infectieux. Les limites de ces méthodes sont leur coût et le fait qu'il est nécessaire de mettre au point un essai spécifique pour chaque virus.

3- Méthodes évaluant l'intégrité du génome

Un virus étant composé d'une capsid et d'un génome, l'autre voie de développement de nouvelles méthodes de détection des virus infectieux est l'étude de l'intégrité de leur génome. Pour étudier cette intégrité, plusieurs approches sont possibles parmi lesquelles la PCR dite en « long fragment » qui permet de cibler une grande portion du génome viral. D'autres méthodes s'intéressent aux régions du génome qui sont les premières atteintes lors d'une inactivation.

3.1- PCR long fragment

La RT-qPCR cible une petite portion du génome viral. En effet, la taille du fragment amplifié est de l'ordre de 100 à 150 nucléotides pour la RT-PCR en temps réel. Il a donc été proposé d'analyser une grande région du génome pour évaluer son intégrité. L'hypothèse avancée est que plus la région analysée est grande et plus la probabilité de trouver des dommages sur l'acide nucléique est élevée. Pour les virus à ARN, la transcription inverse ne peut pas être réalisée en cas de dommages.

Wolf *et al.* (2009) ont étudié l'intégrité génomique du MNV-1 après inactivation par la chaleur et exposition aux UV. Le norovirus murin est totalement inactivé après trois minutes à 72°C alors que l'effet observé en RT-PCR classique et en RT-PCR long fragment est assez limité. En revanche, après exposition aux UV₂₅₄, une forte diminution de la quantité de

génomique détectée par RT-PCR long fragment est observée, cette diminution est comparable à celle observée par culture cellulaire. La RT-PCR sur fragments courts n'a par contre pas mis en évidence de diminution de la quantité de génome viral. Simonet et Gantzer (2006a) ont étudié l'action du dioxyde de chlore à une concentration initiale de 5 mg/L sur de l'ARN extrait de poliovirus infectieux. La RT-PCR a été utilisée pour mesurer la dégradation de fragments d'ARN de différentes tailles et sur différentes régions du génome. Le plus petit fragment, 76 nucléotides, a persisté tout au long de l'analyse soit plus de 120 minutes alors que le plus grand fragment, 6929 nucléotides, disparaît rapidement et n'est plus détectable après 25 minutes d'exposition au chlore. La relation entre la taille du fragment et sa vitesse de dégradation n'est pas linéaire, il faut par exemple le même temps d'exposition au chlore pour obtenir la dégradation de fragments de 1869 et 145 nucléotides situés respectivement en position 3' et 5'. Ces auteurs ont confirmé dans une seconde étude (Simonet et Gantzer, 2006b) que la taille du génome n'est pas le seul facteur intervenant dans la résistance du génome viral en comparant la dégradation après exposition aux UV du génome de bactériophage MS2 et de poliovirus. L'ARN du poliovirus 1 est dégradé plus rapidement que celui de MS2 pour des fragments de même taille.

La RT-qPCR est une méthode sensible et adaptée à la détection de virus entériques dans l'eau et les aliments contrairement à la PCR « longs fragments » qui présente une sensibilité et une efficacité plus faibles (Tellier *et al.*, 1996 ; Kostela *et al.*, 2008). Si la PCR « longs fragments » peut permettre de détecter de plus longs fragments de génome non dégradé, elle ne garantit pas l'infectiosité des virus (Hamza *et al.*, 2011). La séquence du fragment de génome détecté semble jouer un rôle primordial sur sa persistance.

3.2- Cas particulier des *Picornaviridae* : région 5' non codante

La famille des Picornaviridae regroupe des virus avec un génome ARN simple brin de polarité positive. La région 5' non codante de leur génome comprend entre 600 et 1200 nucléotides. Cette région est conservée parmi les différents virus de cette famille, il est donc possible de détecter par RT-PCR l'ensemble des Picornaviridae en ciblant cette zone. Cette région 5' se révèle aussi importante pour la multiplication virale, surtout au niveau de la traduction et de l'encapsidation (Rodriguez *et al.*, 2009). Pour le virus de l'hépatite A, cette région 5' non codante a été décrite comme la région la plus facilement dégradée après une exposition au chlore et au dioxyde de chlore (Bhattacharya *et al.*, 2004 ; Li *et al.*, 2002). Il en est de même pour le poliovirus, la dégradation de son génome par le dioxyde de chlore se fait préférentiellement sur les régions 5' et 3' non codantes (Simonet et Gantzer, 2006a).

Il semble donc intéressant de cibler cette région 5' non codante pour l'évaluation de l'infectiosité virale tout en ayant une détection sensible par RT-qPCR. L'inconvénient de cette méthode est qu'elle fonctionne uniquement avec les Picornaviridae, les autres familles de virus ayant une organisation génomique différente (Rodriguez *et al.*, 2009).

4- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'infectiosité virale

L'inactivation virale est décrite comme consécutive à des dommages au niveau de la capsid virale ou au niveau du génome, ou encore de ces deux constituants (Wigginton et Kohn, 2012). La **figure 27** présente les différentes atteintes portées au poliovirus 1 en fonction du traitement inactivant utilisé.

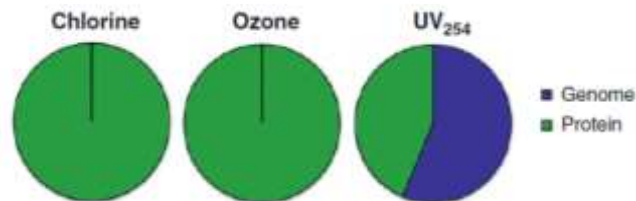


Figure 27 : Prédiction des réactions au niveau des protéines ou du génome de poliovirus 1 soumis à différents traitements inactivant (Wigginton et Kohn, 2012)

Ainsi, le chlore et l'ozone semblent plus réactifs avec les protéines virales qu'avec le génome et les radiations UVC affectent quant à elles plus fortement le génome que les protéines. Cependant, l'inactivation virale est régie par des mécanismes complexes et des cinétiques d'inactivation totalement différentes peuvent être observées lors de l'inactivation de souches virales pourtant très proches. Ainsi, l'échovirus 1 se révèle presque 100 fois plus sensible à une inactivation par la monochloramine que l'échovirus 11 placé dans les mêmes conditions. Pour obtenir une perte d'infectiosité de trois \log_{10} il faut un CT (concentration x temps) de 18 mg.min/L pour la souche échovirus 1 contre un CT de 1300 mg.min/L pour l'échovirus 11 (Cromeans *et al.*, 2010). De la même manière, la souche Brunhilde du poliovirus 1 se révèle être deux fois plus résistante au chlore que la souche Mahoney qui lui est pourtant très ressemblante (Wigginton et Kohn, 2012). La caractérisation de l'infectiosité virale représentant un enjeu de taille en termes de santé publique, des études récentes se sont intéressées à la capsid virale ainsi qu'au génome et à leurs modifications au cours de l'inactivation.

4.1- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'intégrité de la capsid

De récentes avancées technologiques dans le domaine de la virologie ont permis de fournir de nombreuses informations sur les virus entériques et notamment sur leur capsid en termes de composition, de structure et de fonctions biologiques. Les structures cristallines de nombreux virus entériques tels le coxsackievirus A9, le virus de l'hépatite E ou encore l'adénovirus humain ont été déterminées par observation aux rayons X (Hendry *et al.*, 1999 ; Yamashita *et al.*, 2009 ; Reddy *et al.*, 2010) et fournissent des informations sur la localisation et l'orientation des protéines de capsid. Plus récemment, la microscopie cryo-électronique a permis la visualisation des protéines de capsid de particules virales pour lesquelles la cristallisation se révélait difficile en raison d'une forme trop complexe de la capsid ou de la

formation de structures intermédiaires métastables notamment lors de la liaison du virus à sa cellule hôte (Wigginton et Kohn, 2012). Il faut cependant être prudent lors de l'utilisation de ces données. En effet, la capsid virale peut présenter une certaine flexibilité à l'état naturel ; la localisation et la détermination de l'accessibilité de certains groupements fonctionnels à des désinfectants peuvent être difficiles à déterminer. Des groupements fonctionnels normalement protégés des oxydants peuvent se retrouver exposés périodiquement à la surface de la capsid (Broo *et al.*, 2001). Ainsi, certaines structures du rhinovirus humain sont statiques et correspondent bien à la structure cristalline, alors que d'autres régions sont plus « fluides » (Wang et Smith, 2005).

Les informations sur la structure et la dynamique de la capsid virale permettent d'améliorer la compréhension des fonctions biologiques impliquées dans l'interaction virus-cellule hôte, la libération du génome dans la cellule contaminée, mais aussi d'étudier les mécanismes de l'assemblage du virus et les sites d'interaction entre l'ARN et la capsid. Le but de ces études étant d'identifier les régions et fonctions ciblées lors de l'inactivation virale (Wigginton et Kohn, 2012).

Wigginton et Kohn (2012) se sont intéressés à l'influence de la composition de la capsid virale sur la cinétique de désinfection en comparant deux souches du poliovirus 1, Brunhilde et Mahoney. La souche Brunhilde est deux fois plus résistante au chlore que la souche Mahoney. L'inactivation de la souche Mahoney par le chlore a été attribuée à une perte de sa capacité à se fixer à la cellule hôte, par contre les conséquences de l'action du chlore n'ont pas été étudiées pour la souche Brunhilde. Une analyse par microscopie cryo-électronique de la particule virale adhérant à son récepteur cellulaire a conduit à l'identification d'un certain nombre de résidus des protéines de capsid impliqués dans cette liaison. Six d'entre eux diffèrent entre les deux souches virales. Ces résidus incluent des acides aminés de la protéine VP2. En position 140 de cette protéine, la souche Mahoney possède une méthionine et la souche Brunhilde présente une thréonine. En position 141, la souche Mahoney et la souche Brunhilde possèdent respectivement une histidine et une tyrosine. La méthionine et l'histidine ont des chaînes latérales qui réagissent facilement avec le chlore au contraire des chaînes latérales de la thréonine et de la tyrosine qui sont beaucoup moins réactives. Il paraît donc possible que cette différence dans la séquence de la protéine VP2 soit impliquée dans la plus grande résistance de la souche Brunhilde à une inactivation par le chlore. Bien que cette explication soit seulement hypothétique, elle démontre cependant la façon dont la composition, la structure et les fonctions de la capsid virale peuvent participer à la compréhension des mécanismes impliqués lors de l'inactivation. Ce type d'outils prédictifs peut s'avérer particulièrement intéressants pour des virus en constante mutation comme les norovirus (Wigginton et Kohn, 2012).

Wigginton *et al.* (2012b) ont étudié les mécanismes de l'inactivation virale sur le bactériophage ARN F-spécifique MS2 utilisé comme modèle des virus entériques. L'inactivation du phage MS2 a été provoquée par exposition à la chaleur à 72°C pendant 100 secondes, aux radiations UV à 2500 J/m², à l'acide hypochloreux à 200 mg.s/L, à l'oxygène singulet à 0,0012 mg.s/L et au dioxyde de chlore à 120 mg.s/L, avec une perte d'infectiosité allant de six à huit log₁₀. Les UV, l'oxygène singulet et l'acide hypochloreux agissent sur le génome viral, empêchant sa réplication. Les radiations UV empêchent la réplication du

génomique dans la cellule hôte mais aussi l'injection de ce génome dans la cellule. En revanche, le dioxyde de chlore et la chaleur ont pour leur part une action sur la capsidite, ils entraînent une inhibition de la liaison à la cellule hôte. Le dioxyde de chlore et la chaleur provoquent des clivages sites-spécifiques des protéines de structure de la capsidite. Ainsi, chaque traitement inactivant agit selon une voie bien spécifique. Une étude des mécanismes d'inactivation par exposition aux UV d'adénovirus humain a aussi été menée (Bosshard *et al.*, 2013). Les auteurs utilisent la PCR et la spectrométrie de masse pour quantifier les dégradations du génome et/ou des protéines de capsidite et localiser les régions affectées. La lumière solaire semble dégrader les acides aminés au sein de la protéine de fibre qui permet l'adhésion du virus à sa cellule hôte.

La détection des dommages oxydatifs sur les protéines de la capsidite virale après son exposition à des désinfectants ou à un stress environnemental est une des voies d'étude pour le développement de nouvelles méthodes de détection des virus infectieux. Les résidus de plusieurs acides aminés présents sur la capsidite virale comme la lysine, l'arginine, la proline et la thréonine peuvent être oxydés lors de l'inactivation virale et conduire à la formation de groupements carbonyles qui entraînent la perte de fonction des protéines de surface. La présence de groupements carbonyle pourrait alors être utilisée comme marqueur de l'oxydation des protéines (Levine *et al.*, 1994). En théorie, les groupements carbonyles n'existent pas sur les protéines d'une capsidite intacte. La détection des particules virales carbonylées peut donc être un outil prometteur pour évaluer l'inactivation de virus non cultivables comme le norovirus. La détection des dommages oxydatifs présents sur les capsidites virales peut se faire en utilisant une biotine hydrazide lors d'une détection par chromatographie d'affinité (Mirzaei et Regnier, 2005). La purification par chromatographie d'affinité est une méthode intéressante du fait de sa sélectivité, cependant elle ne peut faire la distinction entre les différents sites oxydés. Sano *et al.* (2010) ont cherché à détecter les dommages oxydatifs sur les protéines de capsidite d'un norovirus humain et d'un astrovirus afin d'évaluer leur infectiosité. Les auteurs détectent ici de façon quantitative les groupements carbonyles produits par l'oxydation des protéines de la capsidite virale. La détection de ces dommages oxydatifs cumulés se fait par utilisation d'une biotine qui forme des liaisons covalentes avec les groupements carbonyles. Les auteurs ont mis en évidence une relation entre les dommages oxydatifs de la capsidite virale et l'infectiosité pour l'astrovirus. Après inactivation au chlore libre, la diminution de l'infectiosité de l'astrovirus est bien corrélée au taux de dommages oxydatifs sur la capsidite virale. En ce qui concerne le norovirus humain, après un traitement par chlore libre à 1 ppm pendant 15 minutes, 49,9 % des virions présentent des dommages oxydatifs au niveau de leur capsidite, ce qui est cinq fois plus qu'après un traitement par 0,5 ppm.

Lorsque de plus amples détails sur les sites oxydés sont nécessaires, il peut être intéressant d'utiliser la spectrométrie de masse, soit couplée à une source d'ionisation laser assistée par une matrice (MALDI), soit couplée à une ionisation par électrospray (ESIMS) (Wigginton *et al.*, 2010). Ces auteurs étudient l'inactivation du bactériophage MS2 par exposition à l'oxygène singulet et aux UV₂₅₄ (254 nm). L'oxygène singulet provoque un

dommage oxydatif sur un acide aminé de la surface externe de la capsid, la cystéine en position 101 qui se révèle crucial pour la formation de la protéine de capsid et sa stabilité. Les UV₂₅₄ provoquent deux réactions d'oxydation sur la protéine de capsid au niveau de résidus de la surface externe et un clivage site-spécifique sur la surface interne de la capsid au niveau de trois acides aminés, la cystéine en position 45, la sérine en position 47 et la thréonine en position 48. Ce site est connu pour être impliqué dans la liaison ARN-protéine de capsid. Le clivage est lié à l'oxydation de la cystéine en position 45 qui est suivie par la capture d'un hydrogène de la sérine en position 47. L'inactivation virale se fait donc par formation d'un radical. Par contre, l'étude de l'action des UV₂₅₄ sur le bactériophage GA a montré l'absence de clivage site-spécifique au niveau des protéines. La bactériophage GA possède une structure de capsid très proche de celle de MS2, cependant la séquence concernant le site impliqué dans la liaison ARN-protéine de capsid diffère avec une cystéine en position 46 remplacée chez GA par une alanine et un remplacement de la valine en position 48 par une tyrosine. Le mécanisme d'inactivation dépend donc du type de traitement employé mais aussi de la structure du virus (Wigginton *et al.*, 2012a).

La détection des particules virales ayant subi des dommages oxydatifs peut donc être un outil envisageable pour évaluer l'infectiosité des virus non cultivables. Cependant, cette méthode est encore coûteuse et une absence d'oxydation n'est pas forcément synonyme d'infectiosité, d'autres mécanismes pouvant conduire à l'inactivation virale.

Afin de prévoir les effets d'un traitement inactivant sur des virus entériques, il faut identifier les acides aminés impliqués dans les fonctions fondamentales de la capsid et les variations de séquence protéique entre les différentes souches et espèces. Il est également nécessaire de déterminer si des modifications chimiques spécifiques ont lieu pendant l'inactivation, ainsi que les effets de ces modifications sur la structure du virus et ses fonctions. Enfin, il est important de déterminer si les modifications induites par un traitement inactivant sont similaires pour tous les virus entériques (Wigginton et Kohn, 2012).

4.2- Perspectives sur les méthodes d'évaluation de l'intégrité du génome viral

Bien que de nombreux produits utilisés pour le traitement des eaux inactivent les virus entériques par une action sur la capsid virale, d'autres désinfectants, comme les UV, entraînent des dommages au niveau du génome viral. Contrairement aux oxydants chimiques, les radiations UV entraînent des dommages direct sur le génome viral et ce indépendamment de son accessibilité (Wigginton et Kohn, 2012).

Une approche basée sur la taille du génome a été proposée pour prédire la sensibilité virale aux UVC, plus le génome est grand et plus il serait sensible aux radiations UV (Lytle et Sagripanti, 2005). A partir d'une revue des études portant sur l'inactivation de virus par des radiations UV_{254nm}, les auteurs ont établi un modèle permettant de prédire la sensibilité aux UV des virus en fonction de la taille mais aussi de la nature de leur génome. En effet, la nature du génome, à savoir ARN ou ADN, simple ou double brin, peut avoir une grande influence sur la sensibilité virale aux UV. Ainsi, Sommer *et al.* (2001) ont comparé la sensibilité aux radiations UV_{253.7} de trois bactériophages : MS2 qui possède un génome à

ARN simple brin de 3 569 nucléotides, PhiX174 avec un génome à ADN double brin de 5 386 nucléotides et B40-8 avec un génome à ADN double brin de 51 700 nucléotides. Le bactériophage MS2 se révèle être le plus résistant aux radiations UV, suivi de B40-8 et PhiX174 est le plus sensible des trois. La taille du génome ne semble pas intervenir ici dans la sensibilité du génome aux irradiations UV. Le produit létal pour les virus qui est le plus fréquemment formé par les radiations UV est un dimère de pyrimidine, en particulier un dimère thiamine. L'ADN contient de la thiamine, à la différence de l'ARN, les virus à ADN sont donc en général plus sensibles aux radiations UV que les virus à ARN (Lytle et Sagripanti, 2005). Une étude menée par Simonet et Gantzer (2006b) compare les cinétiques de dégradation du génome de virus à ARN simple brin de tailles différentes. Les virus étudiés ici sont le poliovirus 1 qui possède un génome de 7 440 nucléotides et trois bactériophages ARN F spécifiques à savoir MS2 avec un génome de 3 569 nucléotides, GA avec un génome de 3 466 nucléotides et enfin Q β avec un génome de 4 160 nucléotides. Lors d'une inactivation par exposition aux radiations UV_{253.7}, les résultats suivent le modèle de Lytle et Sagripanti (2005), à savoir que plus le génome est grand, plus il sera sensible aux radiations UV. Simonet et Gantzer (2006b) retrouvent ainsi que le virus le plus sensible aux radiations est le poliovirus 1, le phage Q β présente une sensibilité intermédiaire et les phages MS2 et GA sont les virus les plus résistants. En revanche, lorsque ces auteurs se sont intéressés à l'étude de fragments de génome, les cinétiques de dégradation varient. Ainsi, lors de la comparaison de la vitesse de dégradation d'un fragment de 1 869 nucléotides de poliovirus 1 à un fragment de 1 909 nucléotides du phage MS2, les auteurs trouvent une dégradation plus rapide pour le poliovirus, malgré une taille de fragments identique. La taille et le nature du génome ne seraient pas les seuls éléments à prendre en compte pour prédire la cinétique d'inactivation virale.

Une autre approche pour prédire la sensibilité virale aux UV est basée sur la prévalence du doublet pyrimidine dans le génome viral. Kowalski *et al.* (2009) ont ainsi mis au point un modèle mathématique pour prédire la susceptibilité de virus à l'inactivation par des UV₂₅₄. Ce modèle est basé sur la prévalence dans le génome viral, des doublets pyrimidine, qui sont facilement dimérisés par les radiations UV. Ce modèle suggère l'existence d'une corrélation entre le nombre de séquences potentiellement dimérisables dans le génome viral et la dose UV nécessaire à l'inactivation. Cependant, il existe des souches pour lesquelles les résultats obtenus selon ce modèle sont aberrants ce qui indique que d'autres voies jouent un rôle dans le mécanisme d'inactivation par les UV (Wigginton et Kohn, 2012).

Bien que plusieurs études se soient intéressées à l'observation des mécanismes d'inactivation des particules virales, la plupart ne ciblent qu'une partie bien spécifique du virus comme une faible portion de son génome, le changement des propriétés spectroscopiques, ou ses fonctions antigéniques. En conséquence, les mécanismes proposés par différents auteurs peuvent être contradictoires. Pour exemple, l'inactivation du poliovirus 1 par le chlore a été attribuée à des dommages au niveau d'une protéine de capsid et à des dommages au niveau du génome dans des études indépendantes (Wigginton *et al.*, 2012b).

Récemment, la microscopie cryo-électronique a permis la visualisation de la capsid, mais aussi la description des interactions spécifiques entre les protéines de capsid et le

génomique virale (Pan *et al.*, 2009). Cependant, ce type d'étude structurale très poussée n'a pas encore été réalisé pour des virus d'une grande importance en termes de santé publique comme le VHA et le norovirus (Wigginton et Kohn, 2012). Il pourrait être intéressant de s'intéresser aux interactions génome-capside. Une meilleure compréhension des modifications qui ont lieu au niveau du génome, de la capsidique mais aussi au niveau des interactions entre la capsidique et le génome lors de l'inactivation est nécessaire pour permettre à terme une discrimination entre les particules virales infectieuses et non infectieuses.

CONCLUSION

Nous l'avons vu, l'implication des virus entériques dans les pathologies infectieuses liées au milieu hydrique est non négligeable. Les paramètres microbiologiques utilisés actuellement pour le contrôle sanitaire des eaux sont uniquement bactériens bien que le comportement des bactéries dans l'environnement diffère de celui des virus. La mise en évidence de l'infectiosité des virus entériques potentiellement présents est nécessaire pour définir un risque sanitaire. Cependant, dès lors qu'une autre méthode que la culture cellulaire est employée, il est complexe de conclure en termes d'infectiosité et donc de risques pour la santé.

Ce travail visait à recenser les méthodes de détection actuelles et surtout celles en développement qui pourraient permettre une détection exclusive des particules virales infectieuses. Parmi les méthodes actuelles de détection des virus entériques dans l'eau et les aliments, la culture cellulaire reste la méthode de référence car elle est la seule qui permette la détection et la quantification des virus infectieux. Cependant, elle est coûteuse, difficilement applicable en routine, nécessite des temps d'incubation allant jusqu'à 10 à 15 jours pour certains virus et ne permet pas la détection de certains virus d'importance sanitaire dont les norovirus. Les techniques de RT-PCR sont rapides, sensibles et spécifiques, mais détectent uniquement le génome viral. Or la concentration de génome viral détectée ne peut être corrélée à une concentration en virus infectieux d'autant plus que la contamination est ancienne (Gassilloud *et al.*, 2003).

Il apparaît alors nécessaire de développer de nouvelles méthodes de détection des virus infectieux dans l'environnement pour une bonne évaluation du danger viral. Trois types de méthodes ont ainsi été développés, celles se basant sur la culture cellulaire et celles se focalisant uniquement sur une partie de la particule virale, à savoir la capsid ou le génome.

Les méthodes associant la culture cellulaire à une détection par biologie moléculaire permettent d'obtenir un résultat plus rapidement que la culture cellulaire seule. Ces méthodes permettent aussi de résoudre le problème posé par les virus dont la croissance sur cellules n'entraîne pas d'apparition d'effet cytopathique. Si l'ICC-PCR n'apporte qu'un résultat qualitatif à l'heure actuelle, la détection des cellules infectées par marquage *in situ* soit du génome viral, soit des protéines virales nouvellement formées, permet quant à elle de fournir un résultat quantitatif. L'inconvénient majeur de ces techniques est qu'elles nécessitent de disposer d'une lignée cellulaire permissive pour les virus recherchés, or une telle lignée n'existe pas à ce jour pour les norovirus. De plus, ces méthodes se révèlent encore coûteuses et nécessitent des opérateurs formés aux techniques de culture cellulaire.

Des études se sont intéressées à l'intégrité de la capsid virale comme marqueur de l'infectiosité. L'intégrité de la capsid en terme de structure peut être étudiée grâce à des traitements enzymatiques ou à des agents intercalants. Mais cela peut aussi concerner son intégrité en termes de propriétés antigéniques, ces propriétés seront explorées par des méthodes immunologiques. Ces méthodes étudiant l'intégrité de la capsid peuvent s'avérer intéressantes par rapport à l'évaluation de l'infectiosité virale mais seulement dans certaines conditions d'inactivation. En effet, les résultats semblent dépendre du type d'inactivation

subit par le virus. Un virus ayant une capsidie fonctionnelle, aussi bien d'un point de vue antigénique que structural, n'est pas forcément un virus infectieux. D'autres paramètres entrent en compte lors de l'inactivation virale.

En termes de ciblage de l'intégrité du génome comme marqueur d'inactivation, si l'étude de l'intégrité de la région 5' non codante semble intéressante, elle ne peut s'appliquer qu'aux *Picornaviridae*. Comme pour la capsidie, une atteinte du génome seul n'est pas synonyme d'inactivation. Un virus peut être non infectieux et pourtant posséder un génome complet et fonctionnel. Les mécanismes de l'inactivation virale sont complexes et touchent le virus dans son ensemble, ne s'intéresser qu'à une petite partie de la particule virale ne permet pas pour l'heure de conclure en termes d'infectiosité.

Dans l'environnement, comme en laboratoire, la concentration en génome est toujours supérieure à celle en virus infectieux (Li *et al.*, 2011). Les recherches portant sur le développement d'une méthode permettant la purification et discrimination entre les particules virales infectieuses et non infectieuses couplé à une détection par biologie moléculaire semblent prometteuses. Les différentes pistes explorées en termes de modifications de la capsidie et du génome lors de l'inactivation virale devraient à terme conduire au développement de méthodes permettant de séparer les particules virales infectieuses et non infectieuses. Les recherches portent actuellement sur la détection de dommages oxydatifs sur la capsidie et la détection des zones attaquées préférentiellement lors de l'inactivation sur le génome. En attendant, il ne faut pas négliger les études portant sur les liens entre la concentration en génome viral dans l'eau ou sur les aliments et le risque de développer une maladie. De même, l'étude du lien entre la présence de virus infectieux et les concentrations en bactéries ou autre indicateur de contamination fécale doit permettre de mieux définir les risques en termes de santé publique encourus par la population exposée.

La méthode optimale pour évaluer l'infectiosité virale doit être techniquement simple et rapide, applicable à un large panel de virus et peu coûteuse (Hamza *et al.*, 2011). Il semble évident, au travers des différentes techniques abordées dans ce manuscrit, qu'actuellement aucune méthode ne remplit l'ensemble de ces critères. Chaque méthode a ses inconvénients qui l'empêchent d'être optimale pour le travail en routine en laboratoire. Les futures méthodes de détection de l'infectiosité virale dans le milieu hydrique vont dépendre de l'expansion du domaine des nanobiotechnologies qui ont déjà un grand nombre d'applications pour le diagnostic clinique. Ce domaine est en effet en plein essor en ce qui concerne la recherche et le diagnostic clinique d'infections virales avec la création de nanoparticules, nanopuces, puces à protéines et autres qui pourraient se révéler d'un grand intérêt en étant transposées dans le milieu environnemental.

BIBLIOGRAPHIE

ABAD F. X., PINTÓ R. M., DIEZ J. M., BOSCH A. Disinfection of human enteric viruses in water by copper and silver in combination with low levels of chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994a, 60(7), pp.2377-83.

ABAD F. X., PINTÓ R. M., BOSCH A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1994b, 60(10), pp.3704-10.

ABAD F. X., PINTÓ R. M., BOSCH A. Flow Cytometry Detection of Infectious Rotaviruses in Environmental and Clinical Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998. 64(7), pp.2392-96.

ABBASZADEGAN M., STEWART P., LECHEVALLIER M. A strategy for detection of viruses in groundwater by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(2), pp.444-9.

ABRAVANEL F, LHOMME S, DUBOIS M, PERON JM, ALRIC L, KAMAR N, IZOPET J. Hepatitis E virus. *Med. Mal. Infect.*, 2013, 43(7), pp. 263-70.

ADLER J. L., ZICKL R. Winter vomiting disease. *J. Infect. Dis.*, 1969, 119(6), pp.668-73.

AFNOR XP T 90-451. Essais des Eaux Ré Recherche des entérovirus Ré Méthode par concentration sur laine de verre et détection par culture cellulaire. 1996.

AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments). Bilan des connaissances relatives aux virus transmissibles à l'homme par voie orale. 2007, disponible sur : <https://www.anses.fr/fr/content/virus-transmissibles-%C3%A0-lhomme-par-voie-orale-0> (consulté le 23/03/2014)

ALLANDER T., TAMMI M. T., ERIKSSON M., BJERKNER A., TIVELJUNG-LINDELL A., ANDERSSON B. Cloning of a human parvovirus by molecular screening of respiratory tract samples. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, 102(36), pp.12891-96.

ALLWOOD P. B., MALIK Y. S., HEDBERG C. W., GOYAL S. M. Survival of F-Specific RNA Coliphage, Feline Calicivirus, and Escherichia coli in Water: a Comparative Study. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(9), pp. 5707-10.

AMRI I., HMAÏED F., LOISY F., LEBEAU B., BARKALLAH I., SAIDI M., SLIM A. Hepatitis A virus detection in shellfish from Tunisia by reverse transcription-nested PCR-- investigation of a correlation between viral and bacterial contamination. *Pathol. Biol.*, 2011, 59(4), pp. 217-21.

ANDERSON A. D., HERYFORD A. G., SARISKY J. P., HIGGINS C., MONROE S. S., BEARD R. S., NEWPORT C. M., CASHDOLLAR J. L., FOUT G. S., ROBBINS D. E.,

SEYS S. A., MUSGRAVE K. J., MEDUS C., VINJÉ J., BRESEE J. S., MAINZER H. M., GLASS R. I. A waterborne outbreak of Norwalk-like virus among snowmobilers-Wyoming, 2001. *J. Infect. Dis.*, 2003, 187(2), p. 303-6.

APPLETON H. Small round viruses: classification and role in food-borne infections. *Ciba Found. Symp.*, 1987, 128, pp. 108-25.

BACHRACH H. L. Foot-and-mouth disease virus: Stability of its ribonucleic acid core to acid and to heat. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1959, 1(6), pp. 356-60.

BAE S., WUERTZ S. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(9), pp. 2940-44.

BAERT L., WOBUS C. E., COILLIE E. V., THACKRAY L. B., DEBEVERE J., UYTENDAELE M. Detection of Murine Norovirus 1 by Using Plaque Assay, Transfection Assay, and Real-Time Reverse Transcription-PCR before and after Heat Exposure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(2), pp. 543-46.

BAERT L., MATTISON K., LOISY-HAMON F., HARLOW J., MARTYRES A., LEBEAU B., STALS A., VAN COILLIE E., HERMAN L., UYTENDAELE M. Review: norovirus prevalence in Belgian, Canadian and French fresh produce: a threat to human health? *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, 151(3), pp. 261-69.

BARARDI C. R. ., EMSLIE K. ., VESEY G., WILLIAMS K. Development of a rapid and sensitive quantitative assay for rotavirus based on flow cytometry. *Journal of Virological Methods*, 1998, 74(1), pp. 31-8.

BASTIEN N., CHUI N., ROBINSON J. L., LEE B. E., DUST K., HART L., LI Y. Detection of human bocavirus in Canadian children in a 1-year study ». *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(2), pp. 610-3.

BEGIER E. M., OBERSTE M. S., LANDRY M. L., BRENNAN T., MLYNARSKI D., MSHAR P. A., FRENETTE K., RABATSKY-EHR T., PURVIANCE K., NEPAUL A., NIX W. A., PALLANSCH M. A., FERGUSON D., CARTTER M. L., HADLER J. L. An outbreak of concurrent echovirus 30 and coxsackievirus A1 infections associated with sea swimming among a group of travelers to Mexico. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, 47(5), pp. 616-23.

BENNETT J. E., DOUGLAS R. G., MANDELL G. L., Éd. Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases. 6e edition, Elsevier Churchill Livingstone Ed, New York, 2005, 3661p.

BERTO A, GRIERSON S, HAKZE-VAN DER HONING R, MARTELLI F, JOHNE R, REETZ J, ULRICH RG, PAVIO N, VAN DER POEL WH, BANKS M. Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, 19(2), pp. 264-66.

BERTRAND I, SCHIJVEN JF, SÁNCHEZ G, WYN-JONES P, OTTOSON J, MORIN T, MUSCILLO M, VERANI M, NASSER A, DE RODA HUSMAN AM, MYRMEL M, SELLWOOD J, COOK N, GANTZER C. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, 112(6), pp. 1059-74.

BHATTACHARYA S. S., KULKA M., LAMPEL K. A., CEBULA T. A., GOSWAMI B. B. Use of reverse transcription and PCR to discriminate between infectious and non-infectious hepatitis A virus. *Journal of Virological Methods*, 2004, 116(2), pp. 181-7.

BIAGINI P., GALLIAN P., CANTALOUBE J. F., DE MICCO P., DE LAMBALLERIE X. Presence of TT virus in French blood donors and intravenous drug users. *J. Hepatol.*, 1998, 29(4), pp. 684-5.

BIAGINI P. Human circoviruses. *Vet. Microbiol.*, 2004, 98(2), pp. 95-101.

BLACK J. G. *Microbiology: principles and applications*. Prentice Hall Ed, 1996, 790p.

BLACKMER F., REYNOLDS K. A., GERBA C. P., PEPPER I. L. Use of Integrated Cell Culture-PCR To Evaluate the Effectiveness of Poliovirus Inactivation by Chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(5), p. 2267-8.

BLANTON, L.H., ADAMS, S.M., BEARD, R.S., WEI, G., BULENS, S.N., WIDDOWSON, M.A., GLASS, R.I. AND MONROE, S.S. Molecular and epidemiologic trends of caliciviruses associated with outbreaks of acute gastroenteritis in the United States, 2000-2004. *Journal of Infectious Disease*, 2006, 193(3), pp. 413-21.

BLINKOVA O., ROSARIO K., LI L., KAPOOR A., SLIKAS B., BERNARDIN F., BREITBART M., DELWART E. Frequent Detection of Highly Diverse Variants of Cardiovirus, Cosavirus, Bocavirus, and Circovirus in Sewage Samples Collected in the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, 47(11), pp. 3507-13.

BOCCIA D., TOZZI A. E., COTTER B., RIZZO C., RUSSO T., BUTTINELLI G., CAPRIOLI A., MARZIANO M. L., RUGGERI F. M. Waterborne outbreak of Norwalk-like virus gastroenteritis at a tourist resort, Italy. *Emerging Infect. Dis.*, 2002, 8(6), pp. 563-68.

BOFILL-MAS S., GIRONES R. Role of the environment in the transmission of JC virus. *J. Neurovirol.*, 2003, 9(1), pp. 54-58.

BOFILL-MAS S., PINA S., GIRONES R. Documenting the epidemiologic patterns of polyomaviruses in human populations by studying their presence in urban sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(1), pp. 238-45.

BOFILL-MAS S., RODRIGUEZ-MANZANO J., CALGUA B., CARRATALA A., GIRONES R. Newly described human polyomaviruses Merkel cell, KI and WU are present in urban sewage and may represent potential environmental contaminants. *Viol. J.*, 2010, 7, p. 141.

BOSCH A., GUIX S., SANO D., PINTÓ R. M. New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Current Opinion in Biotechnology*, 2008, 19(3), pp. 295-301.

BOSSHARD F, ARMAND F, HAMELIN R, KOHN T. Mechanisms of human adenovirus inactivation by sunlight and UVC light as examined by quantitative PCR and quantitative proteomics. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(4), pp. 1325-32.

BOXMAN I. L. A., TE LOEKE N. A. J. M., KLUNDER K., HÄGELE G., JANSEN C. C. C. Surveillance study of hepatitis A virus RNA on fig and date samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(3), pp. 878-79.

BRANDENBURG B., LEE L. Y., LAKADAMYALI M., RUST M. J., ZHUANG X., HOGLE J. M. Imaging poliovirus entry in live cells. *PLoS Biol.*, 2007, 5(7), p. 183.

BRESCIA C. C., GRIFFIN S. M., WARE M. W., VARUGHESE E. A., EGOROV A. I., VILLEGAS E. N. Cryptosporidium Propidium Monoazide-PCR, a Molecular Biology-Based Technique for Genotyping of Viable Cryptosporidium Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(21), pp. 6856-63.

BRINKMAN N. E., FOUT G. S. Development and evaluation of a generic tag array to detect and genotype noroviruses in water. *J. Virol. Methods*, 2009, 156(1-2), pp. 8-18.

BROO K, WEI J, MARSHALL D, BROWN F, SMITH TJ, JOHNSON JE, SCHNEEMANN A, SIUZDAK G. Viral capsid mobility: a dynamic conduit for inactivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, pp. 2274-77.

BRUGGINK L. D., WITLOX K. J., SAMEER R., CATTON M. G., MARSHALL J. A. Evaluation of the RIDA(®)QUICK immunochromatographic norovirus detection assay using specimens from Australian gastroenteritis incidents. *J. Virol. Methods*, 2011, 173(1), pp. 121-6.

DE BRUIN E., DUIZER E., VENNEMA H., KOOPMANS M. P. G. Diagnosis of Norovirus outbreaks by commercial ELISA or RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 2006, 137(2), p. 259-64.

BURTON-MACLEOD J. A., KANE E. M., BEARD R. S., HADLEY L. A., GLASS R. I., ANDO T. Evaluation and Comparison of Two Commercial Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits for Detection of Antigenically Diverse Human Noroviruses in Stool Samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, 42(6), pp. 2587-95.

BUSTIN S. A., BENES V., GARSON J. A., HELLEMANS J., HUGGETT J., KUBISTA M., MUELLER R., NOLAN T., PFAFFL M. W., SHIPLEY G. L., VANDESOMPELE J., WITTEWER C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.*, 2009, 55(4), pp. 611-22.

CAILLOU, S., CASTAGNARO, N. & NAVAL, M. Sewage sludges: application of a technique for recovering Enterovirus. *Rev. Argent. Microbiol.*, 1998, 30(2), pp. 96-99.

CALDER L., SIMMONS G., THORNLEY C., TAYLOR P., PRITCHARD K., GREENING G., BISHOP J. An outbreak of hepatitis A associated with consumption of raw blueberries. *Epidemiology and Infection*, 2003, 131, pp. 745-51.

CALENDRIER VACCINAL DETAILLE 2013. Ministère Affaires sociales et Santé. Disponible sur : http://www.sante.gouv.fr/IMG/pdf/Calendrier_vaccinal_detaille_2013_ministere_Affaires_sociales_et_Sante-_pdf.pdf (consulté le 17 novembre 2013).

CALGUA B., BARARDI C. R. M., BOFILL-MAS S., RODRIGUEZ-MANZANO J., GIRONES R. Detection and quantitation of infectious human adenoviruses and JC polyomaviruses in water by immunofluorescence assay. *Journal of Virological Methods*, 2011, 171(1), pp. 1-7.

CANTERA J. L., CHEN W., YATES M. V. Detection of Infective Poliovirus by a Simple, Rapid, and Sensitive Flow Cytometry Method Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer Technology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(2), pp. 584-88.

CAO J., WANG Y., SONG H., MENG Q., SHENG L., BIAN T., MAHEMUTI W., YIERHALI A., OMATA M., BI S. Hepatitis A outbreaks in China during 2006: application of molecular epidemiology. *Hepato Int.*, 2009, 3(2), pp. 356-63.

CARTER M. J. Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection ». *J. Appl. Microbiol.*, 2005, 98(6), pp. 1354-80.

CE (Commission européenne). Règlement de la Commission du 15 novembre 2005 n° 2703/2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. 2005.

CHANCELLOR D. D., TYAGI S., BAZACO M. C., BACVINSKAS S., CHANCELLOR M. B., DATO V. M., DE MIGUEL F. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *J. Food Prot.*, 2006, 69(6), pp. 1468-72.

CHAPRON C. D., BALLESTER N. A., FONTAINE J. H., FRADES C. N., MARGOLIN A. B. Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, 66(6), pp. 2520-25.

CHARLTON M., ADJEI P., POTERUCHA J., ZEIN N., MOORE B., THERNEAU T., KROM R., WIESNER R. TT-virus infection in North American blood donors, patients with fulminant hepatic failure, and cryptogenic cirrhosis. *Hepatology*, 1998, 28(3), pp. 839-42.

CHEN T.-C., CHEN G.-W., HSIUNG C. A., YANG J.-Y., SHIH S.-R., LAI Y.-K., JUANG J.-L. Combining multiplex reverse transcription-PCR and a diagnostic microarray to detect and differentiate enterovirus 71 and coxsackievirus A16. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(6), pp. 2212-19.

CHIBA S, SAKUMA Y, KOGASAKA R, AKIHARA M, HORINO K, NAKAO T, FUKUI S. An outbreak of gastroenteritis associated with calicivirus in an infant home. *J. Med. Virol.*, 1979, 4, pp. 249-54.

CHIBA S., NAKATA S., NUMATA-KINOSHITA K., HONMA S. Sapporo virus: history and recent findings. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181(2), pp. S303-8.

CHIU C. Y., GRENINGER A. L., CHEN E. C., HAGGERTY T. D., PARSONNET J., DELWART E., DERISI J. L., GANEM D. Cultivation and serological characterization of a human Theiler's-like cardiovirus associated with diarrheal disease. *J. Virol.*, 2010, 84(9), pp. 4407-14.

CHIZHIKOV V., WAGNER M., IVSHINA A., HOSHINO Y., KAPIKIAN A. Z., CHUMAKOV K. Detection and genotyping of human group A rotaviruses by oligonucleotide microarray hybridization. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(7), pp. 2398-2407.

CHOO YJ, KIM SJ. Detection of human adenoviruses and enteroviruses in Korean oysters using cell culture, integrated cell culture-PCR, and direct PCR. *J. Microbiol.*, 2006, 44(2), pp. 162-70.

CHRISTOPHER P. J., GROHMANN G. S., MILLSON R. H., MURPHY A. M. Parvovirus gastroenteritis--a new entity for Australia. *Med. J. Aust.*, 1978, 1(3), pp. 121-24.

CHU C.-M., CHENG V. C. C., HUNG I. F. N., CHAN K.-S., TANG B. S. F., TSANG T. H. F., CHAN K.-H., YUEN K.-Y. Viral load distribution in SARS outbreak. *Emerging Infect. Dis.*, 2005, 11(12), pp. 1882-86.

CLIVER D. O. Capsid and Infectivity in Virus Detection. *Food Environ. Virol.*, 2009, 1(3-4), pp. 123-28.

COSTANTINI V., GRENZ L., FRITZINGER A., LEWIS D., BIGGS C., HALE A., VINJÉ J. Diagnostic Accuracy and Analytical Sensitivity of IDEIA Norovirus Assay for Routine Screening of Human Norovirus. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, 48(8), pp. 2770-78.

COUDRAY-MEUNIER C, FRAISSE A, MARTIN-LATIL S, GUILLIER L, PERELLE S. Discrimination of infectious hepatitis A virus and rotavirus by combining dyes and surfactants with RT-qPCR. *BMC Microbiology*, 2013, 13, pp. 216.

CRABTREE K. D., GERBA C. P., ROSE J. B., HAAS C. N. Waterborne adenovirus: A risk assessment. *Water Sci. Technol.*, 1997, 35(11-12), pp. 1-6.

CROCI L., CICCOCCHI M., DE MEDICI D., DI PASQUALE S., FIORE A., MELE A., TOTI L. Inactivation of Hepatitis A virus in heat-treated mussels. *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 87(6), pp. 884-888.

CROMEANS T. L., KAHLER A. M., HILL V. R. Inactivation of adenoviruses, enteroviruses, and murine norovirus in water by free chlorine and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(4), pp. 1028-33.

CSHPF (Conseil Supérieur d'Hygiène Publique de France). Recommandations sur la méthodologie d'investigation en cas de contamination ou de suspicion de contamination microbienne des eaux destinées à la consommation humaine, séance du 4 octobre 2005. 2005, p. 13.

CUBITT W. D. Diagnosis, occurrence and clinical significance of the human *Candidatus* caliciviruses. *Prog. Med. Virol.*, 1989, 36, pp. 103-19.

CUPELLI K, STEHLE T. Viral attachment strategies: the many faces of adenoviruses. *Curr. Opin. Virol.*, 2011, 1(2), pp. 84-91.

CURRY A. Electron microscopy and the investigation of new infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.*, 2003, 7(4), pp. 251-57.

CUTHBERT J. A. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2001, 14(1), pp. 38-58.

D'AGOSTINO M., COOK N., RODRIGUEZ-LAZARO D., RUTJES S. Nucleic Acid Amplification-Based Methods for Detection of Enteric Viruses: Definition of Controls and Interpretation of Results. *Food Environ. Virol.*, 2011, 3(2), pp. 55-60.

DAI X. Q., HUA X. G., SHAN T. L., DELWART E., ZHAO W. Human cosavirus infections in children in China. *J. Clin. Virol.*, 2010, 48(3), pp. 228-29.

DALIANIS T., HIRSCH H. H. Human polyomaviruses in disease and cancer. *Virology*, 2013, 437(2), pp. 63-72.

DAVID S.T., MCINTYRE L., MACDOUGALL L., KELLY D., LIEM S., SCHALLIE K., MCNABB A., HOUDE A., MUELLER P., WARD P., TROTTIER Y.L., BRASSARD J. An outbreak of norovirus caused by consumption of oysters from geographically dispersed harvest sites, British Columbia, Canada, 2004. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2007, 4, pp. 349-358.

DENNEHY P. H., NELSON S. M., SPANGENBERGER S., NOEL J. S., MONROE S. S., GLASS R. I. A prospective case-control study of the role of astrovirus in acute diarrhea among hospitalized young children. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184(1), pp. 10-15.

DESSELBERGER U. Rotaviruses. *Virus Res.*, 2014, 190, pp. 75-96.

DETRAGLIA M. C., BRAND J. S., TOMETSKO A. M. Characterization of azidobenzamidines as photoaffinity labels for trypsin. *J. Biol. Chem.*, 1978, 253(6), pp. 1846-52.

DICAPRIO E., MA Y., PURGIANTO A., HUGHES J., LI J. Internalization and Dissemination of Human Norovirus and Animal Caliciviruses in Hydroponically Grown Romaine Lettuce. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(17), pp. 6143-52.

DIKA C. Propriétés interfaciales des virus, concept de particules molles multicouches, corrélation avec les capacités d'adhésion. Thèse de doctorat d'Université. Nancy : Université de Lorraine, 2013, 161p.

DIVIZIA M., GABRIELI R., DONIA D., MACALUSO A., BOSCH A., GUIX S., SÁNCHEZ G., VILLENA C., PINTÓ R. M., PALOMBI L., BUONUOMO E., CENKO F., LENO L., BEBECI D., BINO S. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Sci. Technol.*, 2004, 50(1), pp. 57-61.

DOLIN R. Noroviruses--challenges to control. *N. Engl. J. Med.*, 2007, 357(11), pp. 1072-73.

DONG J, DONG L, MÉNDEZ E, TAO Y. Crystal structure of the human astrovirus capsid spike. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, 2011, 108(31), pp. 12681-86.

DORÉ B., KEAVENEY S., FLANNERY J., RAJKO-NENOW P. Management of health risks associated with oysters harvested from a norovirus contaminated area, Ireland, February-March 2010. *Euro Surveill.*, 2010, 15(19), p. pii/19567.

DUBOIS E, AGIER C, TRAORÉ O, HENNECHART C, MERLE G, CRUCIÈRE C, LAVERAN H. Modified concentration method for the detection of enteric viruses on fruits and vegetables by reverse transcriptase-polymerase chain reaction or cell culture. *J. Food Prot.*, 2002, 65(12), pp. 1962-69.

DUNAMS D., SARKAR P., CHEN W., YATES M. V. Simultaneous detection of infectious human echoviruses and adenoviruses by an in situ nuclease-resistant molecular beacon-based assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, 78(5), pp. 1584-88.

DUPUIS P., BEBY A., BOURGOIN A., LUSSIER-BONNEAU M. D., AGIUS G. Epidemic of viral gastroenteritis in an elderly community. *Presse Med.*, 1995, 24(7), pp. 356-58.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal*, 2011, 9(7), p. 2190.

EFSA (European Food Safety Authority). Scientific Opinion on Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. 2012. Disponible sur : <http://archimer.ifremer.fr/doc/00066/17735/> (consulté le 21 octobre 2013)

ELLIS M. E., WATSON B., MANDAL B. K., DUNBAR E. M., CRASKE J., CURRY A., ROBERTS J., LOMAX J. Micro-organisms in gastroenteritis. *Arch. Dis. Child.*, 1984, 59(9), pp. 848-55.

ENAM S., DEL VALLE L., LARA C., GAN D.-D., ORTIZ-HIDALGO C., PALAZZO J. P., KHALILI K. Association of human polyomavirus JCV with colon cancer: evidence for interaction of viral T-antigen and beta-catenin. *Cancer Res.*, 2002, 62(23), pp. 7093-7101.

ENRIQUEZ C. E., HURST C. J., GERBA C. P. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Research*, 1995, 29(11), pp. 2548-53.

ETHELBERG S., LISBY M., BOTTIGER B., SCHULTZ A.C., VILLIF A., JENSEN T., OLSEN K.E., SCHEUTZ F., KJELSO C., MULLER L. Outbreaks of gastroenteritis linked to lettuce, Denmark, January 2010. *Eurosurveillance*, 2010, 15, pp. 2-4.

FANKHAUSER R. L., MONROE S. S., NOEL J. S., HUMPHREY C. D., BRESEE J. S., PARASHAR U. D., ANDO T., GLASS R. I. Epidemiologic and Molecular Trends of Rotavirus-like Viruses Associated with Outbreaks of Gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis.*, 2002, 186(1), pp. 1-7.

FAUQUET C. M., FARGETTE D. International Committee on Taxonomy of Viruses and the 3,142 unassigned species. *Virology*, 2005, 2, p. 64.

FITTIPALDI M., RODRIGUEZ N. J. P., CODONY F., ADRADOS B., PEÑUELA G. A., MORATÓ J. Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR. *Journal of Virological Methods*, 2010, 168(1&2), p. 228-32.

FITTIPALDI M., NOCKER A., CODONY F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *Journal of Microbiological Methods*, 2012,91(2), pp. 276-89.

FLEKNA G., ŠTEFANIČ P., WAGNER M., SMULDERS F. J. M., MOŽINA S. S., HEIN I. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Research in Microbiology*, 2007, 158(5), pp. 405-12.

FONG T.-T., LIPP E. K. Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2005, 69(2), pp. 357-71.

FONG T.-T., PHANIKUMAR M. S., XAGORARAKI I., ROSE J. B. Quantitative detection of human adenoviruses in wastewater and combined sewer overflows influencing a Michigan river. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(3), pp. 715-23.

FOULONGNE V., RODIÈRE M., SEGONDY M. Human Bocavirus in children. *Emerging Infect. Dis.*, 2006, 12(5), pp. 862-63.

FSA (Food Standards Agency). A report of infectious intestinal disease in England. 2000, London: Food Standards Agency, HMSO.

FSA (Food Standards Agency). The second study of infectious intestinal disease in the community (IID2 Study). 2012, London: Food Standards Agency, HMSO.

GAJARDO R., BOUHRITI N., PINTÓ R. M., BOSCH A. Genotyping of rotaviruses isolated from sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1995, 61(9), pp. 3460-62.

GALLOT C, GROUT L, ROQUE-AFONSO AM, COUTURIER E, CARRILLO-SANTISTEVE P, POUHEY J, LETORT MJ, HOPPE S, CAPDEPON P, SAINT-MARTIN S, DE VALK H, VAILLANT V. Hepatitis A associated with semidried tomatoes, France, 2010. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, 17(3), pp. 566-67.

GANESH A., LIN J. Waterborne human pathogenic viruses of public health concern. *Int. J. Environ. Health Res.*, 2013. 23(6), pp. 544-64.

GANGULI P. S., CHEN W., YATES M. V. Detection of Murine Norovirus-1 by Using TAT Peptide-Delivered Molecular Beacons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(15), p. 5517-20.

GASSILLOUD B., SCHWARTZBROD L., GANTZER C. Presence of viral genomes in mineral water: A sufficient condition to assume infectious risk? *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(7), p. 3965-69.

GENSBERGER E. T., KOSTIĆ T. Novel tools for environmental virology. *Curr. Opin. Virol.*, 2013, 3(1), pp. 61-68.

GHEBREMEDHIN B. Human adenovirus: Viral pathogen with increasing importance. *Eur. J. Microbiol. Immunol.*, 2014, 4(1), pp. 26-33.

GIBSON U. E., HEID C. A., WILLIAMS P. M. A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Res.*, 1996, 6(10), pp. 995-1001.

GILPATRICK S. G., SCHWAB K. J., ESTES M. K., ATMAR R. L. Development of an immunomagnetic capture reverse transcription-PCR assay for the detection of Norwalk virus. *J. Virol. Methods.*, 2000, 90(1), p. 69-78.

GIRONES R, FERRÚS MA, ALONSO JL, RODRIGUEZ-MANZANO J, CALGUA B, CORRÊA ADE A, HUNDESA A, CARRATALA A, BOFILL-MAS S. Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques. *Water Res.*, 2010, 44(15), pp. 4325-39.

GRABOW, W.O., BOTMA, K.L., DE VILLIERS, J.C., CLAY, C.G. & ERASMUS, B. Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of Poliovirus in wastewater. *Bull. World Health Organ.*, 1999, 77(12), pp. 973-80.

GRAIVER D. A., SAUNDERS S. E., TOPLIFF C. L., KELLING C. L., BARTELT-HUNT S. L. Ethidium monoazide does not inhibit RT-PCR amplification of nonviable avian influenza RNA. *Journal of Virological Methods*, 2010, 164(1&2), pp. 51-54.

GRAVES D. E., WATKINS C. L., YIELDING L. W. Ethidium bromide and its photoreactive analogues: spectroscopic analysis of deoxyribonucleic acid binding properties. *Biochemistry.*, 1981, 20(7), pp. 1887-92.

GRAY J. J., WREGHITT T. G., CUBITT W. D., ELLIOT P. R. An outbreak of gastroenteritis in a home for the elderly associated with astrovirus type 1 and human calicivirus. *J. Med. Virol.*, 1987, 23(4), pp. 377-81.

GRENINGER A. L., RUNCKEL C., CHIU C. Y., HAGGERTY T., PARSONNET J., GANEM D., DERISI J. L. The complete genome of klassevirus - a novel picornavirus in pediatric stool. *Virology Journal*, 2009, 6(1), p. 82.

GRIST N. R., BELL E. J., ASSAAD F. Enteroviruses in human disease. *Prog. Med. Virol.*, 1978, 24, pp. 114-57.

LE GUYADER F.S., NEILL F.H., DUBOIS E., BON F., LOISY F., KOHLI E., POMMEPUY M., ATMAR R.L. A semiquantitative approach to estimate Norwalk-like virus contamination of oysters implicated in an outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 2003, 87, pp. 107-112.

LE GUYADER F.S., MITTELHOLZER C., HAUGARREAU L., HEDLUND K.O., ALSTERLUND R., POMMEPUY M., SVENSSON L. Detection of noroviruses in raspberries associated with a gastroenteritis outbreak. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 97, pp. 179-186.

LE GUYADER F. S., BON F., DEMEDICI D., PARNAUDEAU S., BERTONE A., CRUDELI S., DOYLE A., ZIDANE M., SUFFREDINI E., KOHLI E., MADDALO F., MONINI M., GALLAY A., POMMEPUY M., POTHIER P., RUGGERI F. M. Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(11), pp. 3878-82.

LE GUYADER F.S., LE SAUX J.C., AMBERT-BALAY K., KROL J., SERAIS O., PARNAUDEAU S., GIRAUDON H., DELMAS G., POMMEPUY M., POTHIER P. Aichi virus, norovirus, astrovirus, enterovirus, and rotavirus involved in clinical cases from a French oyster-related gastroenteritis outbreak. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008, 46, pp. 4011-17.

LE GUYADER F. S., OLLIVIER J., LE SAUX J.C., GARRY P., Les virus entériques humains et l'eau. *Revue Francophone des Laboratoires*, 2014, 2014(459), pp. 41-49.

HAAS CN, ROSE JB, GERBA CP. *Quantitative Microbial Risk Assessment*. John Wiley & Sons Ed. New York, 1999, 464p.

HALL A. J., ROSENTHAL M., GREGORICUS N., GREENE S. A., FERGUSON J., HENAO O. L., VINJÉ J., LOPMAN B. A., PARASHAR U. D., WIDDOWSON M.-A. Incidence of acute gastroenteritis and role of norovirus, Georgia, USA, 2004-2005. *Emerging Infect. Dis.*, 2011, 17(8), pp. 1381-88.

HALL A. J., CURNS A. T., MCDONALD L. C., PARASHAR U. D., LOPMAN B. A. The roles of *Clostridium difficile* and norovirus among gastroenteritis-associated deaths in the United States, 1999-2007. *Clin. Infect. Dis.*, 2012, 55(2), pp. 216-23.

HAMZA I. A., JURZIK L., WILHELM M., ÜBERLA K. Detection and quantification of human bocavirus in river water. *J. Gen. Virol.*, 2009, 90(11), pp. 2634-37.

HAMZA I. A., JURZIK L., ÜBERLA K., WILHELM M. Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011, 214(6), pp. 424-36.

HANSMAN G. S., OKA T., KATAYAMA K., TAKEDA N. Human sapoviruses: genetic diversity, recombination, and classification. *Rev. Med. Virol.*, 2007, 17(2), pp. 133-41.

HARAMOTO E., KITAJIMA M., KATAYAMA H., OHGAKI S. Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan. *Water Res.*, 2010, 44(6), pp. 1747-52.

HARDY M. E., WHITE L. J., BALL J. M., ESTES M. K. Specific proteolytic cleavage of recombinant Norwalk virus capsid protein. *J. Virol.*, 1995, 69(3), pp. 1693-98.

HARLEY D., HARROWER B., LYON M., DICK A. A primary school outbreak of pharyngoconjunctival fever caused by adenovirus type 3. *Commun. Dis. Intell.*, 2001, 25(1), pp. 9-12.

HARVALA H., SIMMONDS P. Human parechoviruses: Biology, epidemiology and clinical significance. *Journal of Clinical Virology*, 2009, 45(1), pp. 1-9.

HARVALA H., MCINTYRE C. L., MCLEISH N. J., KONDRACKA J., PALMER J., MOLYNEAUX P., GUNSON R., BENNETT S., TEMPLETON K., SIMMONDS P. High detection frequency and viral loads of human rhinovirus species A to C in fecal samples; diagnostic and clinical implications. *Journal of Medical Virology*, 2012, 84(3), pp. 536-42.

HAURI A. M., SCHIMMELPFENNIG M., WALTER-DOMES M., LETZ A., DIEDRICH S., LOPEZ-PILA J., SCHREIER E. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiol. Infect.*, 2005, 133(2), pp. 291-98.

HCSP (Haut Conseil de la Santé Publique). Avis relatif à la vaccination des nourrissons vis-à-vis des gastro-entérites à rotavirus du 29 Novembre 2013. Disponible sur : <http://www.hcsp.fr/explore.cgi/avisrapportsdomaine?clefr=404> (consulté le 20 mars 2014)

HEID C. A., STEVENS J., LIVAK K. J., WILLIAMS P. M. Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, 1996, 6(10), pp. 986-94.

HENDRY E.H. HATANAKA H, FRY E, SMYTH M, TATE J, STANWAY G, SANTTI J, MAARONEN M, HYYPIA T, STUART D. The crystal structure of coxsackievirus A9: new insights into the uncoating mechanisms of enteroviruses. *Structure*, 1999, 7, pp. 1527-38.

HERRMANN J. E., TAYLOR D. N., ECHEVERRIA P., BLACKLOW N. R. Astroviruses as a cause of gastroenteritis in children. *N. Engl. J. Med.*, 1991, 324(25), pp. 1757-60.

HEWITT J., BELL D., SIMMONS G. C., RIVERA-ABAN M., WOLF S., GREENING G. E. Gastroenteritis outbreak caused by waterborne norovirus at a New Zealand ski resort. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(24), pp. 7853-57.

HIJNEN WA, BEERENDONK EF, MEDEMA GJ. Inactivation credit of UV radiation for viruses, bacteria and protozoan (oo)cysts in water: a review. *Water Res.*, 2006, 40(1), pp. 3-22.

HIMEDA T., OHARA Y. Saffold Virus, a Novel Human Cardiovirus with Unknown Pathogenicity. *J. Virol.*, 2012, 86(3), pp. 1292-96.

HIRNEISEN K. A., KNIEL K. E. Comparison of ELISA attachment and infectivity assays for murine norovirus. *Journal of Virological Methods*, 2012, 186(1&2), pp. 14-20.

HIRNEISEN K. A., SHARMA M., KNIEL K. E. Human Enteric Pathogen Internalization by Root Uptake into Food Crops. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, 9(5), pp. 396-405.

HOEBE C. J. P. A., VENNEMA H., DE RODA HUSMAN A. M., VAN DUYNHOVEN Y. T. H. P. Norovirus outbreak among primary schoolchildren who had played in a recreational water fountain. *J. Infect. Dis.*, 2004, 189(4), pp. 699-705.

HOLLAND J. J., HOYER B. H., MCLAREN L. C., SYVERTON J. T. Enteroviral ribonucleic acid. I. Recovery from virus and assimilation by cells. *J. Exp. Med.*, 1960, 112, pp. 821-39.

HOLTZ L. R., FINKBEINER S. R., KIRKWOOD C. D., WANG D. Identification of a novel picornavirus related to cosaviruses in a child with acute diarrhea. *Virol. J.*, 2008, 5, p. 159.

HONKANEN H., OIKARINEN S., PELTONEN P., SIMELL O., ILONEN J., VEIJOLA R., KNIP M., HYÖTY H. Human rhinoviruses including group C are common in stool samples of young Finnish children. *J. Clin. Virol.*, 2013, 56(3), p. 250-54.

HOT D., LEGEAY O., JACQUES J., GANTZER C., CAUDRELIER Y., GUYARD K., LANGE M., ANDRÉOLETTI L. Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.*, 2003, 37(19), pp. 4703-10.

HOYT, J.L. & MARGOLIN, A.B. Fortified sera and their use in environmental virology. *Applied Environmental Microbiology*, 2000, 66(5), pp. 2259-62.

HUANG R. T., LI D. R., WEI J., HUANG X. R., YUAN X. T., TIAN X. Isolation and identification of hepatitis E virus in Xinjiang, China. *J. Gen. Virol.*, 1992, 73(5), pp. 1143-48.

HUGUES B. Nouvelle utilisation de la méthode du nombre le plus probable en virologie : application à la mise en évidence et à la quantification des virus dans le milieu hydrique. Thèse d'Université. Université de Metz. 1981. 285p.

HWANG Y.-C., CHEN W., YATES M. V. Use of Fluorescence Resonance Energy Transfer for Rapid Detection of Enteroviral Infection In Vivo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006, 72(5), pp. 3710-15.

HWANG Y.-C., LEONG O. M., CHEN W., YATES M. V. Comparison of a Reporter Assay and Immunomagnetic Separation Real-Time Reverse Transcription-PCR for the Detection of Enteroviruses in Seeded Environmental Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007,73(7), pp. 2338-40.

IRANI D. N. Aseptic Meningitis and Viral Myelitis. *Neurologic Clinics*, 2008, 26(3), pp. 635-55.

ISHIBASHI M., YASUE H. Adenoviruses of Animals. Ginsberg HS, Ed. Springer US, 1984. pp. 497-562.

ISO/TS 15216. Microbiology of food and animal feed -- Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR. 2013. Part 1 et 2.

JÄÄSKELÄINEN A. J., MAUNULA L. Applicability of microarray technique for the detection of noro- and astroviruses. *J. Virol. Methods*, 2006, 136(1-2), pp. 210-16.

JACOBSEN KH, WIERSMA ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*, 2010, 28(41), pp. 6653-37.

JAĪDANE H., HOBBER D. Role of coxsackievirus B4 in the pathogenesis of type 1 diabetes. *Diabetes Metab.*, 2008, 34(6), pp. 537-48.

JOHANSSON P. J., BERGENTOFT K., LARSSON P. A., MAGNUSSON G., WIDELL A., THORHAGEN M., HEDLUND K. O. A nosocomial sapovirus-associated outbreak of gastroenteritis in adults. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 2005, 37(3), pp. 200-204.

JOHANSSON P. J., SVEGER T., AHLFORS K., EKSTRAND J., SVENSSON L. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand. J. Infect.*, 1996, 28(2), pp. 117-20.

JONES E. L., GAITHER M., KRAMER A., GERBA C. P. An analysis of water quality in the Colorado River, 2003-04; an investigation into recurring outbreaks of norovirus among rafters. *Wilderness Environ. Med.*, 2009, 20(1), pp. 6-13.

JONES M. S., LUKASHOV V. V., GANAC R. D., SCHNURR D. P. Discovery of a Novel Human Picornavirus in a Stool Sample from a Pediatric Patient Presenting with Fever of Unknown Origin. *J. Clin. Microbiol.*, 2007, 45(7), pp. 2144-50.

JOSKE R. A., KEALL D. D., LEAK P. J., STANLEY N. F., WALTERS M. N. hepatitis-encephalitis in humans with reovirus infection. *Arch. Intern. Med.*, 1964, 113, pp. 811-16.

KAHLER, A.M., CROMEANS, T.L., ROBERTS, J.M. AND HILL, V.R. Effects of source water quality on chlorine inactivation of adenovirus, coxsackievirus, echovirus, and murine norovirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2010, 76(15), pp. 5159-64.

KAPIKIAN A. Z. The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J. Infect. Dis.*, 2000, 181(2), pp. S295-302.

KAPIKIAN A. Z., WYATT R. G., DOLIN R., THORNHILL T. S., KALICA A. R., CHANOCK R. M. Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J. Virol.*, 1972, 10(5), pp. 1075-81.

KAPLAN N. M., DOVE W., ABU-ZEID A. F., SHAMOON H. E., ABD-ELDAYEM S. A., HART C. A. Human bocavirus infection among children, Jordan. *Emerging Infect. Dis.*, 2006, 12(9), pp. 1418-20.

KAPOOR A., VICTORIA J., SIMMONDS P., SLIKAS E., CHIEOCHANSIN T., NAEEM A., SHAUKAT S., SHARIF S., ALAM M. M., ANGEZ M., WANG C., SHAFER R. W., ZAIDI S., DELWART E. A highly prevalent and genetically diversified Picornaviridae genus in South Asian children. *PNAS*, 2008, 105(51), pp. 20482-87.

KELE B., LENGYEL G., DEAK J. Comparison of an ELISA and two reverse transcription polymerase chain reaction methods for norovirus detection. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, 70(4), pp. 475-78.

KESEBIR D., VAZQUEZ M., WEIBEL C., SHAPIRO E. D., FERGUSON D., LANDRY M. L., KAHN J. S. Human bocavirus infection in young children in the United States: molecular epidemiological profile and clinical characteristics of a newly emerging respiratory virus. *J. Infect. Dis.*, 2006, 194(9), pp. 1276-82.

KHUROO M. S. Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.*, 1980, 68(6), pp. 818-24.

KHUROO M. S., DUERMAYER W., ZARGAR S. A., AHANGER M. A., SHAH M. A. Acute sporadic non-A, non-B hepatitis in India. *Am. J. Epidemiol.*, 1983, 118(3), pp. 360-64.

KIM K., KATAYAMA H., KITAJIMA M., TOHYA Y., OHGAKI S. Development of a real-time RT-PCR assay combined with ethidium monoazide treatment for RNA viruses and its application to detect viral RNA after heat exposure. *Water Sci. Technol.*, 2011, 63(3), pp. 502-07.

KINGSLEY D.H., MEADE G.K., RICHARDS G.P. Detection of both hepatitis A virus and Norwalk-like virus in imported clams associated with food-borne illness. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002, 68, pp. 3914-18.

KNIGHT A., LI D., UYTENDAELE M., JAYKUS L.-A. A critical review of methods for detecting human noroviruses and predicting their infectivity. *Critical Reviews in Microbiology*, 2013, 39(3), pp. 295-309.

KNOWLES N. J., HOVI T., HYYPIÄ T., HOVI A. M. Q. Picornaviridae. In : *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. San Diego, 2012, pp. 855-80.

KO G., CROMEANS T. L., SOBSEY M. D. Detection of Infectious Adenovirus in Cell Culture by mRNA Reverse Transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(12), pp. 7377-84.

KO G., JOTHIKUMAR N., HILL V. R., SOBSEY M. D. Rapid detection of infectious adenoviruses by mRNA real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods*, 2005, 127(2), pp. 148-53.

KONDURU K., KAPLAN G. G. Stable growth of wild-type hepatitis A virus in cell culture. *J. Virol.*, 2006, 80(3), pp. 1352-60.

KOOPMANS M., DUIZER E. Foodborne viruses: an emerging problem. *Int. J. Food Microbiol.*, 2004, 90(1), pp. 23-41.

KOOPMANS M., VON BONSDORFF C.-H., VINJÉ J., DE MEDICI D., MONROE S. Foodborne viruses. *FEMS Microbiology Reviews*, 2002, 26(2), pp. 187-205

KOROGLU M., YAKUPOGULLARI Y., OTLU B., OZTURK S., OZDEN M., OZER A., SENER K., DURMAZ R. A waterborne outbreak of epidemic diarrhea due to group A rotavirus in Malatya, Turkey. *New Microbiol.*, 2011, 34(1), pp. 17-24.

KOSTELA J., AYERS M., NISHIKAWA J., MCINTYRE L., PETRIC M., TELLIER R. Amplification by long RT-PCR of near full-length norovirus genomes. *Journal of Virological Methods*, 2008, 149(2), pp. 226-30.

KOTLOFF K. L., LOSONSKY G. A., MORRIS J. G. Jr, WASSERMAN S. S., SINGH-NAZ N., LEVINE M. M. « Enteric adenovirus infection and childhood diarrhea: an epidemiologic study in three clinical settings. *Pediatrics*, 1989, 84(2), pp. 219-30.

KOWALSKI W, BAHNFLETH W, HERNANDEZ M. A genomic model for predicting the ultraviolet susceptibility of viruses. *IUVA News*, 2009, 11, pp. 15-28.

KUKAVICA-IBRULJ I, DARVEAU A, JEAN J, FLISS I. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of Applied Microbiology*, 2004, 97, pp. 923-34.

KURTZ J.B., LEE T.W. Astrovirus gastroenteritis age distribution of antibody. *Med. Microbiol. Immunol.*, 1978, 166(1-4), pp. 227-30.

KURTZ J. B., LEE T. W. Human astrovirus serotypes. *Lancet*, 1984, 2(8416), p. 1405.

LANGLET J., GABORIAUD F., GANTZER C. Effects of pH on plaque forming unit counts and aggregation of MS2 bacteriophage. *Journal of Applied Microbiology*, 2007, 103(5), pp. 1632-38.

LAU C.-S., WONG D. A., TONG L. K. L., LO J. Y. C., MA A. M. C., CHENG P. K. C., LIM W. W. L. High rate and changing molecular epidemiology pattern of norovirus infections in sporadic cases and outbreaks of gastroenteritis in Hong Kong. *J. Med. Virol.*, 2004, 73(1), pp. 113-17.

LAU S. K. P., YIP C. C. Y., LUNG D. C., LEE P., QUE T.-L., LAU Y.-L., CHAN K.-H., WOO P. C. Y., YUEN K.-Y. Detection of human rhinovirus C in fecal samples of children with gastroenteritis. *J. Clin. Virol.*, 2012, 53(4), pp. 290-96.

L'AZOU M, DUCHEN C. Épidémie de gastro-entérites aiguës liée à la consommation d'eau dans un camping de Vallon-Pont-d'Arc en Ardèche (07) - Août 2008. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, 2012. 27 p. Disponible sur: www.invs.sante.fr (consulté le 6 février 2014)

LEE C.-S., LEE J.-H., KWON K.-S. Outbreak of hepatitis A in Korean military personnel. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2008, 61(3), pp. 239-41.

LEE R. M., LESSLER J., LEE R. A., RUDOLPH K. E., REICH N. G., PERL T. M., CUMMINGS D. A. Incubation periods of viral gastroenteritis: a systematic review. *BMC Infect. Dis.*, 2013, 13(1), p. 446.

LEE T. W., KURTZ J. B. Human astrovirus serotypes. *J. Hyg. (Lond.)*, 1982, 89(3), pp. 539-40.

LEE-MONTIEL F. T., REYNOLDS K. A., RILEY M. R. Detection and quantification of poliovirus infection using FTIR spectroscopy and cell culture. *J. Biol. Eng.*, 2011, 5, p. 16.

LEES D. International Standardisation of a Method for Detection of Human Pathogenic Viruses in Molluscan Shellfish. *Food Environ. Virol.*, 2010, 2(3), pp. 146-55.

LEGAY V., TROMPETTE A., CHOMEL J.-J., LINA B. Les Parechovirus : biologie, épidémiologie et diagnostic. *Virologie*, 2003, 7(1), pp. 41-50.

LEUNG W. K., TO K.-F., CHAN P. K. S., CHAN H. L. Y., WU A. K. L., LEE N., YUEN K. Y., SUNG J. J. Y. Enteric involvement of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus infection. *Gastroenterology*, 2003, 125(4), pp. 1011-17.

LEVICAN J., NAVAS E., ORIZOLA J., AVENDAÑO L. F., GAGGERO A. Human bocavirus in children with acute gastroenteritis, Chile, 1985-2010. *Emerging Infect. Dis.*, 2013, 19(11), pp. 1877-80.

LEVINE R., WILLIAMS J., STADTMAN E., SHACTER E. Carbonyl Assays for Determination of Oxidatively Modified Proteins. *Methods Enzymol.*, 1994, 233, pp. 346-57.

LEWIS D. C., LIGHTFOOT N. F., CUBITT W. D., WILSON S. A. Outbreaks of astrovirus type 1 and rotavirus gastroenteritis in a geriatric in-patient population. *J. Hosp. Infect.*, 1989, 14(1), pp. 9-14.

LI D., GU A. Z., HE M., SHI H.-C., YANG W. UV inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time RT-PCR assay. *Water Research*, 2009, 43(13), pp. 3261-69.

LI D., HE M., JIANG S. C. Detection of Infectious Adenoviruses in Environmental Waters by Fluorescence-Activated Cell Sorting Assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010a, 76(5), pp. 1442-48.

LI D., GU A. Z., YANG W., HE M., HU X., SHI H.-C. An integrated cell culture and reverse transcription quantitative PCR assay for detection of infectious rotaviruses in environmental waters. *Journal of Microbiological Methods*, 2010b, 82(1), pp. 59-63

LI D., BAERT L., VAN COILLIE E., UYTENDAELE M. Critical studies on binding-based RT-PCR detection of infectious Noroviruses. *Journal of Virological Methods*, 2011, 177(2), pp. 153-59.

LI D., BAERT L., XIA M., ZHONG W., VAN COILLIE E., JIANG X., UYTENDAELE M. Evaluation of methods measuring the capsid integrity and/or functions of noroviruses by heat inactivation. *J. Virol. Methods*, 2012, 181(1), pp. 1-5

LI J. W., XIN Z. T., WANG X. W., ZHENG J. L., CHAO F. H. Mechanisms of inactivation of hepatitis A virus by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2002, 68(10), pp. 4951-55.

LODDER W. J., RUTJES S. A., TAKUMI K., DE RODA HUSMAN A. M. Aichi virus in sewage and surface water, the Netherlands. *Emerging Infect. Dis.*, 2013, 19(8), pp. 1222-30.

LOPMAN B. A., REACHER M. H., VAN DUIJNHOFEN Y., HANON F.-X., BROWN D., KOOPMANS M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerging Infect. Dis.*, 2003, 9(1), pp. 90-96.

LOPMAN B., VENNEMA H., KOHLI E., POTHIER P., SANCHEZ A., NEGREDO A., BUESA J., SCHREIER E., REACHER M., BROWN D., GRAY J., ITURRIZA M., GALLIMORE C., BOTTIGER B., HEDLUND K.-O., TORVÉN M., VON BONSDORFF C.-H., MAUNULA L., POLJSAK-PRIJATELJ M., ZIMSEK J., REUTER G., SZÜCS G., MELEGH B., SVENNSON L., VAN DUIJNHOFEN Y., KOOPMANS M. Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet*, 2004, 363(9410), pp. 682-88.

LOWTHER J. A., HENSHILWOOD K., LEES D. N. Determination of norovirus contamination in oysters from two commercial harvesting areas over an extended period, using semiquantitative real-time reverse transcription PCR. *J. Food Prot.*, 2008, 71(7), pp. 1427-33.

LOWTHER J. A., GUSTAR N. E., HARTNELL R. E., LEES D. N. Comparison of norovirus RNA levels in outbreak-related oysters with background environmental levels. *J. Food Prot.*, 2012a, 75(2), pp. 389-93.

LOWTHER J. A., GUSTAR N. E., POWELL A. L., HARTNELL R. E., LEES D. N. Two-year systematic study to assess norovirus contamination in oysters from commercial harvesting areas in the United Kingdom. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012b, 78(16), pp. 5812-17.

LYTLE CD, SAGRIPANTI JL. Predicted inactivation of viruses of relevance to biodefense by solar radiation. *J. Virol.*, 2005, 79, pp. 14244-52.

MA X., ENDO R., ISHIGURO N., EBIHARA T., ISHIKO H., ARIGA T., KIKUTA H. Detection of human bocavirus in Japanese children with lower respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, 44(3), pp. 1132-34.

MARKWELL D. D., SHORTRIDGE K. F. Possible waterborne transmission and maintenance of influenza viruses in domestic ducks. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 43(1), pp. 110-15.

MAUNULA L., KALSO S., VON BONSDORFF C. H., PÖNKÄ A. Wading pool water contaminated with both noroviruses and astroviruses as the source of a gastroenteritis outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 2004, 132(4), pp. 737-43.

MAUNULA L., KLEMOLA P., KAUPPINEN A., SÖDERBERG K., NGUYEN T., PITKÄNEN T., KAIJALAINEN S., SIMONEN M. L., MIETTINEN I. T., LAPPALAINEN M., LAINE J., VUENTO R., KUUSI M., ROIVAINEN M. Enteric Viruses in a Large

Waterborne Outbreak of Acute Gastroenteritis in Finland. *Food Environ. Virol.*, 2009a, 1(1), pp. 31-36.

MAUNULA L., ROIVAINEN M., KERANEN M., MAKELA S., SODERBERG K., SUMMA M., VON BONSDORFF C.H., LAPPALAINEN M., KORHONEN T., KUUSI M., NISKANEN T. Detection of human norovirus from frozen raspberries in a cluster of gastroenteritis outbreaks. *Eurosurveillance*, 2009b, 14, pp. 1618.

MAYR C., STROHE G., CONTZEN M. Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. *International Journal of Food Microbiology*, 2009, 135, pp. 179-182.

MICHEN B., GRAULE T. Isoelectric points of viruses. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 109(2), p. 388-397.

MILLARD J., APPLETON H., PARRY J. V. Studies on heat inactivation of hepatitis A virus with special reference to shellfish. *Epidemiol Infect.*, 1987, 98(3), pp. 397-414.

MIRZAEI H., REGNIER F. Affinity Chromatographic Selection of Carbonylated Proteins Followed by Identification of Oxidation Sites Using Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.*, 2005, 77(8), pp. 2386-92.

MORET H., INGRAND D. Les polyomavirus humains. *Médecine thérapeutique*, 1997, 3(6), pp. 473-79.

MORI Y, MATSUURA Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.*, 2011, 161(1), pp. 59-64.

MOULY D, VAISSIERE E, VINCENT N. Épidémie de gastro-entérites aiguës d'origine hydrique à Pleaux, Cantal, avril 2012. Saint-Maurice : Institut de veille sanitaire, 2013. 41 p. Disponible sur: www.invs.sante.fr (consulté le 6 février 2014)

MURRAY JP, PARKS GA. Poliovirus adsorption on oxide surfaces: correspondence with the DLVO-Lifshitz theory of colloid stability. 1980, American Chemical Society, Washington

MUSCILLO, M., CARDUCCI, A., LA ROSA, G., CANTIANI, L. & MARIANELLI, C. Enteric virus detection in adriatic seawater by cell culture, polymerase chain reaction and polyacrylamide gel electrophoresis. *Water Res.*, 1997, 31(8), pp. 1980-84.

MYRMEL M., RIMSTAD E., WASTESON Y. Immunomagnetic separation of a Norwalk-like virus (genogroup I) in artificially contaminated environmental water samples. *Int. J. Food Microbiol.*, 2000, 62(1-2), pp. 17-26.

AL-NASRAWI K. K., AL DIWAN J. K., AL-HADITHI T. S., SALEH A. M. Viral hepatitis E outbreak in Al-Sadr city, Baghdad, Iraq. *East. Mediterr. Health J.*, 2010, 16(11), pp. 1128-32.

NENONEN N.P., HANNOUN C., OLSSON M.B., BERGSTROM T. Molecular analysis of an oyster-related norovirus outbreak. *Journal of Clinical Virology*, 2009, 45, pp. 105-108.

NIELSEN A. C., BOTTIGER B., BANNER J., HOFFMANN T., NIELSEN L. P. Serious invasive Saffold virus infections in children. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, 18, pp. 7-12.

NG T.L., CHAN P.P., PHUA T.H., LOH J.P., YIP R., WONG C., LIAW C.W., TAN B.H., CHIEW K.T., CHUA S.B., LIM S., OOI P.L., CHEW S.K., GOH K.T. Oyster-associated outbreaks of Norovirus gastroenteritis in Singapore. *The Journal of Infection*, 2005, 51, pp. 413-18.

NISHIZAWA T., OKAMOTO H., KONISHI K., YOSHIZAWA H., MIYAKAWA Y., MAYUMI M. A novel DNA virus (TTV) associated with elevated transaminase levels in posttransfusion hepatitis of unknown etiology. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1997, 241(1), pp. 92-97.

NOCKER A., CAMPER A. K. Novel approaches toward preferential detection of viable cells using nucleic acid amplification techniques. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2009, 291(2), pp. 137-42.

NOCKER A., CHEUNG C.-Y., CAMPER A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *Journal of Microbiological Methods*, 2006, 67(2), pp. 310-20.

NOCKER A., SOSSA-FERNANDEZ P., BURR M. D., CAMPER A. K. Use of Propidium Monoazide for Live/Dead Distinction in Microbial Ecology. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2007, 73(16), pp. 5111-17.

NUANUALSUWAN S., CLIVER D. O. Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses. *Journal of Virological Methods*, 2002, 104(2), pp. 217-25.

NUANUALSUWAN S., CLIVER D. O. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2003, 69(1), pp. 350-57.

NUMAZAKI Y., KUMASAKA T., YANO N., YAMANAKA M., MIYAZAWA T., TAKAI S., ISHIDA N. Further study on acute hemorrhagic cystitis due to adenovirus type 11. *N. Engl. J. Med.*, 1973, 289(7), pp. 344-47.

OGORZALY L., TISSIER A., BERTRAND I., MAUL A., GANTZER C. Relationship between F-specific RNA phage genogroups, faecal pollution indicators and human adenoviruses in river water. *Water Res.*, 2009, 43(5), pp. 1257-64.

OGORZALY L., CAUCHIE H.-M., PENNY C., PERRIN A., GANTZER C., BERTRAND I. Two-day detection of infectious enteric and non-enteric adenoviruses by improved ICC-qPCR. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013a, 97(9), pp. 4159-66.

OGORZALY L., BONOT S., MOUALIJ B. E., ZORZI W., CAUCHIE H.-M. Development of a quantitative immunocapture real-time PCR assay for detecting structurally intact adenoviral particles in water. *Journal of Virological Methods*, 2013b, 194(1-2), pp. 235-41.

OISHI I., YAMAZAKI K., KIMOTO T., MINEKAWA Y., UTAGAWA E., YAMAZAKI S., INOUE S., GROHMANN G. S., MONROE S. S., STINE S. E. A large outbreak of acute gastroenteritis associated with astrovirus among students and teachers in Osaka, Japan. *J. Infect. Dis.*, 1994, 170(2), p. 439-43.

OKOH A. I., SIBANDA T., GUSHA S. S. Inadequately Treated Wastewater as a Source of Human Enteric Viruses in the Environment. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2010, 7(6), pp. 2620-37.

OMS (Organisation Mondiale de la Santé, WHO). Hepatitis A, 2000.

WHO/CDS/CSR/EDC/2000.7, disponible sur :

<http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/whocdscsredc2007/en/> (consulté le 6 mai 2014)

OMS (Organisation Mondiale de la Santé, WHO). Maladies diarrhéiques. 2013a, Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs330/fr/> (consulté le 31 août 2014).

OMS (Organisation Mondiale de la Santé, WHO). Hepatitis E. 2013b. Disponible sur : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> (consulté le 28 octobre 2013).

OMS (Organisation Mondiale de la Santé, WHO). Guidelines for drinking-water quality, third edition, incorporating first and second addenda. 2013c. Disponible sur : http://www.who.int/water_sanitation_health/dwq/gdwq3rev/en/ (consulté le 18 octobre 2013).

OOGANE T., HIRATA A., FUNATOGAWA K., KOBAYASHI K., SATO T., KIMURA H. Food poisoning outbreak caused by norovirus GII/4 in school lunch, Tochigi Prefecture, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*, 2008, 61, pp. 423-424.

ORON G., GOEMANS M., MANOR Y., FEYEN J. Poliovirus distribution in the soil-plant system under reuse of secondary wastewater. *Water Research*, 1995, 29(4), pp. 1069-78.

OUATTARA L., PARANHOS-BACCALÀ G., KOMURIAN-PRADEL F. Les orthoréovirus : virus orphelins ou pathogènes chez l'homme ? *Virologie*, 2008, 12(4), pp. 249-60.

PAN J, DONG L, LIN L, OCHOA WF, SINKOVITS RS, HAVENS MW, NIBERT ML, BAKER TS, GHABRIAL SA, TAO YJ. Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, pp. 4225-30.

- PAPAPETROPOULOU M., VANTARAKIS A. C. Detection of adenovirus outbreak at a municipal swimming pool by nested PCR amplification. *J. Infect.*, 1998, 36(1), pp. 101-03.
- PARASHAR U. D., DOW L., FANKHAUSER R. L., HUMPHREY C. D., MILLER J., ANDO T., WILLIAMS K. S., EDDY C. R., NOEL J. S., INGRAM T., BRESEE J. S., MONROE S. S., GLASS R. I. An outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of sandwiches: implications for the control of transmission by food handlers. *Epidemiol. Infect.*, 1998, 121(3), pp. 615-21.
- PARASHAR U. D., HUMMELMAN E. G., BRESEE J. S., MILLER M. A., GLASS R. I. Global illness and deaths caused by rotavirus disease in children. *Emerging Infect. Dis.*, 2003, 9(5), pp. 565-72.
- PARASHAR U. D., GIBSON C. J., BRESEE J. S., GLASS R. I. Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infect. Dis.*, 2006, 12(2), pp. 304-06.
- PARRINO T. A., SCHREIBER D. S., TRIER J. S., KAPIKIAN A. Z., BLACKLOW N. R. Clinical immunity in acute gastroenteritis caused by Norwalk agent. *N. Engl. J. Med.*, 1977, 297(2), pp. 86-89.
- PARSHIONIKAR S., LASEKE I., FOUT G. S. Use of Propidium Monoazide in Reverse Transcriptase PCR To Distinguish between Infectious and Noninfectious Enteric Viruses in Water Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(13), pp. 4318-26.
- PATEL M. M., WIDDOWSON M.-A., GLASS R. I., AKAZAWA K., VINJÉ J., PARASHAR U. D. Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerging Infect. Dis.*, 2008, 14(8), pp. 1224-31.
- PATEL M. M., HALL A. J., VINJÉ J., PARASHAR U. D. Noroviruses: a comprehensive review. *J. Clin. Virol.*, 2009, 44(1), pp. 1-8.
- PAVER W. K., ASHLEY C. R., CAUL E. O., CLARKE S. K. A small virus in human faeces. *Lancet*, 1973, 1(7797), pp. 237-40.
- PECSON B. M., MARTIN L. V., KOHN T. Quantitative PCR for Determining the Infectivity of Bacteriophage MS2 upon Inactivation by Heat, UV-B Radiation, and Singlet Oxygen: Advantages and Limitations of an Enzymatic Treatment To Reduce False-Positive Results. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(17), pp. 5544-54.
- PELLEIEUX S. Les phages : un outil d'aide à l'évaluation du comportement des virus entériques pathogènes en réseau d'eau potable. Thèse de doctorat en pharmacie. Nancy : Université de Lorraine, 2012, 118p.

PINA S., PUIG M., LUCENA F., JOFRE J., GIRONES R. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1998, 64(9), p. 3376-82.

PINTÓ R. M., SAIZ J.-C. Chapter 3 Enteric Hepatitis Viruses. Albert Bosch Ed. *Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, 2007. pp. 39-67.

PODEWILS L. J., ZANARDI BLEVINS L., HAGENBUCH M., ITANI D., BURNS A., OTTO C., BLANTON L., ADAMS S., MONROE S. S., BEACH M. J., WIDDOWSON M. Outbreak of norovirus illness associated with a swimming pool. *Epidemiol. Infect.*, 2007, 135(5), pp. 827-33.

PRATO R., LOPALCO P.L., CHIRONNA M., BARBUTI G., GERMINARIO C., QUARTO M. Norovirus gastroenteritis general outbreak associated with raw shellfish consumption in south Italy. *BMC Infectious Diseases*, 2004, 4, pp. 1-6.

PRINJA S., KUMAR S., REDDY G. M. M., RATHO R. K., KUMAR R. Investigation of viral hepatitis E outbreak in a town in Haryana. *J Commun Dis.*, 2008, 40(4), pp. 249-54.

PURCELL R. H., EMERSON S. U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.*, 2008, 48(3), pp. 494-503.

RÄSÄNEN S., LAPPALAINEN S., KAIKKONEN S., HÄMÄLÄINEN M., SALMINEN M., VESIKARI T. Mixed viral infections causing acute gastroenteritis in children in a waterborne outbreak. *Epidemiol. Infect.*, 2010, 138(9), pp. 1227-34.

REDDY VS, NATCHIAR SK, STEWART PL, NEMEROW GR. Crystal structure of human adenovirus at 3.5 Å resolution. *Science*, 2010, 329, pp. 1071-75.

REDMAN JA, GRANT SB, OLSON TM, HARDY ME, ESTES MK. Filtration of recombinant norwalk virus particles and bacteriophage MS2 in quartz sand: importance of electrostatic interactions. *Environmental Science & Technology*, 1997, 31, pp. 3378-83.

REUTER G., BOROS Á., PANKOVICS P. Kobuviruses: a comprehensive review. *Reviews in Medical Virology*, 2011, 21(1), pp. 32-41.

REYES G. R., PURDY M. A., KIM J. P., LUK K. C., YOUNG L. M., FRY K. E., BRADLEY D. W. Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1990, 247(4948), pp. 1335-39.

REYNOLDS K.A., GERBA C. P., PEPPER I. L. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(4), pp. 1424-27.

REYNOLDS K.A., GERBA C.P., ABBASZADEGAN M., PEPPER, L.L. ICC/PCR detection of Enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol.*, 2001, 47(2), pp. 153-57.

RICHARDS G. P. Limitations of molecular biological techniques for assessing the virological safety of foods. *J. Food Prot.*, 1999, 62(6), pp. 691-97.

RIDINGER D. N., SPENDLOVE R. S., BARNETT B. B., GEORGE D. B., ROTH J. C. Evaluation of cell lines and immunofluorescence and plaque assay procedures for quantifying reoviruses in sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 43(4), pp. 740-46.

RIERA-MONTES M., BRUS SJÖLANDER K., ALLESTAM G., HALLIN E., HEDLUND K.-O., LÖFDAHL M. Waterborne norovirus outbreak in a municipal drinking-water supply in Sweden. *Epidemiol. Infect.*, 2011, 139(12), pp. 1928-35.

RIGOTTO C., SINCERO T. C. M., SIMÕES C. M. O., BARARDI C. R. M. Detection of adenoviruses in shellfish by means of conventional-PCR, nested-PCR, and integrated cell culture PCR (ICC/PCR). *Water Res.*, 2005, 39(2-3), pp. 297-304.

RODIER J., LEGUBE B., MERLET N., Coll. *L'analyse de l'eau*, 9^{ème} édition. Ed. Dunod Paris, 2009, 978p.

RODRÍGUEZ R. A., PEPPER I. L., GERBA C. P. Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2009, 75(2), pp. 297-307.

RODRÍGUEZ R. A., POLSTON P. M., WU M. J., WU J., SOBSEY M. D. An improved infectivity assay combining cell culture with real-time PCR for rapid quantification of human adenoviruses 41 and semi-quantification of human adenovirus in sewage. *Water Res.*, 2013, 47(9), pp. 3183-91.

RUDI K., MOEN B., DROMTORP S. M., HOLCK A. L. Use of ethidium monoazide and PCR in combination for quantification of viable and dead cells in complex samples. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, 71(2), pp. 1018-24.

RUVOËN N, LE PENDU J. Genetic susceptibility to norovirus infection. *Pathol. Biol.*, 2013, 6(1), pp. 28-35.

RUSSELL WC. Update on adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.*, 2000, 81(11), pp. 2573-604.

SABIN A. B. Reoviruses. A new group of respiratory and enteric viruses formerly classified as ECHO type 10 is described. *Science*, 1959, 130(3386), pp. 1387-89.

SAFARY A. Perspectives of vaccination against hepatitis E. *Intervirology*, 2001, 44(2-3), pp. 162-66.

SALO RJ, MAYOR HD. Isoelectric focusing of parvoviruses. *Intervirology*, 1978, 10, pp. 87-93.

SÁNCHEZ G., PINTÓ R. M., VANACLOCHA H., BOSCH A. Molecular characterization of hepatitis a virus isolates from a transcontinental shellfish-borne outbreak. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, 40(11), pp. 4148-55.

SÁNCHEZ G., ELIZAQUÍVEL P., AZNAR R. Discrimination of infectious hepatitis A viruses by propidium monoazide real-time RT-PCR. *Food Environ. Virol.*, 2012, 4(1), pp. 21-25.

SANO D., PINTÓ R. M., OMURA T., BOSCH A. Detection of Oxidative Damages on Viral Capsid Protein for Evaluating Structural Integrity and Infectivity of Human Norovirus. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44(2), pp. 808-12.

SANTE-CANADA. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada : Documentation à l'appui - Les entérovirus. Bureau de la qualité de l'eau et de la santé, Direction générale de la santé environnementale et de la sécurité des consommateurs, Santé Canada, Ottawa (Ontario), 2004, 31 p.

SARGUNA P., RAO A., SUDHA RAMANA K. N. Outbreak of acute viral hepatitis due to hepatitis E virus in Hyderabad. *Indian J. Med. Microbiol.*, 2007, 25(4), pp. 378-82.

SARTORIUS B., ANDERSSON Y., VELICKO I., DE JONG B., LÖFDAHL M., HEDLUND K.-O., ALLESTAM G., WÅNGSELL C., BERGSTEDT O., HORAL P., ULLERYD P., SODERSTROM A. Outbreak of norovirus in Västra Götaland associated with recreational activities at two lakes during August 2004. *Scand. J. Infect. Dis.*, 2007, 39(4), pp. 323-31.

SCALLAN E., HOEKSTRA R. M., ANGULO F. J., TAUXE R. V., WIDDOWSON M.-A., ROY S. L., JONES J. L., GRIFFIN P. M. Foodborne Illness Acquired in the United States† Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 2011, 17(1), pp. 7-15.

SCARCELLA C., CARASI S., CADORIA F., MACCHI L., PAVAN A., SALAMANA M., ALBORALI G. L., LOSIO M. M., BONI P., LAVAZZA A., SEYLER T. An outbreak of viral gastroenteritis linked to municipal water supply, Lombardy, Italy, June 2009. *Euro Surveill.*, 2009, 14(29), pii: 19274.

SCHAECHTER M., MEDOFF G., EISENSTEIN B. I. *Microbiologie et pathologie infectieuse*. De Boeck Supérieur Ed, 1999, 994 p.

SCHWAB K. J., DE LEON R., SOBSEY M. D. Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1996, 62(6), pp. 2086-94.

SCHWARTZBROD L. Virus et milieux hydriques. *Virologie des milieux hydriques*. Paris : Tech. et Doc, 1991, 320p.

SCHWARTZBROD L. Virus humain et santé publique: Conséquences de l'utilisation des eaux usées et des boues en agriculture et conchyliculture. Centre collaborateur OMS pour les micro-organismes dans les eaux usées, Université de Nancy, France, 2000. Disponible sur : http://www.who.int/entity/water_sanitation_health/wastewater/virus.pdf (consulté le 9 août 2014)

SDIRI K, KHELIFI H, BELGHITH K, AOUNI M. Comparison of cell culture and RT-PCR for the detection of enterovirus in sewage and shellfish. *Pathol. Biol.*, 2006, 54(5), pp. 280-84.

SHANG L., XU M., YIN Z. Antiviral drug discovery for the treatment of enterovirus 71 infections. *Antiviral Research*, 2013, 97(2), pp. 183-94.

SHRESTHA M. P., SCOTT R. M., JOSHI D. M., MAMMEN M. P. Jr, THAPA G. B., THAPA N., MYINT K. S. A., FOURNEAU M., KUSCHNER R. A., SHRESTHA S. K., DAVID M. P., SERIWATANA J., VAUGHN D. W., SAFARY A., ENDY T. P., INNIS B. L. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2007, 356(9), pp. 895-903.

SILVA H. D., GARCÍA-ZAPATA M. T. A., ANUNCIAÇÃO C. E. Why the Use of Adenoviruses as Water Quality Virologic Marker? *Food Environ. Virol.*, 2011, 3(3-4), pp. 138-40.

SIMONET J., GANTZER C. Degradation of the Poliovirus 1 genome by chlorine dioxide. *J. Appl. Microbiol.*, 2006a, 100(4), pp. 862-70.

SIMONET J., GANTZER C. Inactivation of poliovirus 1 and F-specific RNA phages and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2006b, 72(12), pp. 7671-77.

SINGER C., STANCU P., COȘOVEANU S., OSIAC L., GRIGORIE C., BOTU A. Diarrhea with Rotavirus in Children. *Current Health Sciences Journal*, 2010, 36(4), pp. 240-44.

SINGH S. K. *Human Respiratory Viral Infections*. CRC Press Ed, 2014, 702 p.

SIQUEIRA A. A., SANTELLI A. C. F. S., ALENCAR L. R. Jr, DANTAS M. P., DIMECH C. P. N., CARMO G. M. I., SANTOS D. A., ALVES R. M. S., LUCENA M. B. F., MORAIS M., ASSIS R. M. S., FIALHO A., MASCARENHAS J. D. P., COSTA M., LINHARES A. C., LEITE J. P. G., ARAUJO W. N., HATCH D. L. Outbreak of acute gastroenteritis in young children with death due to rotavirus genotype G9 in Rio Branco, Brazilian Amazon region, 2005. *Int. J. Infect. Dis.*, 2010, 14(10), pp. 898-903.

SIVARAMAN D., YEH H.-Y., MULCHANDANI A., YATES M. V., CHEN W. Use of Flow Cytometry for Rapid, Quantitative Detection of Poliovirus-Infected Cells via TAT Peptide-Delivered Molecular Beacons. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2013, 79(2), pp. 696-700.

SLOOTS T. P., MCERLEAN P., SPEICHER D. J., ARDEN K. E., NISSEN M. D., MACKAY I. M. Evidence of human coronavirus HKU1 and human bocavirus in Australian children. *J. Clin. Virol.*, 2006, 35(1), pp. 99-102.

SMITH E. M., GERBA C. P. Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1982, 43(6), pp. 1440-50.

SMUTS H., HARDIE D. Human bocavirus in hospitalized children, South Africa. *Emerging Infect. Dis.*, 2006, 12(9), pp. 1457-58.

SOLOMON T., LEWTHWAITE P., PERERA D., CARDOSA M. J., MCMINN P., OOI M. H. Virology, epidemiology, pathogenesis, and control of enterovirus 71. *The Lancet Infectious Diseases*, 2010, 10(11), pp. 778-90.

SOMMER R., PRIBIL W., APPELT S., GEHRINGER P., ESCHWEILER H., LETH H., CABAJ A., HAIDER T. Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: a comparative approach. *Water Res.*, 2001, 35(13), pp. 3109-16.

SONG Y.J., PARK W.J., PARK B.J., LEE J.B., PARK SY, SONG C.S., LEE N.H., SEO K.H., KANG Y.S., CHOI I.S. Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2014, 3(1), pp. 29-36.

STALS A., BAERT L., JASSON V., VAN COILLIE E., UYTTENDAELE M. Screening of fruit products for norovirus and the difficulty of interpreting positive PCR results. *J. Food Prot.*, 2011, 74(3), pp. 425-31.

STALS A., BAERT L., VAN COILLIE E., UYTTENDAELE M. Extraction of food-borne viruses from food samples: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 2012, 153(1-2), pp. 1-9.

STALS A., VAN COILLIE E., UYTTENDAELE M. Viral genes everywhere: public health implications of PCR-based testing of foods. *Current Opinion in Virology*, 2013, 3(1), pp. 69-73.

STÖCKER A., DE CARVALHO DOMINGUEZ SOUZA B. F., RIBEIRO T. C. M., NETTO E. M., ARAUJO L. O., CORRÊA J. I., ALMEIDA P. S., PEIXOTO DE MATTOS A., RIBEIRO H. DA C., PEDRAL-SAMPAIO D. B., DROSTEN C., DREXLER J. F. Cosavirus Infection in Persons with and without Gastroenteritis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2012, 18(4), pp. 656-59.

STRAUB T. M., HÖNER ZU BENTRUP K., COGHLAN P. O., DOHNALKOVA A., MAYER B. K., BARTHOLOMEW R. A., VALDEZ C. O., BRUCKNER-LEA C. J., GERBA C. P., ABBASZADEGAN M. A., NICKERSON C. A. In Vitro Cell Culture Infectivity Assay for Human Noroviruses. *Emerging Infectious Diseases*, 2007, 13(3), pp. 396-403.

SUFFREDINI E., MAGNABOSCO C., CIVETTINI M., ROSSETTI E., ARCANGELI G., CROCI L. Norovirus contamination in different shellfish species harvested in the same production areas. *J. Appl. Microbiol.*, 2012, 113(3), pp. 686-92.

SUMMA M., VON BONSDORFF C.-H., MAUNULA L. Evaluation of four virus recovery methods for detecting noroviruses on fresh lettuce, sliced ham, and frozen raspberries. *J. Virol. Methods*, 2012, 183(2), pp. 154-60.

SUTTLE C. A., CHEN F. Mechanisms and rates of decay of marine viruses in seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1992, 58(11), pp. 3721-29.

TALLON L. A., LOVE D. C., MOORE Z. S., SOBSEY M. D. Recovery and sequence analysis of hepatitis a virus from springwater implicated in an outbreak of acute viral hepatitis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, 74(19), pp. 6158-60.

TAPPAREL C., SIEGRIST F., PETTY T. J., KAISER L. Picornavirus and enterovirus diversity with associated human diseases. *Infection, Genetics and Evolution*, 2013, 14, pp. 282-93.

TELLIER R., BUKH J., EMERSON S. U., MILLER R. H., PURCELL R. H. Long PCR and its application to hepatitis viruses: amplification of hepatitis A, hepatitis B, and hepatitis C virus genomes. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, 34(12), pp. 3085-91.

TEUNIS P. F. M., MOE C. L., LIU P., E. MILLER S., LINDESMITH L., BARIC R. S., LE PENDU J., CALDERON R. L. Norwalk virus: How infectious is it? *Journal of Medical Virology*, 2008, 80(8), pp. 1468-76.

THERRE H, DE VALK H, VAILLANT V, BEAUDEAU P, MOULY D. Bilan des épidémies d'origine hydrique investiguées en France depuis 1998 et principales recommandations Ré Synthèse du rapport. Saint-Maurice (Fra): Institut de veille sanitaire, 2009, 5 p. Disponible sur: www.invs.sante.fr (consulté le 6 février 2014)

THURSTON-ENRIQUEZ, J.A., HAAS, C.N., JACANGELO, J. AND GERBA, C.P. Chlorine inactivation of adenovirus type 40 and feline calicivirus. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69(7), pp. 3979-85.

TYLER K. L., BARTON E. S., IBACH M. L., ROBINSON C., CAMPBELL J. A., O'DONNELL S. M., VALYI-NAGY T., CLARKE P., WETZEL J. D., DERMODY T. S. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis. *J. Infect. Dis.*, 2004, 189(9), pp. 1664-75.

UEKI Y, SANO D, WATANABE T, AKIYAMA K, OMURA T. Norovirus pathway in water environment estimated by genetic analysis of strains from patients of gastroenteritis, sewage, treated wastewater, river water and oysters. *Water Res.*, 2005, 39(18), pp. 4271-80.

UHNOO I, WADELL G., SVENSSON L., JOHANSSON M. E. Importance of enteric adenoviruses 40 and 41 in acute gastroenteritis in infants and young children. *J. Clin. Microbiol.*, 1984, 20(3), pp. 365-72.

US EPA (US Environmental Protection Agency). Drinking Water Standards Contaminant Candidate List 3 RCCL. Disponible sur : <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm> (consulté le 15/05/2014)

US EPA (US Environmental Protection Agency). Part II, Environmental Protection Agency 40 CFR parts 141 and 142. National Primary Drinking Water Regulations : Ground Water Rule ; Proposed Rule. *Federal Register*, 2000, 65(91), pp. 30193-274.

VAN KERKHOVE MD. Brief literature review for the WHO global influenza research agenda--highly pathogenic avian influenza H5N1 risk in humans. *Influenza Other Respir. Viruses*, 2013, 7(2), pp. 26-33.

VILAGINÈS P., SARRETTE B., DANGLLOT C., VILAGINES R. Detection of enteroviruses by a concentration on glass powder in a liquid bed from samples of 500 liters of surface water. *Bull. Acad. Natl. Med.*, 1979, 163(7), pp. 668-73.

VILAGINÈS, P., SARRETTE, B., DANGLLOT, C. & VILAGINÈS, R. A new large scale technic for quantitative recovery of Enteroviruses by adsorption on suspended glass powder. In *Application to surface and drinking waters of the Paris area*. Vol. 14. Tech,W.S. (ed). 1982. PARIS, pp. 281-90.

VILAGINÈS P., SARRETTE B., VILAGINES R. Continuous detection of poliovirus in public water supplies. *C. R. Acad. Sci. III, Sci. Vie.*, 1988, 307(4), pp. 171-76.

VILAGINÈS, P., SARRETTE, B., HUSSON, G. & VILAGINES, R. Concentration à pH neutre des virus hydriques dans des eaux de surface : étude quantitative et qualitative. *J. Fr. Hydrolo.*, 1989, 20, pp. 193-202.

VILAGINÈS, P., SARRETTE, B., HUSSON, G. & VILAGINÈS, R. Glass wool for virus concentration at ambient water pH level. *Wat. Sci. Tech.*, 1993, (3-4), pp. 299-306.

VILAGINÈS, P.H., SUAREZ, A., SARRETTE, B. & VILAGINÈS, R. Optimisation of the PEG reconcentration Procedure for virus detection by cell culture or genomic amplification. *Wat. Sci. Tech.*, 1997, 35, pp. 455-59.

VILLENA C., GABRIELI R., PINTÓ R. M., GUIX S., DONIA D., BUONOMO E., PALOMBI L., CENKO F., BINO S., BOSCH A., DIVIZIA M. A large infantile gastroenteritis outbreak in Albania caused by multiple emerging rotavirus genotypes. *Epidemiol. Infect.*, 2003, 131(3), pp. 1105-10.

WAARBEEK H. L. G., DUKERS-MUIJRS N. H. T. M., VENNEMA H., HOEBE C. J. P. A. Waterborne gastroenteritis outbreak at a scouting camp caused by two norovirus genogroups: GI and GII. *J. Clin. Virol.*, 2010, 47(3), pp. 268-72.

WALLIS C., MELNICK J. L. Concentration of viruses on aluminum and calcium salts. *Am. J. Epidemiol.*, 1967, 85(3), pp. 459-68.

WANG L, SMITH DL. Capsid structure and dynamics of a human rhinovirus probed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Protein Sci.*, 2005, 14, pp. 1661-72.

WEBBY R.J., CARVILLE K.S., KIRK M.D., GREENING G., RATCLIFF R.M., CRERAR S.K., DEMPSEY K., SARNA M., STAFFORD R., PATEL M., HALL G. Internationally distributed frozen oyster meat causing multiple outbreaks of norovirus infection in Australia. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, 44, pp. 1026-31.

WEISBERG S. S. Rotavirus. *Disease-a-Month*, 2007, 53(10), pp. 510-14.

WERBER D., LAUSEVIĆ D., MUGOSA B., VRATNICA Z., IVANOVIĆ-NIKOLIĆ L., ZIZIĆ L., ALEXANDRE-BIRD A., FIORE L., RUGGERI F. M., DI BARTOLO I., BATTISTONE A., GASSILLOU B., PERELLE S., NITZAN KALUSKI D., KIVI M., ANDRAGHETTI R., POLLOCK K. G. J. Massive outbreak of viral gastroenteritis associated with consumption of municipal drinking water in a European capital city. *Epidemiol. Infect.*, 2009, 137(12), pp. 1713-20.

WHEELER C., VOGT T. M., ARMSTRONG G. L., VAUGHAN G., WELTMAN A., NAINAN O. V., DATO V., XIA G., WALLER K., AMON J., LEE T. M., HIGHBAUGH-BATTLE A., HEMBREE C., EVENSON S., RUTA M. A., WILLIAMS I. T., FIORE A. E., BELL B. P. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *N. Engl. J. Med.*, 2005, 353(9), pp. 890-97.

WIDDOWSON M.-A., SULKA A., BULENS S. N., BEARD R. S., CHAVES S. S., HAMMOND R., SALEHI E. D. P., SWANSON E., TOTARO J., WORON R., MEAD P. S.,

BRESEE J. S., MONROE S. S., GLASS R. I. Norovirus and foodborne disease, United States, 1991-2000. *Emerging Infect. Dis.*, 2005, 11(1), pp. 95-102.

WIGAND R., SABIN A. B. Properties of ECHO types 22, 23 and 24 viruses. *Arch Gesamte Virusforsch*, 1961, 11, pp. 224-47.

WIGGINTON K. R., KOHN T. Virus disinfection mechanisms: the role of virus composition, structure, and function. *Curr. Opin. Virol.*, 2012, 2(1), pp. 84-89.

WIGGINTON K., MENIN L., MONTOYA J. P., KOHN T. Oxidation of virus proteins during UV(254) and singlet oxygen mediated inactivation. *Environ. Sci. Technol.*, 2010, 44(14), pp. 5437-43.

WIGGINTON KR, MENIN L, SIGSTAM T, GANNON G, CASCELLA M, HAMIDANE HB, TSYBIN YO, WARIDEL P, KOHN T. UV radiation induces genome-mediated, site-specific cleavage in viral proteins. *Chembiochem.*, 2012a, 13(6), pp. 837-45.

WIGGINTON K. R., PECSON B. M., SIGSTAM T., BOSSHARD F., KOHN T. Virus inactivation mechanisms: impact of disinfectants on virus function and structural integrity. *Environ. Sci. Technol.*, 2012b, 46(21), pp. 12069-78.

WOLF S., RIVERA-ABAN M., GREENING G. E. Long-Range Reverse Transcription as a Useful Tool to Assess the Genomic Integrity of Norovirus. *Food Environ. Virol.*, 2009, 1(3-4), pp. 129-36.

WONG D. C., PURCELL R. H., SREENIVASAN M. A., PRASAD S. R., PAVRI K. M. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. *Lancet*, 1980, 2(8200), p. 876-79.

WOOD, D.J. & HULL, B. L20B cells simplify culture of Polioviruses from clinical samples. *J. Med. Virol.*, 1999, 58(2), pp. 188-92

WOODS J. W., BURKHARDT W. Occurrence of Norovirus and Hepatitis A Virus in U.S. Oysters. *Food Environ. Virol.*, 2010, 2(3), pp. 176-82.

WOROBAY M. Phylogenetic evidence against evolutionary stasis and natural abiotic reservoirs of influenza A virus. *J. Virol.*, 2008, 82(7), pp. 3769-74.

WYN-JONES AP, CARDUCCI A, COOK N, D'AGOSTINO M, DIVIZIA M, FLEISCHER J, GANTZER C, GAWLER A, GIRONES R, HÖLLER C, DE RODA HUSMAN AM, KAY D, KOZYRA I, LÓPEZ-PILA J, MUSCILLO M, NASCIMENTO MS, PAPAGEORGIOU G,

RUTJES S, SELLWOOD J, SZEWZYK R, WYER M. Surveillance of adenoviruses and noroviruses in European recreational waters. *Water Res.*, 2011, 45(3), pp. 1025-38.

YAMASHITA T., KOBAYASHI S., SAKAE K., NAKATA S., CHIBA S., ISHIHARA Y., ISOMURA S. Isolation of cytopathic small round viruses with BS-C-1 cells from patients with gastroenteritis. *J. Infect. Dis.*, 1991, 164(5), pp. 954-57.

YAMASHITA T., SAKAE K., ISHIHARA Y., ISOMURA S., UTAGAWA E. Prevalence of newly isolated, cytopathic small round virus (Aichi strain) in Japan. *J. Clin. Microbiol.*, 1993, 31(11), pp. 2938-43.

YAMASHITA T., SAKAE K., TSUZUKI H., SUZUKI Y., ISHIKAWA N., TAKEDA N., MIYAMURA T., YAMAZAKI S. Complete nucleotide sequence and genetic organization of Aichi virus, a distinct member of the Picornaviridae associated with acute gastroenteritis in humans. *J. Virol.*, 1998, 72(10), pp. 8408-12.

YAMASHITA T, MORI Y, MIYAZAKI N, CHEN RH, YOSHIMURA M, UNNO H, SHIMA R, MORIISHI K, TSUKIHARA T, LI TC. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, 106, pp. 12986-91.

YANG W., GU A. Z., ZENG S., LI D., HE M., SHI H. Development of a combined immunomagnetic separation and quantitative reverse transcription-PCR assay for sensitive detection of infectious rotavirus in water samples. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(3), pp. 447-53.

YAZAKI Y., MIZUO H., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., SASAKI N., GOTANDA Y., OKAMOTO H. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J. Gen. Virol.*, 2003, 84(9), pp. 2351-57.

YEATS J., SMUTS H., SERFONTEIN C. J., KANNEMEYER J. Investigation into a school enterovirus outbreak using PCR detection and serotype identification based on the 5' non-coding region. *Epidemiol. Infect.*, 2005, 133(6), pp. 1123-30.

YEH H.-Y., HWANG Y.-C., YATES M. V., MULCHANDANI A., CHEN W. Detection of Hepatitis A Virus by Using a Combined Cell Culture-Molecular Beacon Assay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008a, 74(7), pp. 2239-43.

YEH H.-Y., YATES M. V., MULCHANDANI A., CHEN W. Visualizing the dynamics of viral replication in living cells via Tat peptide delivery of nuclease-resistant molecular beacons. *PNAS*, 2008b, 105(45), pp. 17522-25.

YODER J. S., BLACKBURN B. G., CRAUN G. F., HILL V., LEVY D. A., CHEN N., LEE S. H., CALDERON R. L., BEACH M. J. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with recreational water--United States, 2001-2002. *MMWR Surveill. Summ.*, 2004, 53(8), pp. 1-22.

ZERDA KS. Adsorption of viruses to charge-modified silica. PhD dissertation, 1982, Baylor College of Medicine, Texas.

ZHANG G., SHOHAM D., GILICHINSKY D., DAVYDOV S., CASTELLO J. D., ROGERS S. O. Evidence of influenza A virus RNA in siberian lake ice. *J. Virol.*, 2006, 80(24), pp. 12229-35.

ZHENG D.-P., ANDO T., FANKHAUSER R. L., BEARD R. S., GLASS R. I., MONROE S. S. Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology*, 2006, 346(2), pp. 312-23.

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 10 octobre 2014

<p align="center">DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : Camille BACH</p> <p><u>Sujet</u> : Détection des virus entériques infectieux dans le milieu hydrique : méthodes actuelles et perspectives</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : Pr. Christophe GANTZER, PU, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine</p> <p>Directeur : Dr Isabelle BERTRAND, MC, Faculté de Pharmacie, Université de Lorraine</p> <p>Juges :</p> <p>Dr Audrey ESCLATINE, MC-HDR, Faculté de Pharmacie, Université Paris-Sud</p> <p>Dr Benoît GASSILLOUD, Chargé de recherche, ANSES, Nancy</p> <p>Dr Catherine LAURAIN, PHA, Service de Bactériologie, CHU Nancy</p>	<p align="center">Vu, Nancy, le 08/09/2014</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around;"> <div style="text-align: center;">  Le Président du Jury </div> <div style="text-align: center;">  Directeur de Thèse </div> </div> <p align="center">M. le Professeur GANTZER Melle BERTRAND</p>
<p align="center">Vu et approuvé, Nancy, le 12.09.2014</p> <p align="center">Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <div style="text-align: center;">  Francine PAULUS </div> <div style="text-align: center;">  </div>	<p align="center">Vu, Nancy, le 22 SEP. 2014</p> <p align="center">Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <div style="text-align: center;">  Pierre MUTZENHARDT </div> <div style="text-align: center;">  </div> <p align="center">N° d'enregistrement : 6662</p>

N° d'identification :

TITRE

**Détection des virus entériques infectieux dans le milieu hydrique :
méthodes actuelles et perspectives**

Thèse soutenue le 10 octobre 2014

Par BACH Camille

RESUME :

Les virus entériques abondent dans le milieu hydrique et sont responsables de gastro-entérites aiguës, d'hépatites, mais aussi d'autres pathologies comme la poliomyélite. La contamination de l'homme par des virus entériques pathogènes peut notamment être due à la consommation d'eau ou d'aliments contaminés. A l'heure actuelle, la détermination de la qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation est uniquement basée sur des indicateurs bactériens qui ne permettent pas une évaluation satisfaisante du danger viral.

Si la culture cellulaire permet de connaître le statut infectieux des virus détectés, elle n'est pas applicable à tous les virus entériques. Ainsi, les norovirus qui sont des virus entériques fortement impliqués dans les cas de gastro-entérites ne sont pas cultivables. Les techniques de biologie moléculaire comme la RT-PCR permettent quant à elles une détection rapide et spécifique du génome viral. Cependant plusieurs études ont montré que le génome viral ne peut être utilisé comme marqueur de la présence de virus infectieux dans l'environnement. Devant ce constat, il apparaît nécessaire de développer de nouvelles méthodes de détection. Si les méthodes couplant la culture cellulaire à une détection par biologie moléculaire fournissent des résultats rapides et permettent de conclure sur l'infectiosité du virus, elles ne résolvent pas le problème lié à la nécessité de disposer d'une lignée cellulaire permissive du virus recherché. D'autres études se sont intéressées à l'intégrité de la capside virale ou du génome de façon indépendante. Cependant, le fait de ne pas prendre en compte la totalité de la particule virale ne permet pas, avec les méthodes actuelles, d'évaluer son infectiosité. Pour le développement de nouvelles méthodes de détection des particules virales infectieuses, des pistes pourraient être explorées concernant les modifications des interactions entre la capside et le génome lors de l'inactivation virale.

MOTS CLES :

Virus entériques, infectiosité, eau

Directeur de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Dr Isabelle Bertrand	LCPME UMR 7564/CNRS Université de Lorraine (Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement)	Expérimentale <input type="checkbox"/> Bibliographique <input checked="" type="checkbox"/> Thème 2

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
5 – Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle