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-theses-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 METZ
1989

EXTRACTION DES VIRUS ENTERIQUES DES BOUES RESIDUAIRES ET DES SEDIMENTS

THESE

présentée et soutenue publiquement
le 14 Décembre 1989
pour obtenir le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Mention "Chimie et Microbiologie de l'Eau"
par

MONIQUE DAVID-ALBERT

MEMBRES DU JURY

Président	:	M. le Professeur L. SCHWARTZBROD	(Nancy I)
Rapporteurs	:	M. le Professeur J.C. BLOCK	(Metz)
		M. le Professeur P. HARTEMANN	(Nancy I)
Examinateurs	:	M. le Professeur R. PARES	(Barcelone)
		INCE, Maître de Recherche	
		es Armées	(Grenoble)

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE DE METZ
022 420319 3

UNIVERSITE DE METZ
1989

EXTRACTION DES VIRUS ENTERIQUES DES BOUES RESIDUAIRES ET DES SEDIMENTS

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ
N° inv. 19890165
Cote S/M3 89/8
Loc Magasin

THESE

présentée et soutenue publiquement
le 14 Décembre 1989
pour obtenir le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ
Mention "Chimie et Microbiologie de l'Eau"
par

MONIQUE DAVID-ALBERT

UNIVERSITE DE METZ BIBLIOTHEQUE

MEMBRES DU JURY

Président	: M. le Professeur L. SCHWARTZBROD	(Nancy I)
Rapporteurs	: M. le Professeur J.C. BLOCK	(Metz)
	M. le Professeur P. HARTEMANN	(Nancy I)
Examinateurs	: M. le Professeur R. PARES	(Barcelone)
	M. le Docteur R. DELOINCE, Maître de Recherche du Service de Santé des Armées	(Grenoble)

A NOTRE PRÉSIDENT DE THÈSE

Monsieur le Professeur L. SCHWARTZBROD
Professeur de Microbiologie
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques (Nancy I)

Vous nous avez toujours apporté votre soutien et votre compréhension tout au long de ces années.

Vous avez manifesté beaucoup de bienveillance et d'intérêt pour la concrétisation de ce travail.

Veuillez trouver ici, un témoignage de notre reconnaissance et nos sincères remerciements.

A NOS JUGES

Monsieur le Professeur R. PARES
Professeur titulaire de la chaire de Microbiologie
Facultad de Biologia. Université de Barcelone

Veuillez trouver ici l'expression de notre profond respect ainsi que notre gratitude pour l'honneur que vous nous faites d'avoir accepté de juger cette thèse.

Monsieur le Docteur R. DELOINCE
Maître de Recherche
Centre de Recherche du Service de Santé des Armées. Grenoble

Nous vous sommes très reconnaissants de nous avoir si chaleureusement accueillie à Grenoble et de la formation que vous nous avez donnée.
Nous vous exprimons ici, toute notre sincère gratitude pour votre gentillesse et pour avoir accepté de venir à Nancy participer à ce jury.

A NOS RAPPORTEURS DE THÈSE

Monsieur le Professeur P. HARTEMANN
Professeur de Santé Publique
Faculté de Médecine (Nancy I)

Vous avez accepté de juger notre travail de thèse et d'y apporter votre précieuse collaboration.
Nous vous en sommes très reconnaissants et nous vous prions d'accepter ici, nos respectueux remerciements.

Monsieur le Professeur J.C. BLOCK
Professeur d'Hydrologie
Centre des Sciences et de l'Environnement. Metz

Vous avez accepté de nous consacrer un peu de votre temps pour juger notre travail et pour nous prodiguer de judicieux conseils.
Nous vous remercions pour le plaisir que vous nous faites d'être présent aujourd'hui dans ce jury.

A tous ceux qui nous ont aidée pour la réalisation de ce travail

. Monsieur le Docteur BIZIAGOS pour nous avoir initié à la radioimmunologie et pour son enthousiasme communicatif.

. Chantal STIEN pour sa compétence et sa gentillesse aux différentes étapes de ce travail.

. Monsieur GAUCHE pour sa disponibilité constante et son aide efficace.

. Madame FORCHER pour le temps qu'elle nous a consacré et pour avoir assuré avec patience la frappe de cette thèse.

. Tous nos collègues et amis du laboratoire auprès de qui nous avons toujours trouvé une agréable ambiance de travail.

A tous nos amis de la Faculté de Pharmacie.

Avec toute mon affection pour Alexis et Léopold sans qui la vie n'aurait pas de sel...

A mes parents en témoignage de ma reconnaissance pour leur aide affectueuse

Aux mamies pour leur fidèle affection

A Claude, Martine et Michèle pour leur soutien constant et affectueux

A toute ma famille

A mes vrais amis

S O M M A I R E

Page

INTRODUCTION

CHAPITRE I - ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE 1

I - Virus et milieu hydrique..... 2
II - Recherche des virus dans les boues et les sédiments..... 19
II.1 - Etape d'extraction-élution..... 22
II.2 - Concentration des virus..... 33
II.3 - Mise en évidence et identification des virus..... 36

CHAPITRE II - BUT DU TRAVAIL..... 41

CHAPITRE III - MATERIEL ET METHODES..... 43

I - Matériel..... 44
I.1 - Les boues..... 44
I.2 - Les sédiments..... 48
I.3 - Les virus..... 51
I.4 - Les solutions éluantes..... 53
I.5 - Les cultures cellulaires..... 55
II - Méthodes..... 58
II.1 - Méthodes d'extraction et de concentration des virus..... 58
II.2 - Décontamination des éluats et concentrats..... 63
II.3 - Isolement et quantification des virus..... 64
II.4 - Mise en évidence du virus de l'hépatite A. 67

CHAPITRE IV - ETUDE DE L'EXTRACTION DES VIRUS A PARTIR DES BOUES ARTIFICIELLEMENT CONTAMINEES..... 73

I - Protocole de contamination des boues..... 74
II - Méthodes d'extraction des virus..... 75
III - Résultats..... 76
IV - Conclusion..... 83

Page

CHAPITRE V - ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES VIRUS A PARTIR DES BOUES DE STATION D'EPURATION ET A PARTIR DE SEDIMENTS..... 85

I - Etude des boues..... 86

I.1 - Méthodes expérimentées..... 88

I.2 - Analyse des boues digérées..... 90

I.2.1 - Etude des techniques d'extraction avec une solution éluante d'extrait de boeuf à 10 % pH=9.. 90

I.2.2 - Etude comparative des techniques d'extraction des virus avec trois solutions éluantes..... 94

1.3 - Analyse des boues fraîches primaires..... 96

1.3.1 - Etude des paramètres de l'élution avec chaque éluant..... 96

1.3.2 - Etude comparative de l'efficacité de trois éluants..... 111

1.3.3 - Conclusion..... 115

II - Etude des sédiments..... 116

II.1 - Protocole expérimental..... 117

II.2 - Résultats..... 120

II.3 - Conclusion..... 124

CHAPITRE VI - EVALUATION DU PROTOCOLE D'EXTRACTION-CONCENTRATION SELECTIONNE..... 126

I - Etude comparative du protocole sélectionné et de la méthode préconisée par l'E.P.A..... 127

II - Etude comparative du protocole sélectionné et de la méthode extrait de boeuf 3 % PH=9-P.E.G. 131

III - Conclusion..... 136

CHAPITRE VII - RECHERCHE DU VIRUS DE L'HEPATITE A DANS LES BOUES FRAICHES PRIMAIRES..... 137

I - Protocole expérimental..... 138

II - Résultats..... 140

III - Conclusion..... 145

Page

CHAPITRE VIII - CONCLUSION - DISCUSSION..... 147

ANNEXES..... 152

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... 159

LISTE DES ABREVIATIONS OU ANGLICISMES

ECP : Effet Cytopathique

UFP : Unité Formant Plage

FF : Foci Fluorescents

NPPUC : Nombre le Plus Probable d'Unités Cytopathiques

PBS : Phosphate Buffered Saline (tampon phosphate)

SVF : Sérum de Veau Foetal

PEG : Poly-Ethylène-Glycol

ND : Non Détecté

NE : Non Effectué

cpm : Coups Par Minute

VHA : Virus de l'Hépatite A

RIA : Radio-Immunology Assay

qsp : Quantité Suffisante Pour

US : Ultra-sons

EPA : Environmental Protection Agency

Eluant : solution utilisée pour désadsorber une particule fixée sur un suppor

Eluat : solution obtenue après élution.

Concentrat : solution après concentration.

Sonication : action des ultra-sons.

I N T R O D U C T I O N

Le milieu hydrique est le réceptacle obligé de multiples déchets d'origine humaine et animale. La contamination ainsi provoquée est de nature physique, chimique et microbiologique.

Sur le plan microbiologique ce phénomène est important car des microorganismes pathogènes sont ainsi libérés dans les eaux qui peuvent constituer une source potentielle de contamination pour l'homme.

En effet ces agents sont présents dans les eaux usées et superficielles, au niveau des sédiments fluviaux et marins ainsi que dans les boues résiduaires et risquent de constituer de véritables réservoirs de virus.

Il est donc indispensable de contrôler ce type de pollution et d'évaluer son impact sur la santé publique.

C H A P I T R E I

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE

I - VIRUS ET MILIEU HYDRIQUE

Les résidus de l'activité humaine qu'elle soit domestique ou industrielle se retrouvent la plupart du temps dans le milieu hydrique apportant ainsi une charge polluante considérable susceptible de perturber les conditions naturelles d'autoépuration au point d'aboutir dans des cas extrêmes à la disparition de toute vie aquatique.

La contamination d'origine domestique est en partie constituée par les fèces et les urines humaines et animales susceptibles de contenir des bactéries, des virus, des protozoaires et des oeufs d'helminthes pathogènes pour l'homme.

Les quantités de selles excrétées par une population varient considérablement en fonction de la nature de l'alimentation, du climat et de l'état de santé.

Si des valeurs extrêmes d'excrétion fécales de 50 à 1060 g par jour et par individu ont été rapportées par TANDON et TANDON (1975) il apparaît que les européens produisent entre 100 et 200 g de fèces et entre 1000 et 1300 g d'urine par jour.

Si parmi les différents microorganismes, l'étude est limitée aux virus, l'analyse de la littérature montre que plus de cent types différents de virus peuvent être excrétés et être retrouvés dans les eaux usées. (Tableau n° 1).

Groupe de virus	Nombre de types	Maladie provoquée
Entérovirus:		
Poliovirus	3	Paralysie, méningite, fièvre
Echovirus	31	Méningite, atteinte des voies respiratoires, éruption cutanée, diarrhée, fièvre
Virus Coxsackie A	23	Herpangine, atteinte des voies respiratoires, méningite, fièvre
Virus Coxsackie B	6	Myocardite, anomalies cardiaques congénitales, éruption cutanée, fièvre, méningite, atteinte des voies respiratoires, pleurodynie
Nouveaux entérovirus:		
Types 68–71	>4	Méningite, encéphalite, atteinte des voies respiratoires, conjonctivite hémorragique aiguë, fièvre
Entérovirus type 72 (virus de l'hépatite A)	1	Hépatite virale A
Virus de la gastro-entérite (Norwalk)	2	Vomissements et diarrhée épidémiques, fièvre
Rotavirus	4	Vomissements et diarrhée épidémiques, principalement chez les enfants
Réovirus	3	Non établie avec précision
Adénovirus	37	Atteinte des voies respiratoires, infections oculaires, gastro-entérite
Parvovirus (dépendovirus)	3	Fièvre, éruption cutanée, aplasie médullaire

Tableau n° 1 – Entérovirus humains présents dans les eaux usées (RAO et al. 1986)

Les selles d'une personne infectée, qu'elle présente ou non des signes cliniques peuvent contenir pour certains virus entériques jusqu'à 10^{10} particules virales par gramme de selles. CLARKE (1961) a calculé que dans une population normale contituée de 70 % d'adultes et de 30 % d'enfants, le niveau moyen d'excrétion virale par gramme de selles est d'environ 300 particules ce qui correspond à une élimination moyenne journalière de 60 000 particules virales par habitant.

La période et la durée d'excrétion fécale sont variables selon les virus ainsi le virus de l'hépatite A est retrouvé dans les selles deux semaines avant le début de l'ictère, son taux est maximal quelques jours avant l'ictère et décroit ensuite très rapidement. Pour le poliovirus, au contraire, l'excrétion commence 24 heures après l'infection et dure en moyenne 50 jours mais des virus ont été observés plus de cent jours après le début de l'infection.

D'autres entérovirus tels que les coxsackies B sont excrétés au maximum pendant une semaine.

Quant aux rotavirus leur élimination est maximale et très abondante ($10^{11}.g^{-1}$) 3 à 4 jours après le début de la maladie et diminue jusqu'au 8ème jour mais peut continuer pendant 20 jours.

Les virus se retrouvent dans les eaux usées dont le volume dépend de la quantité d'eau utilisée par les habitants (entre 30 et 300 litres par jour et par habitant d'après WHITE 1977).

Les eaux usées constituent ainsi le premier maillon d'un cycle de l'eau au centre duquel se trouve l'homme en tant que contaminateur primaire mais aussi en tant que récepteur secondaire des agents pathogènes véhiculés par l'eau. (Figure n° 1).

La concentration virale des eaux usées est sujette à des variations en fonction de nombreux facteurs géographiques, socio-économiques, saisonniers mais surtout sanitaires. Ainsi plus le niveau d'hygiène est faible et plus la proportion d'enfants est importante dans une communauté, plus la quantité de virus retrouvée dans les eaux usées est importante. En pratique, les eaux usées de toutes les communautés urbaines contiennent des entérovirus à des concentrations variables pouvant atteindre 10^5 par litre dans les pays en voie de développement (MELNICK 1984). Par ailleurs les sérotypes de virus isolés sont dans certains cas, très nombreux. Dans les pays développés les quantités retrouvées sont plus faibles comme il est indiqué dans le Tableau n° 2.

Dans de nombreuses partie du monde, ces eaux sont rejetées dans le milieu naturel sans traitement. Cependant dans les pays développés tels que la France, elles subissent la plupart du temps un traitement préalable par des techniques physico-chimiques ou biologiques. A l'issue d'un traitement biologique bien conçu, certains auteurs (BLOCK et SCHWARTZBROD 1989) ont constaté une réduction de 90 % de la concentration initiale de virus cependant il est possible de considérer qu'en moyenne l'abattement viral obtenu avec de telles méthodes se situe entre 60 et 90 %.

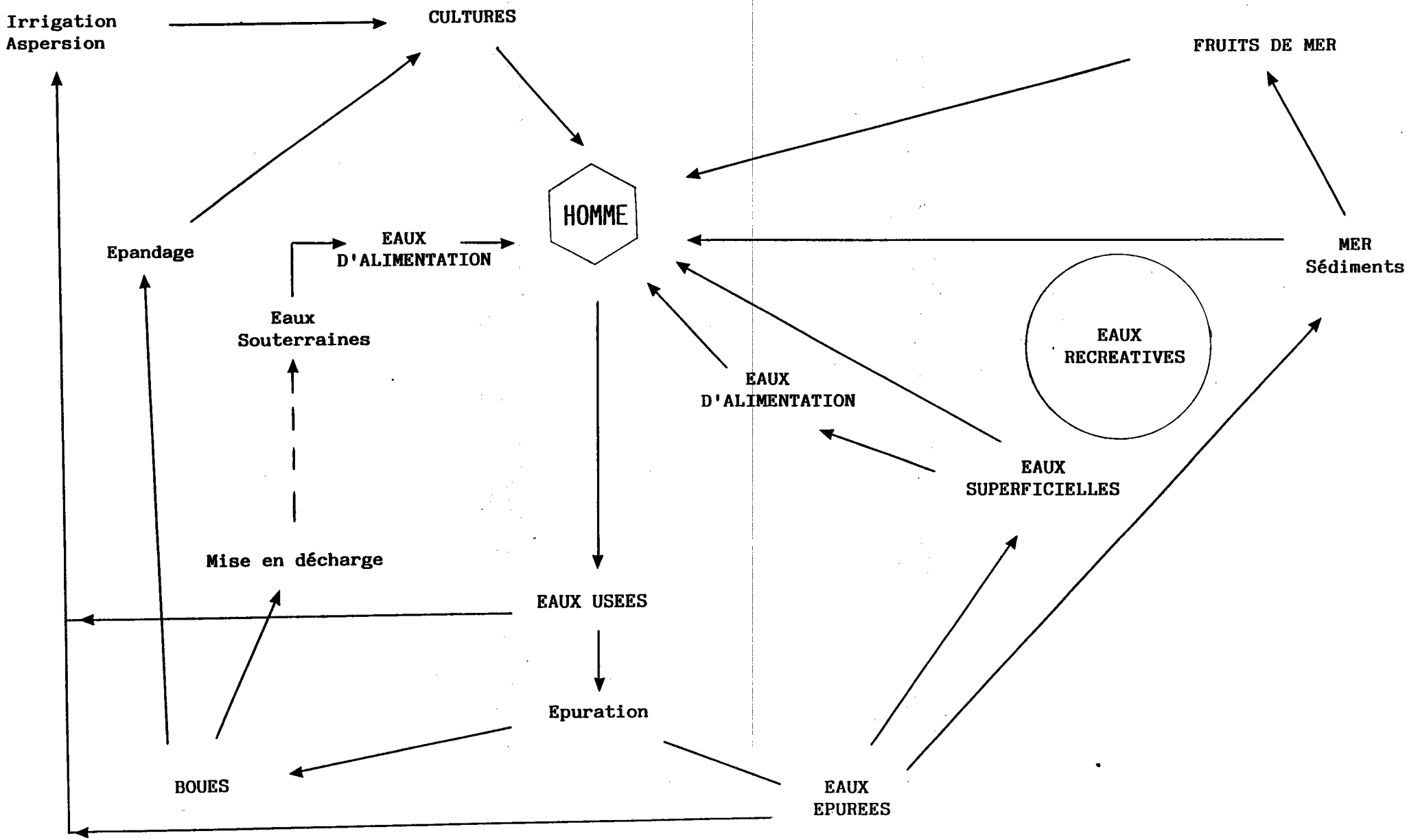


Figure n° 1 - Contamination du milieu hydrique

Cette épuration a deux conséquences pratiques. D'une part elle permet de rejeter dans le milieu extérieur des eaux de meilleure qualité, d'autre part il y a production de sous produits de l'épuration qui sont constitués par de très gros volumes de boues. Les eaux épurées contiennent encore des particule virales Tableau n° 3) et compte tenu des volumes d'eau rejetés quotidiennement dans les eaux superficielles, la contamination est loin d'être négligeable puisque pour une agglomération de 300 000 habitants, elle a pu être évaluée à plus de 10^9 virus par 24 heures (SCHWARTZBROD et al. 1979).

	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Eaux Brutes CANADA	95,1 NPPUC/litre entéro et réovirus	100 %	PAYMENT et al. (1986)
Eaux Brutes BARCELONE	267 UFP/litre entérovirus 237 FF/litre Rotavirus	100 % 100 %	BOSCH et al. (1986)
Eaux Brutes CANADA	1 à 45 NPPUC/litre Virus entérique	100 %	PAYMENT et TRUDEL (1985)
Eaux Brutes New Zealand	1,70 à 2,68 log10 UFP/litre	67,5 %	LEWIS et al. (1986)
Eaux Brutes SAO PAULO Brésil	0 à 3300 UFP/litre Polio, Echo, Cox.		MARTINS et al. (1983)
Eaux Brutes NANCY	Rotavirus	80 %	SCHWARTZBROD et al. (1983)
Eaux Brutes Mississipi U.S.A.	3,3 à 3,6 UFP/l		SHELADIA et al. (1982)
Eaux Brutes Grande Bretagne	72500 UFP/litre 57500 UFP/litre		MORRIS (1984)
Eaux Brutes PRAGUE		56 %	ZDRAZILEK et al. (1982)
Eaux Brutes Région Parisienne		60 %	OUVRARD et al. (1982)

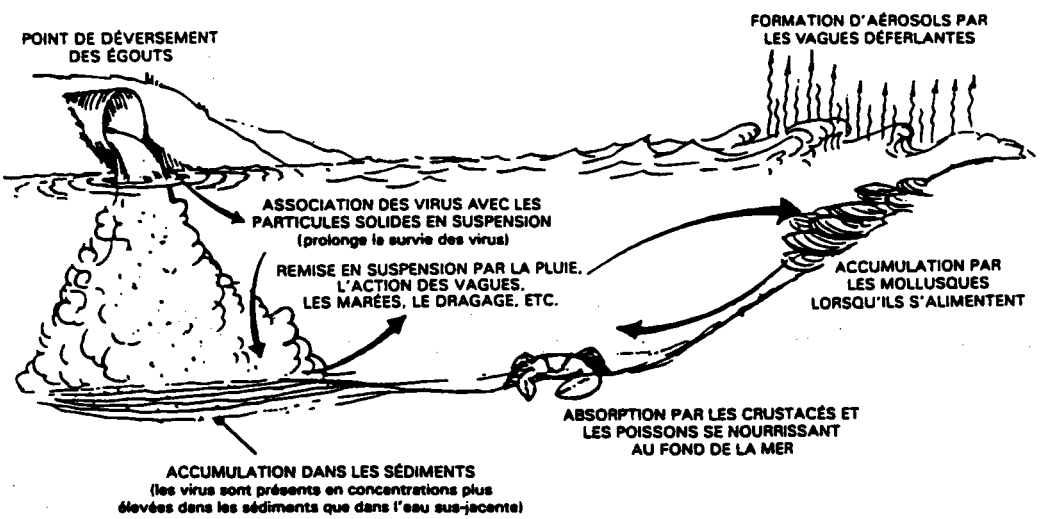
Tableau n° 2 - Virus et eaux usées brutes

	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Eaux épurées après boues activées	1,4 NPPUC/litre Entéro. et Réovirus	79 %	PAYMENT et al.(1986)
Eaux épurées après sédimentation primaire	4 UFP/litre Entérovirus 10 FF/litre Rotavirus	87 % 75 %	BOSCH et al.(1986)
Eaux épurées après traitement par la chaux	0,6 UFP/litre Entérovirus 6,7 FF/litre Rotavirus	29 % 50 %	BOSCH et al.(1986)
Eaux épurées après traitement biologique	1,86 à 2,66 log UFP/Litre	100 %	LEWIS et al.(1986)
Eaux épurées après lagunage	0,6 à 3,4 UFP/litre		SHELADIA et al.(1982)
Eaux épurées après sédimentation primaire	400 à 71200 UFP/litre		MORRIS (1984)
Eaux épurées Athènes	50 à 700 UFP/litre Adénovirus 120 à 580 UFP/litre Entérovirus		KRIKELIS et al.(1986)

Tableau n° 3 - Virus et eaux usées épurées

Les eaux superficielles (fleuves, rivières, lacs, mers) reçoivent ainsi des virus qui sont alors soumis à des influences diverses influant sur leur devenir. En fait, la concentration virale diminue sous l'effet de la dilution, de l'ensoleillement, de la température, de l'oxygénation . Cependant dans le milieu hydrique les virus sont souvent liés à des éléments particulaires. METCALF et al. (1984) montrent que les entérovirus et les rotavirus présents dans les eaux d'un estuaire sont adsorbés préférentiellement sur des particules ayant un diamètre < 0,3 µm et d'après PAYMENT et al. (1988) les virus présents dans l'eau de rivière seraient soit libres, soit associés à des particules de diamètre < 0,25 µm.

Cette adsorption permet une protection des virus contre les agents inactivant et favorise leur survie. Les quantités de virus sont en général peu élevées dans les eaux superficielles (Tableau n° 4 et Tableau n° 5). Cependant il est important de montrer que les virus adsorbés sur des particules sont susceptibles de sédimenter et de se déposer au niveau des sédiments fluviaux ou marins (LABELLE et al. 1980). Les quantités de virus retrouvés dans ces deux milieux sont variables comme l'indiquent les résultats rassemblés dans le tableau n° 6. Or ces sédiments, du moins leur couche superficielle, sont susceptibles d'être facilement remis en suspension et constituent ainsi une source de contamination à distance telle que le visualise la Figure n° 2 au niveau de la mer.



(D'après Melnick, J. L. & Gerba, C. P. *Public Health Reviews*, 9: 185-213 (1980))

Figure n° 2 - Devenir des virus dans les systèmes côtiers (RAO et al. 1986)

	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Tibre - Rome	Virus de l'hépatite A		DIVIZIA et al. (1989)
Rivière E	0,5 à 8,5 NPPUC/litre Coxsackievirus et Echovirus	57 %	WALTER et al. (1989)
Rivière S (R.D.A.)	2 à 56 NPPUC/litre	82 %	
Rio Besos (Barcelone)	$1,4.10^{1}$ UFP/litre (moyenne)	100 %	SCHWARTZBROD et al. (1987)
Rio Llobregat (Barcelone)	0,70 UFP/litre (moyenne)	83 %	SCHWARTZBROD et al. (1987)
Loire - France	1,39 NPPUC/litre Polio, Echo, Adéno, Coxsackievirus	100 %	LE BRIS et al. (1983)
Rippol river Besos river (Barcelone)	15,5 NPPUC/litre 16,2 NPPUC/litre	68 % 87 %	BOSCH et al. (1986)

Tableau n° 4 - Virus et eaux de rivières

	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Eau de mer	0,3 à 7,3 UFP/100 l		RAO et al.(1986)
Eau de mer U.S.A.	3 à 12 UFP/250 l Entérovirus	14 %	RAO et al.(1984)
Eau de mer	119-1000 UFP/250 l	16 %	RAO et MELNICK
Eau de mer GOLFE-JUAN (France)	0	0	HUGUES et al. (1988)

Tableau n° 5 - Virus et eau de mer

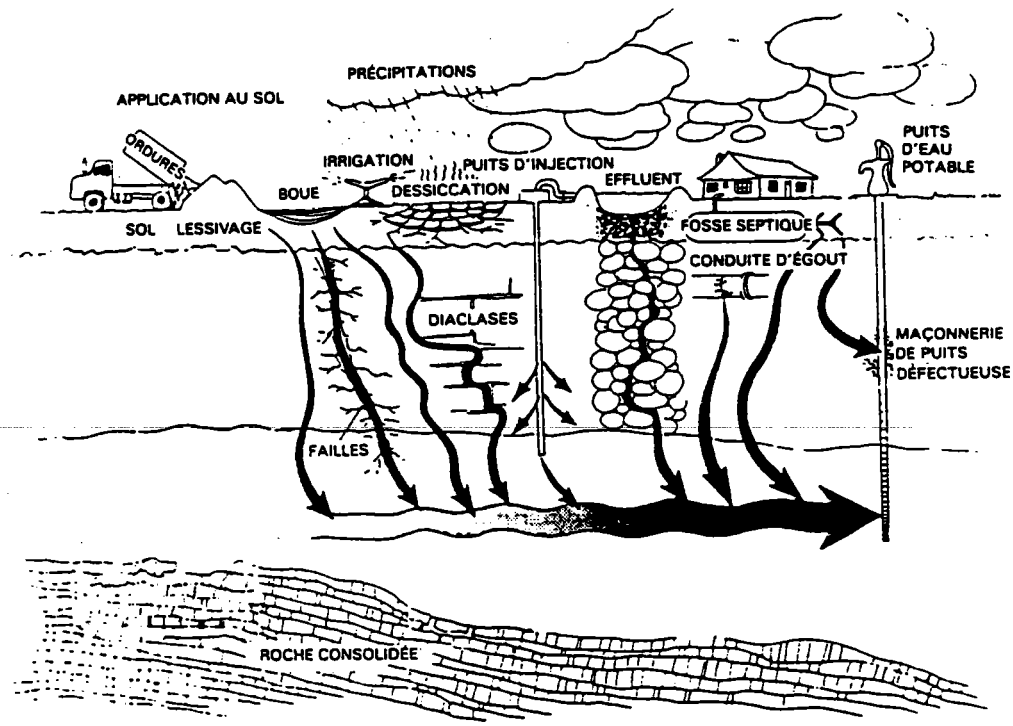
	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Sédiments fluviaux Rio Besos et Llobregat (Barcelone)	44 à 10 000 UFP/100 g Entérovirus	100 %	SCHWARTZBROD et al. (1988)
Sédiments marins (Barcelone)	0,5 à 53 UFP/100 g Entérovirus	48,4 %	SCHWARTZBROD et al. (1988)
Sédiments marins (U.S.A.)	2160 à 9830 UFP/100 l Entérovirus		RAO et al. (1986)
Sédiments estuariens (U.S.A.)	2000 à 2080 UFP/100 l Entérovirus		RAO et al. (1986)
Sédiments marins (U.S.A.)	39 à 398 UFP/1000 g Entérovirus	47 %	RAO et al. (1984)
Sédiments marins (U.S.A.)	800 à 3800 UFP/1000 g Rotavirus	40 %	RAO et al. (1984)

Tableau n° 6 - Virus et sédiments

Cette présence éventuelle de virus pathogènes pour l'homme au niveau des eaux de rivières, des eaux de mer, des sédiments fluviaux et marins ainsi que des boues résiduaires pose un problème de santé publique.

En effet, les eaux de rivière et de lac sont de plus en plus utilisées pour produire, après des traitements plus ou moins sophistiqués, de l'eau d'alimentation. De plus, ces milieux sont utilisés comme espaces sportifs et ludiques. Il en est de même pour l'eau de mer qui, par ailleurs, constitue le milieu naturel d'élevage des fruits de mer (huîtres et moules).

Quant aux boues résiduaires, la plupart du temps elles sont mises en décharge, parfois utilisées en amendement agricole ou déshydratées par action de la chaleur. Dans les deux premiers cas, du fait de leur teneur importante en microorganismes pathogènes, elles présentent un risque de contamination des cultures maraîchères en cas d'épandage et un risque de pollution des eaux souterraines comme le visualise la Figure n° 3.



(D'après Melnick, J. L. & Gerba, C. P. *Public health reviews*, 9: 185-213 (1980) (adapté))

Figure n° 3 - Pénétration, survie et migration des virus dans les eaux souterraines

(RAO et al. 1986)

Le devenir des virus entériques dans le sol et la possibilité de pollution des nappes phréatiques ont d'ailleurs fait l'objet de nombreuses études (MC CONNEL et al. 1984 ; SINGH et al. 1986).

Ainsi, DIZER et al. (1984) ont estimé que lorsque l'eau contaminée par des virus est infiltrée dans le sol et que la vitesse de l'eau est de 0,5 m par jour, moins de 1 % des virus présents initiallement dans l'eau atteignent une distance de 80 cm en 50 jours.

Si par contre la vitesse d'infiltration de l'eau est de 5 m par jour, moins de 1 % des virus couvrent une distance de 12 mètres en 50 jours. Ils montrent aussi que les interactions hydrophobes jouent un rôle très important dans l'adsorption des virus et qu'en présence de surfactants l'adsorption virale dans le sol est très nettement diminuée.

Par ailleurs JANSONS et al. (1989 b) rapportent que les eaux usées contenant de nombreux types de virus associés à du matériel organique et possédant des propriétés différentes, il est difficile de trouver un sol qui puisse adsorber avec la même efficacité tous les virus entériques. Ils montrent aussi que l'adsorption dans le sol ne provoque pas obligatoirement une inactivation virale et que cette adsorption peut être réversible.

Par contre selon BITTON et al. (1984) les entérovirus sont rapidement inactivés dans le sol.

De même PANCORBO et al. (1988) étudiant le transport du poliovirus de type 1 dans une colonne de sol traitée avec des boues déshydratées conditionnées avec des polyélectrolytes ou conditionnées chimiquement puis lessivées avec des eaux de pluie naturelles, constatent une immobilisation des virus.

Au niveau des boues les taux de virus sont variables (Tableau n° 7). Ils varient selon la nature de boues, le procédé qui est à l'origine de leur production et les traitements, ajouts ou transformations qu'elles ont subi (SATTAR et WESTWOOD 1979).

Le Tableau n° 8 indique la concentration virale détectée dans trois types de boues par différents auteurs.

De même selon SCHWARTZBROD et al. (1986) les pourcentages d'échantillons positifs en virus sont de 100 % dans les boues fraîches et dans les boues biologiques, de 44 % dans les boues digérées et de 10 % dans les boues déshydratées. Les opérations de digestion de conditionnement et de déshydratation des boues ont donc un effet négatif sur la survie des virus

	QUANTITE DE VIRUS	% ECHANT. POSITIFS	AUTEURS
Boues brutes après décantation primaire (Barcelone)	$7,7.10^2$ (moyenne)/100 g	90 %	SCHWARTZBROD et al. (1987)
	40.3 NPPUC/litre Entéro. et Réo.	94 %	PAYMENT et al. (1986)
Boues brutes Boues digérées	1429 UFP g^{-1} 210 UFP g^{-1}		GODDARD et al. (1981)
Boues fraîches Nancy Boues activées " Boues digérées "	1700 (moyenne) 115 (moyenne) 30 (moyenne)	100 % 100 % 44 %	SCHWARTZBROD et al. (1986)
Boues après sédimentation primaire (Barcelone)	9476 UFP/kg Entéro. 114000 FF/kg Rota.	100 % 100 %	BOSCH et al. (1986)
Boues après traitement par la chaux (Barcelone)	69 UFP/kg Entéro. 766 FF/kg Rota.	25 % 14 %	BOSCH et al. (1986)
Boues de lagunage (France)	$2,4\ 10^4$ NPPUC/litre		CARRE et al. (1986)

Tableau n° 7 - Virus et boues résiduaires

AUTEURS	Boues primaires UFP/l	Boues biologiques UFP/l	Boues digérées UFP/l
BERG et BERMAN (1980)	3800 - 116000		400 - 4100
BERMAN et al. (1981)	270 - 23200	150 - 8210	
BRASHEAR et WARD (1982)	10000 - 140000		
WULLENWEBER et JORET (1983)		6 - 71	
GOYAL et al. (1984 b)	132 - 9303		4 - 210

Tableau n° 8 - Quantité de virus entériques dans les boues au cours du traitement

Si les virus sont bien présents dans les différents milieux hydriques, il est nécessaire de connaître leur durée de survie pour effectuer une estimation des risques de contamination pour l'homme.

La survie des virus a été étudiée dans les eaux par de nombreux auteurs. Ainsi SCHWARTZBROD et al. (1975) ont montré la très grande résistance des virus poliomyélitiques dans de l'eau tamponnée stérile. En effet, la survie du poliovirus de type 1 est de 296 jours pour une température comprise entre 18°C et 23°C. A +4°C le processus d'inactivation est considérablement plus lent puisque, en partant d'une eau contenant 10^5 NPPUC/litre, les auteurs ont calculé qu'il faudrait entre 10 et 15 ans pour obtenir la disparition de la totalité des particules infectieuses présentes dans l'eau.

BIZIAGOS et al. (1988 a) comparant la survie des poliovirus et du virus de l'hépatite A dans de l'eau de Volvic rapportent que les deux virus persistent très longtemps à +4°C et qu'après un an leur inactivation est très faible. Par contre à la température du laboratoire, le poliovirus de type 1 n'est plus détecté après 300 jours alors que le virus de l'hépatite A est toujours présent sous forme infectieuse.

Dans les eaux souterraines la durée de survie des virus Echo 6, 11 et 24, du virus coxsackie B5 et du poliovirus de type 1 a été déterminée par JANSONS et al. (1989 a). Cette survie est variable et dépend de la température, de l'oxygène dissous et sans doute de la présence de microorganismes.

C'est le virus Echo 6 qui s'est révélé le moins stable alors que le poliovirus était le plus résistant.

Dans les eaux de rivière, la stabilité du poliovirus varie en fonction de l'ensoleillement et de la turbidité. En l'absence de lumière solaire, le taux d'inactivation varie de 0,71 à 0,80 $\log^{10}$ par jour alors qu'en présence de lumière solaire ce taux varie de 1,33 dans une eau très turbide à 2,38 log par jour dans une eau de faible turbidité (HURST 1988).

En eau de mer la survie des virus entériques est plus courte puisqu'elle a été estimée en moyenne à 6 jours avec des extrêmes de 1 à 23 jours. RAO et al. (1984) n'ont pas retrouvé de poliovirus et de rotavirus ensemencés dans l'eau de mer après 9 jours. De même, le virus coxsackie A9 était indécelable après 2 jours alors que les virus Echo 1, coxsackie B3 et le poliovirus persistaient dans l'eau de mer respectivement 4, 6 et 10 jours. En fait la survie des virus dans les eaux est largement influencée par un certain nombre de facteurs tels que le pH, le chlore, la dureté (PANCORBO et al. 1987), la température (WARD et al. 1986 ; RAPHAEL et al. 1985), la présence de microorganismes, du taux d'oxygène dissous (WARD et al. 1986 ; JANSONS et al. 1989 a),de l'activité algale et de la prédation des protozoaires (BLOCK 1983). (Figure n° 4).

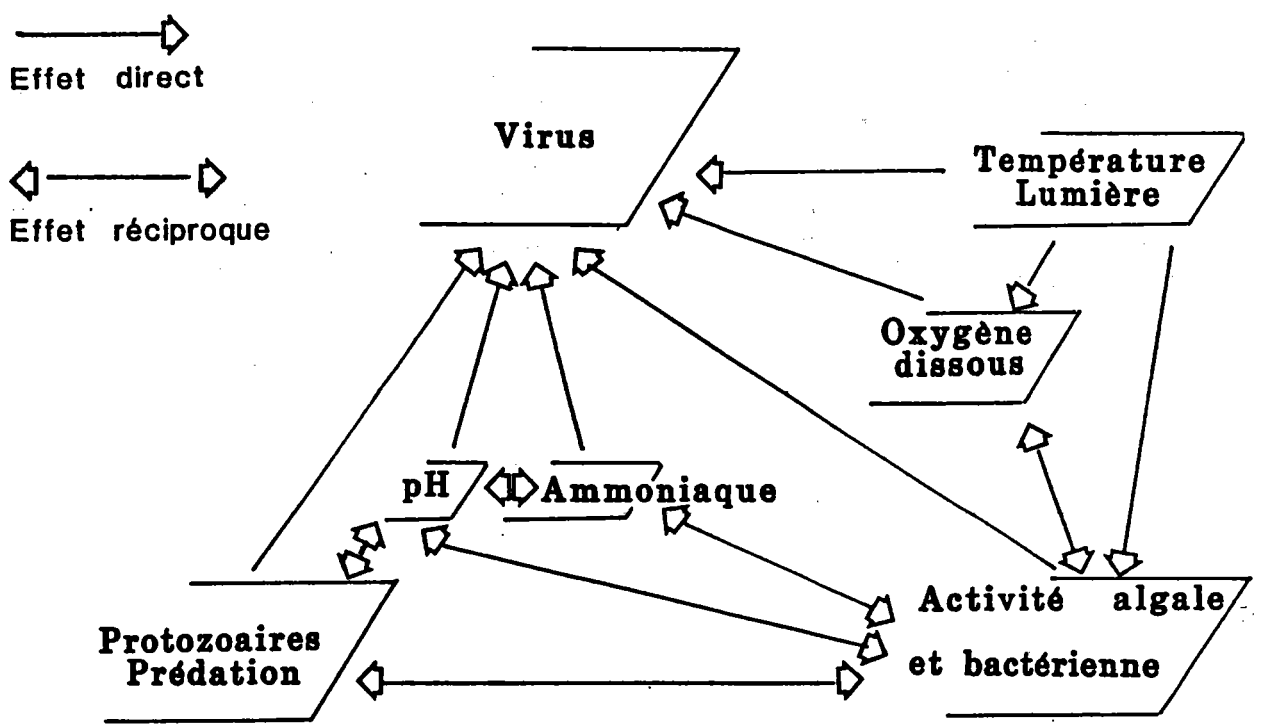


Figure n° 4 - Facteurs affectant la survie desvirus dans l'environnement (d'après BLOCK 1983)

Au niveau des boues WARD et ASHLEY (1976) constatant l'inactivation du poliovirus dans les boues digérées évoquent la présence de constituants virucides dans les boues digérées qui ne sont pas présents dans les boues brutes.

FENTERS et al. (1979) ont constaté un rôle inactivant du surnageant des boues sur les entérovirus.

TRAUB et al. (1986) ont étudié l'influence de la digestion et de l'élévation de température des boues sur le devenir des virus. Ils montrent que la fermentation thermophile à 60°C aboutit à une diminution de 3,5 log/heure du titre de bactériophage f2 tandis que la digestion thermophile à 54,5°C provoque seulement une chute du titre de 1,2 log/heure. Pendant la digestion mésophile le taux d'inactivation est réduit à 0,04 log par heure.

A l'inverse de l'influence néfaste sur les virus de l'élévation de température des boues (SANDERS et al. 1979), la survie de ceux-ci est favorisée si les boues sont maintenues à +5°C (BERG et al. 1988).

De plus l'inactivation des virus dans les boues est accrue par la déshydratation. BRASHEAR et WARD (1983) ont en effet montré que la diminution de la concentration en eau entraîne une perte de l'infectiosité des virus.

Enfin SCHWARTZBROD et MATHIEU (1986) ont montré qu'après un an de stockage en décharge des boues semi-déshydratées ne contenaient plus d'entérovirus.

Pour ce qui est des sédiments marins, la survie des virus entériques peut y être très longue puisque GOYAL et al. (1984 a) ont rapporté que des entérovirus survivaient plus de 17 mois dans des sédiments contaminés par des boues le long de la côte Est des Etats-Unis.

LIEW et GERBA (1980) ont d'ailleurs montré que les sédiments marins étaient susceptibles de protéger les virus contre l'inactivation. D'après GERBA et GOYAL (1988) en présence de sédiments, le taux d'inactivation des virus est 4 à 5 fois plus faible que dans l'eau de mer surnageante.

A L'issue de cette brève étude bibliographique, il apparaît que les virus sont très présents dans le milieu hydrique et que les boues provenant de l'épuration des eaux usées ainsi que les sédiments fluviaux et marins constituent un important réservoir de virus. Celui-ci peut être à l'origine de la contamination des produits maraîchers à la suite de l'épandange des boues mais aussi des eaux superficielles notamment des eaux de mer où sont élevés des fruits de mer, représentant ainsi un danger évident pour la santé des consommateurs. (LANDRY et al. 1983).

Dans ces conditions, il est important que ces milieux puissent être analysés et surveillés régulièrement sur le plan virologique et que des techniques de détection sensibles et fiables soient mises à la disposition des analystes. De nombreux travaux ont déjà été réalisés sur ce sujet sans que ni pour les boues, ni pour les sédiments, des techniques performantes aient été proposées.

II - RECHERCHE DES VIRUS DANS LES BOUES ET LES SEDIMENTS

Dans les boues et les sédiments il est admis que les virus sont adsorbés aux particules solides constitutives de ces milieux.

Ceci a été démontré par de nombreux auteurs parmi lesquels : LUND (1971), BERG (1973), BITTON (1975), WARD et ASHLEY (1976), ABID et al. (1978).

Décrite par certains auteurs comme une inclusion (WELLINGS et al. 1976) ou comme une adsorption (SCHAUB et SAGIK 1975), la liaison virus-boue est d'intensité variable selon les types de virus et la nature des solides (SOBSEY et al. 1980 et HURST et al. 1980 a).

GERBA (1984) a étudié les mécanismes et les facteurs influençant l'adsorption des virus sur les surfaces des solides. Il montre que les virus entériques se comportent comme des particules colloïdales. Les zones hydrophobes présentes sur les virus et les solides jouent un rôle significatif dans le mécanisme d'adsorption des virus aux surfaces.

SHIELDS et FARRAH (1983) pensent que, à différents pH, l'importance relative des interactions électrostatiques et hydrophobes varie. Pour ces auteurs, l'addition de cations ou l'élévation du pH est capable de rompre les interactions électrostatiques et de réaliser ainsi l'élution des virus. Ils ont de plus montré que les substances chaotropiques et les composés non ioniques comme l'urée et le tween 80 interviennent aussi pour rompre ces interactions hydrophobes.

L'adsorption des virus et leur survie à l'état adsorbé sont fonction de nombreux éléments tels que le type de virus, la nature et la charge du support, le pH du milieu, la présence de matières organiques et d'ions en solution dans le milieu. Enfin il a été mis en évidence que certains constituants du sol et du milieu hydrique réalisent soit une action de protection, soit une inactivation des virus fixés sur les particules solides de boues et de sédiments.

La première étape de la recherche des virus dans ces milieux consiste donc à rompre ces liaisons virus-solide et à libérer les particules virales de leur support. C'est la phase d'extraction-élution.

L'analyse virologique d'une boue ou d'un sédiment comportera en fait trois étapes :

- Extraction-élution des virus
- Concentration des virus
- Mise en évidence et identification des virus

II.1 - ETAPE D'EXTRACTION-ELUTION

Elle est réalisée à l'aide de divers traitements physiques, mécaniques ou chimiques en présence d'une solution éluante.

Les méthodes se différencient par :

- La nature de la solution éluante : solutions de protéines (sérum de veau, lait écrémé, extrait de boeuf...) ou solutions d'acides aminés (glycine, lysine...) à diverses concentrations
- par le pH d'élution
- par les moyens mis en oeuvre pour favoriser cette élution lors de l'homogénéisation des particules solides dans l'éluant (agitation magnétique, sonication...).

II.1.1 - ELUTION DES VIRUS A PARTIR DES BOUES

II.1.1.1 - Nature et pH de l'éluant

Les solutions éluantes sont très nombreuses et leur composition est très variée.

Pour tenter de décrocher les virus adsorbés sur des boues brutes SATTAR et WESTWOOD (1976) ont étudié l'efficacité de diverses solutions de protéines préparées en solution saline dont le pH final était compris entre 7,2 et 7,5. :

- Hydrolysat de caséine à 3 %
- Hydrolysat de lactalbumine à 3 %
- Solution d'extrait de boeuf à 3 %
- Sérum de veau foetal à 10 %

Si l'emploi d'hydrolysats de caséine ou de lactalbumine s'est révélé décevant, par contre la solution d'extrait de boeuf 3 % et le sérum de veau foetal à 10 % ont donné des résultats intéressants. Sur vingt échantillons différents de boues brutes, la solution d'extrait de boeuf a ainsi permis l'élution de virus dans quinze cas (soit 75 %) et le sérum de veau foetal dans dix neuf échantillons soit 95 %.

SUBRAHMANYAN (1977) cherchant à déterminer la persistance d'entérovirus ajoutés à des boues, extrait les virus par élution avec une solution saline additionnée de 2 % de sérum de veau foetal. L'expérimentation est menée avec des solutions à des pH variant de 6,5 à 9,5. Les résultats montrent que la meilleure élution est obtenue à pH=9,5 (32 % de virus récupérés) alors que pour des pH inférieurs les quantités de virus retrouvés sont très faibles.

COLLIN (1977) dans un travail expérimental sur des boues activées compare, pour la désorption de poliovirus injectés dans un litre de boue, d'une part un tampon phosphate à pH=7 et d'autre part une solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9. Les résultats exprimés en pourcentage de particules virales récupérées sont décevants avec le tampon phosphate (3,6 % à 8,25 % de récupération), mais ils sont très élevés dans le cas de l'élution avec la solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9 puisqu'ils s'échelonnent de 57 % à 300 %.

GLASS et al. (1978) ont utilisé pour éluer des poliovirus ajoutés à des boues digérées une solution d'extrait de boeuf à 3 % à trois pH différents : pH=9, pH=10 et au pH naturel de la solution. L'élution a pH naturel de la solution d'extrait de boeuf donne les meilleurs résultats (47 %) alors que à pH=9 et 10 les pourcentages sont respectivement de 30 % et 34 %.

Pour étudier la destruction des virus au cours du traitement des boues par digestion anaérobie mésophile et thermophile, BERG et BERMAN (1980) se servent, pour l'élution des virus, d'une solution d'extrait de boeuf à une concentration de 10 % dans un tampon Mc Ilvaine pH=7 (0,05 M Na_2HPO_4 + acide citrique qs pH=7).

De même BERMAN et al. (1981) utilisent une solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=7 pour mettre en évidence les virus indigènes présents dans trois sortes de boues : boues primaires, boues activées et boues digérées par digestion anaérobie mésophile. Ils comparent l'élution sur des boues acidifiées à pH=3,5 et addditionnées de cations di- ou trivalents par rapport à une boue non traitée. Les quantités de virus obtenues sont supérieures si les boues sont préalablement additionnées de $MgCl_2$ (concentration finale de 0,05 M) ou de $AlCl_3$ (concentration finale 0,0005 M) et acidifiées à pH=3,5.

FARRAH et al. (1981) mettent en évidence l'efficacité d'une solution d'urée 4 M et de lysine 1 % pH=9 pour éluer des poliovirus ajoutés à différentes boues issues de stations d'épuration. L'expérimentation est réalisée comparativement avec d'autres solutions éluantes. Les résultats (Tableau n° 9) montrent qu'avec cette solution, 70 % des particules virales ajoutées sont récupérées et que l'efficacité de cette solution urée 4 M-lysine 1 % pH=9 est très proche de celle de la solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9 (75 % de récupération).

ELUANT	POURCENTAGE DE VIRUS ELUES
Solution d'extrait de boeuf 3 % pH=9	75
Solution de 0,5 % de caséine isoélectrique pH=9	58
Solution à 3 % d'hydrolysat acide de caséine pH=9	38
Solution de glycine à 3 % pH=9	21
Solution à 3 % de lysine pH=9	20
Solution à 3 % d'acide aspartique pH=9	19
Solution de dodecylsulfate de sodium à 0,1 %	10
Solution à 0,1 % de bromure de Cetyltrimethylammonium	5
Solution à 0,1 % de tween 80	8
Solution d'urée 2 M - 1 % lysine pH=9	36
Solution d'urée 4 M - 1 % lysine pH=9	70
Solution d'urée 6 M - 1 % lysine pH=9	22

Tableau n° 9 - Elution des poliovirus adsorbés aux particules solides de boues (d'après FARRAH et al. 1981)

Afin d'analyser la survie des virus infectieux dans des boues brutes et digérées, GODDARD et al. (1981) préfèrent utiliser pour l'élution des virus une solution de lait écrémé à 1 %.

La méthode préconisée par l'E.P.A. (1984) consiste, après addition de chlorure d'aluminium (concentration finale 0,0005 M) et acidification à pH=3,5 de la boue, à éluer les particules virales avec une solution d'extrait de boeuf à 10 % tamponnée à pH=7.

SCHEUERMANN et al. (1986) étudiant comparativement plusieurs méthodes d'élution, proposent l'utilisation d'une solution éluante constituée de sodium-trichloro-acétate 1 M-lysine 0,1 M à pH=9 (TCA-lysine). Pour l'élution de poliovirus ajoutés à des boues digérées la procédure TCA-lysine permet d'obtenir des pourcentages de récupération très élevés (82 %).

NIELSEN et LYDHOLM (1980) ont testé trois méthodes d'élution des virus dans les boues fraîches et digérées :

- Précipitation à pH=3,5 par l'acide chlorhydrique suivie d'une élution par une solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=7
- Précipitation par l'alun suivie d'une élution par un tampon Tris à pH=9
- Elution simple par une solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=7

Avec les techniques de précipitation soit en milieu acide, soit par l'alun, les pourcentages d'échantillons positifs sont respectivement de 57 % et de 55 %. Quant à l'élution avec la solution d'extrait de boeuf sans précipitation, son rendement est légèrement inférieur avec 44 % de prélèvements positifs.

Enfin d'autres éluants comme l'eau distillée (TURK et al. 1980), le bouillon tryptose phosphate (MOORE et al. 1978), le lauryl sulfate de sodium à la concentration de 0,1 % dans du tampon glycine 0,05 M pH=7,5 (ABID et al. 1978) et le fréon (BRASHEAR et WARD 1982) ont été employés pour éluer les virus fixés sur les boues.

II.1.1.2 - Proportion de boues et de solution éluante au cours de l'élution

Un autre paramètre entrant en jeu dans l'extraction des virus est la proportion de boues solides ou liquides mise en contact avec la solution éluante utilisée.

GLASS et al. (1978) mettent en suspension 10 g de solides dans 200 ml d'une solution d'extrait de boeuf à 3 %.

BERMAN et al. (1981) utilisent, pour éluer, un volume de solution d'extrait de boeuf identique au volume original de l'échantillon de boue.

GODDARD et al. (1981) diluent 20 ml de boues brutes ou 40 ml de boues digérées dans 200 ml de solution de lait écrémé.

La méthode utilisée par SCHEUERMAN et al. (1986) comporte un mélange du culot de boues à 5 volumes de solution TCA-lysine.

De même HURST et GOYKE (1986) préconisent un rapport de 1 sur 5 entre le volume de particules solides à traiter et le volume d'éluant employé.

SHIMOHARA et al. (1986) ont utilisé 3 volumes différents de solution éluante pour extraire des poliovirus ajoutés à des boues activées : 25, 50 et 100 ml, le volume de boue étant dans tous les cas de 50 ml. Ils obtiennent un rendement maximum lorsque 100 ml de solution éluante sont ajoutés à 50 ml de boues.

L'action des éluants est complétée par l'utilisation de procédés physiques ou mécaniques ayant pour but d'aider la dispersion et l'homogénéisation de la boue dans la solution éluante. Les procédés décrits dans la littérature sont très variés.

II.1.1.3 - Techniques d'homogénéisation

Sur des boues contaminées artificiellement, HURST et al. (1978) ont essayé 2 éluants différents associés à 2 traitements physiques différents : soit l'action des ultrasons, soit l'agitation magnétique ; les deux éluants étant : le tampon glycine 0,05 M pH=11,5 et une solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9,5. Ils constatent que le type d'agitation influe sur les résultats.

Ainsi avec la solution de glycine, un traitement aux ultrasons permet d'obtenir un pourcentage de récupération de virus de l'ordre de 4 à 8 % alors qu'avec le même éluant et une agitation magnétique, la récupération virale s'échelonne de 58 à 86 %.

Avec la solution d'extrait de boeuf, de bons résultats sont observés sur les échantillons soumis à un traitement par les ultrasons : (de 36 à 66 % de virus élués) alors qu'avec une agitation magnétique les pourcentages de virus retrouvés varient de 21 % à 46 %.

TURK et al. (1980) dispersent les boues :
- soit par agitation magnétique
- soit par agitation violente dans un mixer
- soit par action des ultrasons

quelque soit le type de boues, fraîches ou digérées analysées, les meilleurs résultats sont obtenus quand l'homogénéisation est réalisée par mixage.

De nombreux auteurs utilisent l'agitation magnétique : BERG et BERMAN (1980), BERMAN et al. (1981), SCHEUERMANN et al. (1986).

D'ailleurs, c'est l'agitation magnétique qui est utilisée dans le protocole préconisé par l'E.P.A. (1984).

Dans la méthode de GLASS et al. (1978), reprise dans de nombreuses études comparatives (BRASHEAR et WARD 1982, GOYAL et al. (1984 b) l'homogénéisation est réalisée dans un mixer (polytron mixer) et suivie d'une ultrasonication.

De même SCHWARTZBROD et MATHIEU (1986) associent l'agitation magnétique à une ultrasonication.

SHIMOHARA et al. (1986) ont comparé trois traitements physiques différents :

- Agitation magnétique
- Sonication
- Homogénéisation

pour éluer les poliovirus à partir de boues activées avec une solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9. Or ces auteurs rapportent que les trois techniques ont une efficacité similaire et qu'elles n'ont pas d'influence sur les résultats.

II.1.2 - ELUTION DES VIRUS A PARTIR DES SEDIMENTS

Les méthodes utilisées pour rompre la liaison virus-sédiment sont basées sur les mêmes principes que celles décrites pour les boues.

Après contamination artificielle par du poliovirus de type 1 de sédiments marins, BITTON et al. (1982) ont comparé l'efficacité de dix solutions éluantes différentes pour désorber ce virus à partir de sédiments marins sableux.

La quantité de sédiment analysée était de 10 g incorporés dans 30 ml d'éluant.

Les pourcentages d'élution les plus élevés sont obtenus avec une solution d'urée 4 M-lysine 0,05 M pH=9 et avec une solution de trichloroacétate de sodium 0,6 M-glycine 0,02 M pH=9 (Tableau n° 10).

ELUANT	POURCENTAGES DE RECUPERATION (MOYENNE)
Solution d'urée 4 M-lysine 0,05 M PH=9	44
Solution TCA 0,6 M-glycine 0,02 M pH=9	41
Solution à 2 % de caséine isoélectrique pH=9	35
Solution à 1 % de caséine isoélectrique pH=9	23
Solution de lait écrémé 1 % pH=9	16
Solution de substances humiques pH=9	11
Solution de pyrophosphate de sodium à 0,3 % pH=9	11
Solution d'extrait de boeuf à 3 % pH=9	9
Sérum de veau foetal à 10 % en PBS pH=9	6
Eau distillée	1,6
Solution de glycine 0,25 M - 0,05 M EDTA pH=11	12

Tableau n° 10 - Elution de poliovirus type 1 à partir de sédiment marin (d'après BITTON et al. 1982)

TSAI et al. (1983) ont étudié plusieurs paramètres de l'élution sur deux sortes de sédiments qui se différencient par leur composition en sable et en limon, une contamination artificielle a été réalisée avec deux entérovirus : le Coxsackie virus B3 et le Poliovirus type 1 sur 10 g de sédiments.

Plusieurs éléments se dégagent de leur étude :

- L'influence du tampon, du pH et de la concentration de l'extrait de boeuf sur les pourcentages de récupération : la meilleure élution est obtenue avec de l'extrait de boeuf 3 % pH=9 en tampon TRIS 0,2 M.

- Les résultats sont améliorés en supplémentant la solution d'extrait de boeuf avec du sodium dodecylsulfate (0,025 %) ou de sérum de veau nouveau-né (10 %).

- La comparaison de six éluants différents avec les deux sortes de sédiments et avec chaque virus montre, dans tous les cas, que les solutions de lait écrémé 0,5 % et de glycine à 0,25 M pH=11 sont de moins bons éluants que les solutions d'extrait de boeuf 3 % pH=10, de caséine isoélectrique pH=9 ou de bouillon nutritif 4 % pH=7,5.

JOHNSON et al. (1984) utilisent aussi la contamination artificielle avec trois entérovirus différents : le poliovirus type 1, le coxsackie virus B1 et l'échovirus type 11, fixés sur des sédiments "estuariens", différents par leur composition en sable, argile et limon.

Parmi quatre solutions éluantes testées :

- bouillon nutritif 4 % pH=7,5
- bouillon nutritif 4 % pH=9
- solution d'extrait de boeuf à 5 % pH=9
- solution de caséine isoélectrique à 5 % pH=9

la solution de caséine permet d'obtenir les pourcentages de récupération les plus élevés (24 % contre 7,3 %, 10 % et 13,6%).

Si cette solution de caséine est supplémentée avec de la lécithine, le nombre de virus élués est augmenté ; la comparaison de

lécithine de diverses natures montre que les meilleurs résultats sont obtenus avec une solution de caséine associée à 3 % de lécithine semi-purifiée extraite de graines de soja (57,6 %).

De même WAIT et SOBSEY (1983) ont montré que l'ajout d'agents chaotropiques tels que le nitrate de sodium (2 M) augmente le taux de récupération virale quand ils sont ajoutés à une solution d'extrait de boeuf à 3 %.

Les pourcentages les plus élevés (71 %) sont obtenus à pH=5,5 (42 % à pH=6,5 et 46 % à pH=7,5).

Les agents chaotropiques associés à des protéines comme l'extrait de boeuf seraient de bons éluants et permettraient de travailler à pH bas (GERBA 1984).

Lors d'une étude sur la présence et la survie d'entérovirus humains dans l'océan Atlantique au niveau de deux sites où ont été déposées des boues provenant de stations d'épuration (GOYAL et al. 1984a) l'analyse des sédiments a été réalisée par élution et mise en suspension de 300 à 400 g de sédiments dans 5 volumes (1,5 à 2 l) d'une solution d'extrait de boeuf à 6 % pH=10,5. Sur 213 échantillons analysés, 12 % se sont révélés contenir des entérovirus.

Il apparaît donc que les techniques d'élution préconisées sont très variées mais qu'elles sont très proches de celles rapportées pour les boues. Elles sont fondées sur une élution généralement réalisée à pH alcalin avec des conditions d'homogénéisation et de dilution très variables selon les auteurs.

Toutefois récemment BERG et SULLIVAN (1988) recommandent l'élution à pH neutre plutôt qu'à pH alcalin. En effet, ils ont montré qu'une solution d'extrait de boeuf 10 % pH=7,2 était plus efficace pour l'élution des virus fixés sur les particules solides d'un mélange de boues primaires et de boues activées, que la même solution utilisée à pH=9,2.

II.2 - CONCENTRATION DES VIRUS

La plupart des techniques d'extraction-élution décrites pour les boues et les sédiments permettent d'obtenir un éluat de volume relativement important dont l'inoculation totale est impossible sur cultures cellulaires. Par ailleurs les concentrations virales sont souvent faibles, il est donc utile de réduire le volume de l'éluat afin de concentrer les particules virales éventuellement présentes sous un plus petit volume et ainsi augmenter les chances de mettre en évidence les virus.

Cette concentration peut être réalisée par différents procédés mais le plus utilisé est celui fondé sur la floculation organique de solutions contenant des protéines. Cette méthode a été recommandée comme technique standard de reconcentration (APHA 1980).

Elle consiste à acidifier une solution protéique telle qu'une solution d'extrait de boeuf jusqu'à un pH inférieur à son point isoélectrique . Il se forme alors un précipité protéique à l'intérieur duquel les particules virales sont piégées. Après centrifugation, les virus sont récupérés par dissolution du floc dans quelques millilitres d'un tampon phosphate pH=7,2 (Na_2HPO_4 0,15 M).

Cette méthode est très utilisée soit lorsque les éluats sont à base d'extrait de boeuf, soit après addition d'extrait de boeuf à une solution non protéique, soit en présence d'une solution de lait ou de caséine (BITTON et al. 1979).

Le maximum de floculation est obtenu à pH=3,5 avec la solution d'extrait de boeuf (KATZENELSON et al. 1976, GOYAL et al. 1984 b) et de 4,5 avec une solution de lait écrémé (GODDARD et al. 1981).

Elle donne de bons résultats mais de nombreux auteurs ont signalé d'une part les résultats différents selon les virus recherchés (MORRIS et WAITE 1980 ; KEDMI et FATTAL 1981 ; GUTTMAN-BASS et NASSER 1984), d'autre part, il est apparu que la qualité de l'extrait de boeuf était prépondérante pour la réussite de cette technique.

SAFFERMAN et al.(1988) ont observé des modifications dans la formation du floc avec de l'extrait de boeuf selon le lot et l'origine de ce produit.

HURST et al. (1984) préconisent de tester systématiquement chaque lot d'extrait de boeuf alors que PAYMENT et al. (1984) préfèrent ajouter un produit facilitant la floculation. De même SOBSEY et al. (1985) obtiennent une meilleure floculation avec de l'extrait de boeuf en poudre plutôt qu'avec de l'extrait de boeuf en pâte.

SHIMOHARA et al. (1986) obtiennent des meilleurs pourcentages d'élution s'il font floculer une solution d'extrait de boeuf à 3 % plutôt qu'une solution d'extrait de boeuf à 10 %.

Au vu de ces inconvénients et ayant de plus observé la sensibilité de certains virus entériques aux variations de pH, PAYMENT et TRUDEL (1987) ont testé l'efficacité d'une solution de sulfate d'ammonium à pH=7 pour floculer la solution d'extrait de boeuf.

En conditions expérimentales, les pourcentages de récupération obtenus sont de 97 % pour le rotavirus simien SA 11, 87 % pour le coxsackie virus B_4 et 88 % pour le poliovirus type 1 dans une solution d'extrait de boeuf à 1 %.

A côté de la floculation organique de multiples techniques ont été proposées, ainsi TURK et al. (1980) concentrent l'éluat par passage sur de la bentonite. GERBA et al. (1977) concentrent les éluats obtenus après traitement de sédiments par filtration sur membrane de porosité 0,45 µm suivi d'une élution par un tampon glycine 0,25 M.

De même WULLENWEBER et JORET (1983) utilisent la filtration sur filtres type "BALSTON" à pH=3,5.

BRASHEAR et WARD (1982) après avoir élué par trois procédés différents (le fréon, l'eau distillée et une solution d'extrait de boeuf) ont comparé deux méthodes de concentration : l'ultra-centrifugation et la floculation organique. Pour la mise en évidence des virus indigènes, les meilleurs résultats sont obtenus par ultra-centrifugation quel que soit l'éluant.

FARRAH et al. (1976) puis MELNICK et al. (1984) ont proposé d'effectuer la concentration par addition d'hydroxyde d'alumine suivie par une hydroextraction en tube de dialyse. Les pourcentages de récupération obtenus sont d'environ 70 %.

De même BITTON (1980) préconise une concentration par fixation des virus sur des particules d'oxyde de fer ($Fe_3\ O_4$) suivie par une élution dans un très faible volume d'une solution de caséine à 2 % pH=8,5. Avec cette méthode RAO et al. (1981) récupèrent 60 % à 80 % des virus.

D'autres auteurs ont proposé de remplacer la floculation organique par une précipitation en présence de polyéthylèneglycol 6000 (PEG 6000) pour concentrer notamment les virus de l'hépatite A (BIZIAGOS 1989). Après contamination expérimentale par du VHA dans des boues fraîches primaires, la précipitation par le PEG 6000, à une concentration finale de 10 %, permet une récupération de l'antigène viral de 68,7 %.

Sur des éluats de sédiments, LEWIS et METCALF (1988) ont obtenu les meilleurs pourcentages de récupération du VHA (97 %) et des rotavirus (78 %) avec une concentration finale de 15 % de PEG 6000.

A l'issue des opérations d'extraction et de concentration des virus à partir des boues et des sédiments, l'analyste est en possession d'un concentrat ou d'un éluat à partir duquel les virus doivent être mis en évidence, quantifiés et identifiés.

11.3 - MISE EN EVIDENCE ET IDENTIFICATION DES VIRUS

II.3.1 - VIRUS SE MULTIPLIANT SUR CULTURES CELLULAIRES

Pour mettre en évidence les entérovirus, il est courant d'avoir recours à l'isolement sur cultures cellulaires.

En effet la plupart des entérovirus "classiques" se multiplient en provoquant un effet cytopathique qui se traduit soit par une destruction totale du tapis cellulaire en milieu liquide soit par une destruction localisée sous forme de plage de lyse lorsque les cellules sont placées sous couverture gélosée.

Le choix d'un type de cultures cellulaires est fonction du virus recherché puisque leur sensibilité est différente (HURST et al. 1978 ; RIDINGER et al. 1982). La sensibilité des cultures cellulaires aux principaux virus hydriques est résumée dans le tableau n° 11.

CELLULES	VIRUS	POLIOMYE-LITIQUES	COXSACKIE A	COXSACKIE B	E.C.H.O.	REOVIRUS	ADENOVIRUS
Primo Explantation	Rein de singe (primaire)	+	- *	+	+	+	-
Lignées établies	Véro	+	- *	+	+	+	±
	BGM	+	- *	+	+	+	±
	Hela	+	- *	±	±	+	+
	KB	+	- *	±	±	+	+
	Hep 2	+	- *	+	±	+	+
	RD	+	+ *	-	+	±	±
	MRC_5	+	+ *	-	+	±	+*

* A l'exception de certaines souches.

Tableau n° 11 - Sensibilité de différents systèmes cellulaires pour l'isolement des virus (d'après BLOCK et SCHWARTZBROD 1989)

Pour HAMPARIAN et]. (1985), l'utilisation de trois types de lignées cellulaires diférentes :

- cellules BGM
- cellules RD
- cellules Hela

permet l'isolement des différents types de Coxsackie virus. d'échovirus et de poliovirus 1,2 et 3.

Pour BRASHEAR et WARD (1982) parmi trois types de cultures cellulaires : BGM, RD et MA 104, les cellules BGM se sont révélées les plus performantes dans l'obtention de plages de virus provenant de boues fraîches.

FRINOT (1987) a proposé de cultiver les cellules BGM avec du milieu contenant 25 µg/ml d'IUdr, cette technique permet d'obtenir une réduction du délai d'appparition des plages et une augmentation du pourcentage d'échantillons positifs.

II.3.1.1 - Quantification des virus

La quantification de particules virales après développement sur cultures cellulaires peut se faire selon deux méthodes (BLOCK et SCHWARTZBROD 1989) :

- une méthode de type énumératif
- une méthode de type quantique

La méthode énumérative consiste à compter le nombre de lésions spécifiques provoquées par les virus ; elle s'applique à la technique des plages, chaque plage de lyse correspond à une unité formant plage (UFP).

La méthode de type quantique (ou méthode du tout ou rien) mesure le ratio de réponses positives par rapport au nombre total de réponses possibles ; elle est associée à la méthode d'inoculation en milieu liquide. Deux groupes de méthode de calcul sont utilisés :

- la détermination de la dose cytopathogène 50 (DCP 50)
- l'estimation du nombre le plus probable (NPP).

II.3.1.2 - Identification

L'identification sera différente selon que le virus isolé produit ou non un effet cytopathique caractéristique.

a) Virus produisant un effet cytopathique caractéristique sur cultures cellulaires

Parmi les virus hydriques les entérovirus "classiques" : les adénovirus, les réovirus ainsi que les coronavirus provoquent l'apparation d'un effet cytopathique.

Le délai d'apparition et l'aspect des lésions est caractéristique d'un type de virus.

La fixation et la coloration des cellules permet d'observer avec précision les lésions provoquées à l'intérieur des cellules, celles-ci sont différentes quant à leur aspect et leur localisation selon les virus en cause (réovirus, adénovirus ou entérovirus).

La détermination de l'identité des particules virales isolées se fait en général par une réaction immunologique de neutralisation de l'effet cytopathique.

b) Virus se multipliant sur cultures cellulaires mais ne produisant pas d'ECP caractéristiques

Les virus représentatifs de ce groupe sont les rotavirus.

Dans ce cas la mise en évidence de la multiplication virale dans les cellules (ORAGUI et MARA 1989) peut être réalisée par une réaction d'immunofluorescence indirecte.

Après inoculation des rotavirus humains sur cellules MA 104, leur présence est révélée par la réaction d'immunofluorescence indirecte (SATO et al., 1981). En effet MAC NULTY et al. (1977) ont montré que la fluorescence permet non seulement de mettre en évidence l'antigène du rotavirus dans le cytoplasme des cellules infectées mais aussi qu'elle permet de titrer le virus.

RIDINGER et al. (1982) démontrent que l'immunofluorescence est plus sensible et plus rapide que la méthode des plages pour la détection des réovirus.

Dans le cas de virus entériques, se multipliant sur cultures cellulaires mais ne produisant pas d'ECP, PAYMENT et TRUDEL (1985) ont détecté ces virus grâce à une méthode indirecte à l'immunopéroxidase avec des immunoglobulines humaines comme source d'anticorps spécifique.

Par ailleurs l'immunomicroscopie électronique a été associée aux cultures cellulaires pour détecter le virus de l'hépatite A et les adénovirus (PIETRI et al. 1988).

II.3.2. - IDENTIFICATION DE VIRUS SANS INOCULATION SUR CULTURES CELLULAIRES

Pour mettre en évidence les virus qui ne se multiplient pas ou très lentement sur cultures cellulaires, l'analyste peut avoir recours à différentes techniques.

Ainsi il est possible d'utiliser des méthodes qui permettent de visualiser les virus telles que la microscopie électronique (BRYDEN et al. 1977) qui a été utilisée pour l'isolement de rotavirus.(GOYAL et al.1987)

D'autres méthodes basées sur une réaction immunologique sont utilisées pour identifier les virus. Ce sont :

- L'immunomicroscopie électronique appliquée à la mise en évidence du virus de Norwalk (KAPLIKIAN et al. 1972)
- La radioimmunologie qui est utilisée pour détecter les antigènes viraux spécifiques du VHA (BIZIAGOS et al. 1987) et permet de mettre en évidence la présence de cet antigène rapidement alors que le délai d'apparition d'un effet cytopathique en cultures cellulaires est de 7 semaines.
- l'immunoenzymologie (BENNANI 1981) qui a été appliquée à la détection des rotavirus (SCHWARTZBROD et al. 1983) et du virus de l'hépatite A (AGBALIKA 1985).

Une modification de l'immunoenzymologie : la nitrocellulose-enzyme immuno assay (NC-EIA) a été appliquée à la détection de virus dans des éluats obtenus à partir d'eaux (DOW et al. 1988).

Il faut cependant préciser que ces méthodes détectent des antigènes présents dans les échantillons et ne permettent pas de conclure à la présence de particules virales infectieuses comme c'est le cas lors de l'utilisation des cultures cellulaires.

Toutefois la R.I.A. peut être appliquée au titrage du VHA sur le surnageant de cultures cellulaires (BIZIAGOS et al. 1988 a).

CHAPITRE II

BUT DU TRAVAIL

Les boues issues des traitements d'épuration des eaux usées sont soit mises en décharge, soit déshydratées et traitées par la chaleur, soit employées en valorisation agricole.

Cette utilisation en agriculture soulève un certain nombre d'interrogations notamment sur le risque potentiel pour la santé publique. Il est donc de plus en plus important de pouvoir disposer de techniques d'analyses virologiques qui soient performantes.

Le travail a pour but d'étudier les différents paramètres qui régissent l'extraction des virus et de déterminer les conditions optimales de leur récupération aux fins de mise en évidence.

En fonction des résultats obtenus il est envisagé de proposer un ou des protocoles d'extraction-concentration des virus, utilisables pour l'analyse des boues et des sédiments fluviaux et marins. Ces derniers constituent en effet des réservoirs de virus susceptibles de provoquer des contaminations à distance et de polluer des zones conchylicoles.

Ces protocoles devront être évalués et confrontés à d'autres techniques de référence.

Les virus concernés par ce travail sont les virus entériques provoquant un effet cytopathique sur des cultures cellulaires in vitro.

Cependant et compte tenu de l'importance du virus de l'hépatite A, la technique d'extraction-concentration préconisée pour les virus précédents sera appliquée à la recherche du virus de l'hépatite A.

C H A P I T R E III

MATERIEL ET METHODES

Dans ce chapitre sont décrits les matériels et méthodes généraux utilisés au cours du travail. Les protocoles propres à chaque série d'expérimentations sont précisés au fur et à mesure.

I - MATERIEL

I.1 - LES BOUES

Au cours de ce travail différents échantillons de boue ont été analysés, ils ont tous été prélevés à la station d'épuration de Nancy-Maxéville. Cette usine traite d'une part les eaux usées de l'agglomération nancéenne et d'autre part les eaux industrielles provenant de la brasserie de Champigneulles dont les filières de traitement sont différentes. Notre étude ayant porté sur les boues provenant du traitement des eaux usées urbaines seule sera décrite la filière d'épuration de celles-ci.

I.1.1 - Description de la station

Elle traite les eaux usées d'une population d'environ 340 000 eq-habitants et rejette dans la Meurthe 150 000 m^3 d'eaux épurées par 24 heures, après un temps de séjour moyen dans la station de 5 à 6 heures.

. Le traitement des eaux comporte 4 étapes :

- le prétraitement avec un dégrillage, un désablage et un déshuilage
- la décantation primaire qui élimine des eaux brutes les matières décantant rapidement
- le traitement par boues activées qui s'effectue dans 3 bassins d'aération
  la durée d'aération variant de 1h à 1h30
- la décantation secondaire qui sépare le floc de l'eau traitée et est suivie du rejet de l'effluent dans le milieu extérieur.

. Le traitement des boues s'effectue en plusieurs temps.

Les boues fraîches issues des décanteurs primaires sont relevées et acheminées vers les digesteurs. La digestion s'effectue en 2 phases :

- Tout d'abord dans les digesteurs primaires les boues sont malaxées en permanence et chauffées à 35°C
- Puis la fermentation est poursuivie dans les digesteurs secondaires.

Après 15 à 20 jours, les boues digérées sont épaissies par élutriation et sont conditionnées par ajout d'un polymère (ZETAG 63 pour les boues urbaines).

Enfin elles sont déshydratées par centrifugation puis soumises au séchage thermique.

On obtient alors des sortes de granulés dont la teneur en eau est inférieure à 5 %. Ce sont des boues séchées.

Deux catégories de boues ont été utilisées pour l'analyse virologique :

- les boues fraîches primaires
- les boues digérées.

I.1.2 - Echantillonnage

Il a été réalisé selon le protocole suivant :

- Pour les boues digérées, après élimination du premier écoulement de boues, à la sortie du digesteur, 25 litres de boues liquides ont été prélevées et amenées immédiatement au laboratoire.
  A partir de l'échantillon homogénéisé par agitation on répartit dans des pots à centrifuger 500 ml de boues par la technique du "pelletage successif" effectué à la louche. Après centrifugation à 1500 g pendant 15 minutes, les culots sont homogénéisés, puis sont préparées des prises d'essai de 40 grammes. Il est par ailleurs déterminé pour chaque

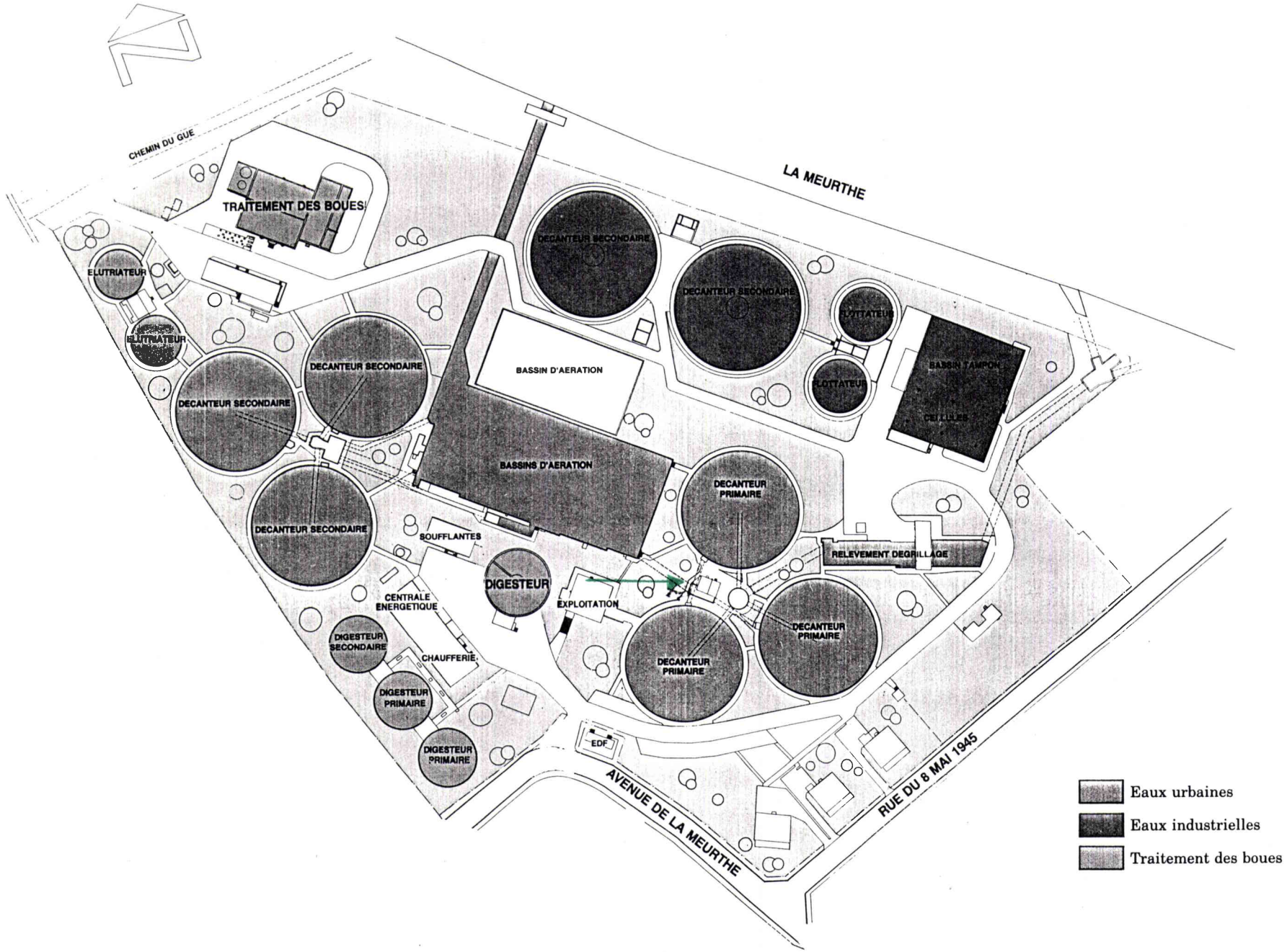


Figure nº 5 - Station d'épuration de NANCY-MAXEVILLE

échantillon le poids humide de culot de centrifugation correspondant à un litre de boues digérées.

- Pour les boues "fraîches primaires" des prélèvements de 5 litres ont été réalisés et ramenés au laboratoire où ils ont été homogénéisés par agitation, 2 litres de boues liquides ont été centrifugés à 1500 g pendant 15 minutes et à partir des culots mélangés et homogénéisés, il a été constitué par la technique du "pelletage successif" des prises d'essai de 40 grammes pour chaque prélèvement.
  Dans chaque échantillon il est systématiquement déterminé le poids humide de culot de centrifugation correspondant à 1 litre de boues "fraîches primaires".
  Le lieu de prélèvement est indiqué sur la Figure n° 5. Il permet un échantillon moyen sur 24 h.

I.1.3 - Caractéristiques des boues étudiées

- **pH**
  Les boues analysées étant à l'état liquide, le pH a été déterminé au pHmètre à partir du liquide surnageant d'une centrifugation de 500 ml de boues à 1500 g pendant 15 minutes

- **Poids sec**
  Pour chaque échantillon une prise d'essai de 100 ml a été placée dans une capsule à 105°C pendant au moins 24 heures et jusqu'à l'obtention d'un poids constant selon la norme expérimentale (NF-U-44-171). Le résultat est exprimé en gramme de poids sec pour 100 ml de boues.

- **Taux de matières organiques**
  La détermination du taux de matières organiques est réalisée à partir de l'échantillon séché à 105°C qui est placé dans un four à moufle à 550°C. La pesée est effectuée jusqu'à l'obtention d'un poids constant.
  La matière organique est assimilée à la matière volatile.
  Le résultat est exprimé en gramme de matières organiques pour 100 ml de boues. (NF-U-44-160).

	BOUES DIGEREES	BOUES FRAICHES PRIMAIRES
pH	7,46 *	6,00 *
Poids sec g/100 ml	4,26 *	5,61 *
Matières organiques g/100 ml	2,17 *	3,11 *

Tableau n° 12 - Caractéristiques physico-chimiques des boues
(* moyenne de 10 mesures)

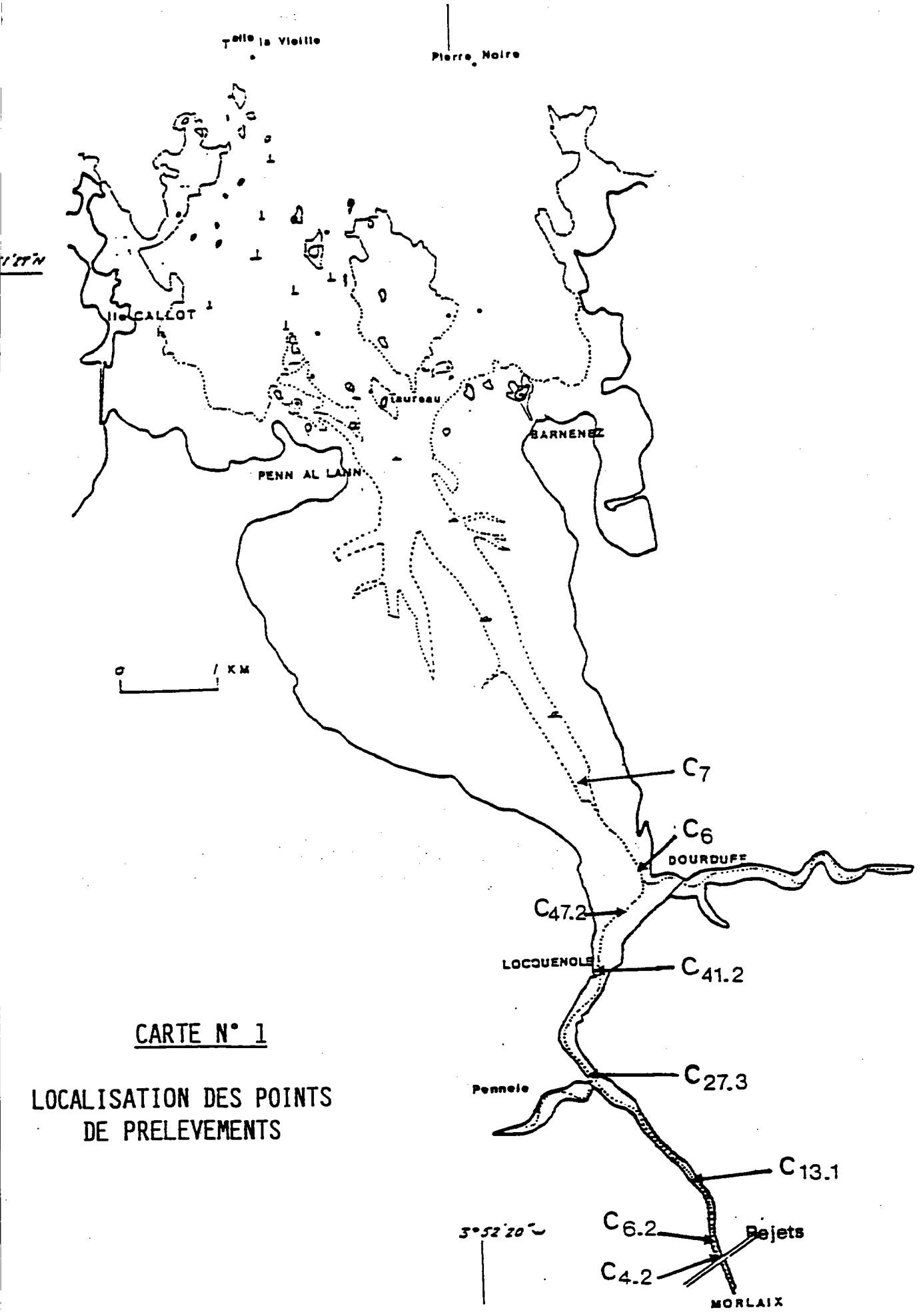
I.2 - LES SEDIMENTS

Au cours d'une étude de la contamination microbiologique des eaux et des sédiments sur le site de MORLAIX, nous avons réalisé des analyses virologiques de sédiments :

Les sédiments ont été prélevés dans la partie amont de la baie de Morlaix (carte n° 1) en huit points différents dont les localisations sont précisées ci-dessous.

- **C4-2**
  à 10 mètres en aval du point de rejet des eaux usées épurées de la station d'épuration de la ville de Morlaix
- **C6-2**
  à 180 mètres en aval du point de rejet des eaux usées épurées
- **C13-1**
  à 925 mètres du rejet d'eaux usées épurées
- **C27-3**
  à l'aval immédiat du confluent de la rivière de Morlaix et de la rivière Pennelé. Ce point est situé à 2500 mètres du rejet
- **C41-2**
  au droit de Locquenolé et à 3900 mètres du point de rejet des eaux usées épurées
- **C47-2**
  en amont de l'embouchure de la rivière Dourduff et à 4600 mètres du rejet des eaux usées épurées

BAIE DE MORLAIX



CARTE N° 1

LOCALISATION DES POINTS DE PRELEVEMENTS

- **C6**

  à l'aval immédiat du confluent avec la rivière Dourduff

- **C7**

  à 1300 mètres en aval du point C6.

L'estuaire de Morlaix se subdivise en 2 unités :

- la rivière de Morlaix
- la baie ou rade prolongeant la rivière jusqu'à la pointe de Penn al Lann.

Deux affluents se jettent dans la rivière : la Pennelé et le Dourduff.

La partie amont de l'estuaire jusqu'au Dourduff est principalement constituée de vases avec des sédiments plus grossiers et plus hétérogènes au fond du chenal. Dans la baie on trouve des vases sableuses avec apparition de sables fins ou moyens.

D'après GUILLAUD (1988), l'étude microgranulométrique des vases a permis de montrer quelles étaient les variations qualitatives de ce comportement sédimentaire qui est important pour la fixation des polluants.

Dans la partie centrale de la rivière de Morlaix (secteur de la Pennelé) on trouve un sédiment vaseux bien mélangé avec 28 à 44 % de particules très fines ($<19\ \mu m$) et 51 à 67 % de particules fines (19 à 77 μm). De part et d'autre de cette zone centrale, les vases sont caractérisées par une proportion plus faible de particules très fines (15 à 26 %) au profit des particules fines (71 à 80 %).

A l'aval du confluent avec le Dourduff, les particules plus grossières ($>77\ \mu m$) commencent à apparaître au détriment des particules très fines ; dans la Baie le taux de particules plus grossières augmente (20 à 33 %) alors que celui des particules fines diminue.

Par ailleurs ces sédiments subissent l'influence marine par le jeu des marées.

L'échantillonnage réalisé par IFREMER-Brest a consisté à prélever dans des bocaux en verre stérile la couche superficielle (sur 1 cm de profondeur) des sédiments à raison d'environ 1 kg par bocal.

Les prélèvements ont été envoyés au laboratoire de virologie de Nancy par avion sous emballage isotherme à +4°C. Ils ont été analysés dès leur arrivée à Nancy soit au plus tard 24 h après l'échantillonnage.

Deux campagnes de prélèvement ont été effectuées :

. La première : le 14 octobre 1987
. La deuxième : le 27 avril 1988.

I.3 - LE VIRUS

Une partie des analyses virologiques a été réalisée sur des boues contaminées artificiellement par du virus poliomyélitique.

I.3.1 - Préparation de la suspension virale

Le virus utilisé est le virus poliomyélitique de type I souche vaccinale Sabin LSc2 ab.

Au début de ce travail la production d'un volume de 80 ml de suspension virale a été obtenue selon le protocole suivant.

Des cellules en lignées établies BGM (BARRON et al.1970) sont cultivées dans une boîte de Roux en milieu MEM complémenté avec 10 % de sérum de veau nouveau né. Lorsque le tapis cellulaire est continu, le milieu de culture est éliminé et les cellules sont ensemencées par inoculation d'1 ml de virus poliomyélitique titrant 10^7 UFP/ml ; 80 ml de milieu MEM additionné de 2 % de sérum de veau nouveau-né sont ajoutés dans la boîte de Roux qui est incubée à 37°C.

Après 48 heures les virus se sont multipliés dans les cellules provoquant la destruction du tapis cellulaire. Le milieu de culture contenant en suspension les cellules détruites est récupéré, puis soumis à 3 congélations-décongélations successives de façon à provoquer l'éclatement des cellules encore intactes et à libérer les virions présents dans le cytoplasme. Ensuite pour éliminer les débris cellulaires, la suspension est centrifugé à 1500 g pendant 15 minutes à +4°C. Le liquide surnageant est immédiatement réparti en flacons stériles sous un volume de 2 ml et conservé à -75°C. Ceci constitue la suspension stock de virus qui sera utilisée pendant l'expérimentation. Le titre sera déterminé sur un échantillon après congélation. (Figure n° 6).

I.3.2 - Titrage de la suspension virale

A chaque expérience un flacon de la suspension stock est décongelé puis dilué dans du milieu MEM 2 % pour être inoculé dans la boue. Un aliquot de cette dilution est systématiquement titré afin de connaître avec précision la quantité de virus introduite dans la boue.

La méthode de titrage utilisée est la méthode des plages sous couverture gélosée sans colorant vital décrite dans le paragraphe II.3.1.

En fonction du titre présumé, 7 dilutions successives seront réalisées et seules les dilutions -3 à -7 seront inoculées sur cellules. Le titre est exprimé en UFP/ml.

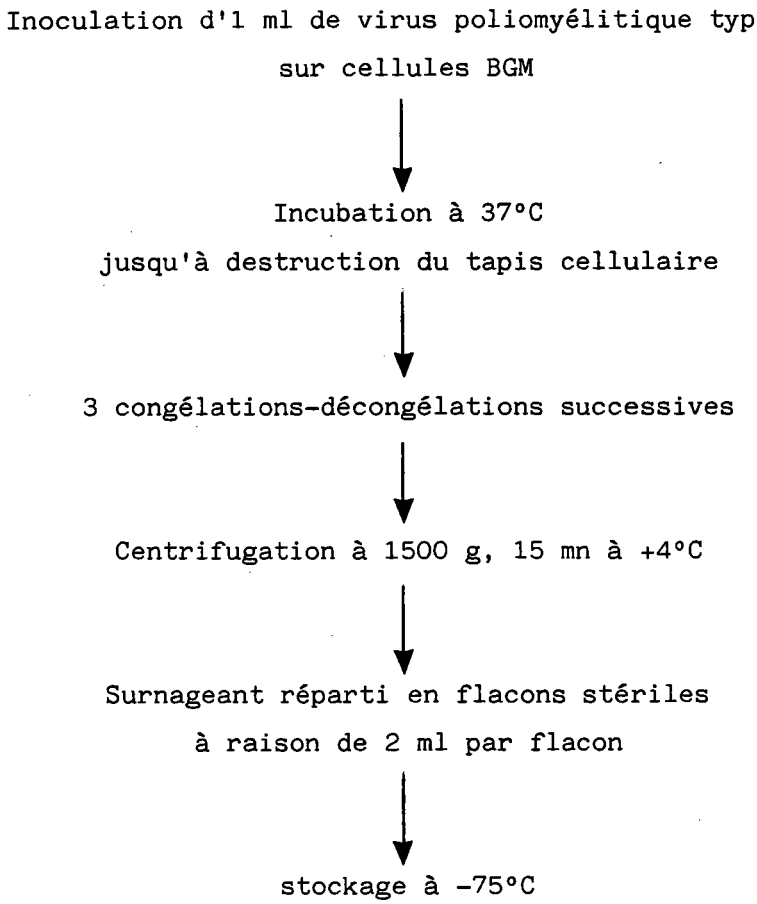


Figure n° 6 - Protocole de préparation de la suspension virale

I.4 - LES SOLUTIONS ELUANTES

Au cours de cette étude plusieurs solutions éluantes sont utilisées, elles varient par la nature de l'éluant (acide aminé ou protéine), par la concentration et par le pH.

- **Solution de dodecyl sulfate de sodium (SDS) (BATES and GODDARD 1980)**
  Le dodecyl sulfate de sodium est mis en solution dans de l'eau distillée à la concentration de 0,1 %.

- **Solutions de glycine**
  3 solutions différentes sont utilisées selon le protocole d'extraction des virus envisagé :

. Tampon glycine 0,05 M

La glycine à la concentration de 0,05 M est dissoute dans de l'eau distillée et la solution est ajustée à pH=9 par addition de soude N.

. Solution glycine-EDTA

La glycine à la concentration de 0,25 M est dissoute dans de l'eau distillée puis additionnée de 0,05 M d'EDTA. Le pH est ensuite ajusté à 11,5.

. Tampon glycine-extrait de boeuf

De l'extrait de boeuf est dissout dans du tampon glycine 0,05 M à raison de 3 %, la solution obtenue est amenée à pH=9.

- **Solution de lait écrémé**

Elle est réalisée en dissolvant 1 % de lait écrémé (OXOID, code L 31) dans du tampon TRIS pH=9.

- **Solution d'extrait de boeuf**

A partir d'extrait de boeuf en poudre (OXOID code L 29) dissout dans de l'eau distillée 3 solutions de concentration et de pH différents sont préparées.

. solution à 3 % d'extrait de boeuf pH=7
. solution à 3 % d'extrait de boeuf pH=9
. solution à 10 % d'extrait de boeuf pH=9

L'ajustement des solutions aux pH choisis est obtenu à l'aide de soude N.

- **Tampon borate 0,01 M à 3 % d'extrait de boeuf pH=9**

A une solution de tampon borate 0,01 M pH=9 on ajoute 3 % d'extrait de boeuf puis on réajuste le pH à 9.

Toutes ces solutions sont stérilisées par passage à l'autoclave 20 mn à 115°C sauf la solution de lait écrémé qui est autoclavée seulement 10 mn à 108°C.

I.5 - LES CULTURES CELLULAIRES

Etant donné le type de virus que nous recherchons dans les boues (entérovirus), il a été décidé d'utiliser les cultures cellulaires pour la mise en évidence des virus.

Les cellules utilisées proviennent de lignées cellulaires établies qui peuvent être théoriquement entretenues et subcultivées à 37°C indéfiniment.

Deux lignées cellulaires différentes seront utilisées lors de ce travail :

- **Les cellules BGM : Buffalo Green Monkey** (BARRON et al. 1970)
  ce sont des cellules en lignées établies d'origine simienne, de rein de Cercopithecus aethiops.

- **Les cellules MA 104** (Microbiological Associate)
  ce sont des cellules en lignées établies qui proviennent de rein de singe embryonnaire "Rhésus" africain.

I.5.1 - Entretien des cellules

Les cellules sont cultivées dans du milieu constitué par le Minimum Essential Medium (MEM) de EAGLE (composition en annexe), additionné d'antibiotiques et de sérum de veau nouveau-né décomplémenté 30 mn à 56°C, à raison de 10 % pour le milieu de croissance et 2 % pour le milieu de survie, le pH est ajusté à 7,2.

Ces milieux sont stérilisés par filtration sur filtres Millipore (préfiltre AP25 12450-filtre 1,2 µm RAWP 14250-filtre 0,45 µm HAWP 14250-filtre 0,22 µm GSWP 14250).

Pour la production de cellules, une suspension de cellules en milieu MEM 10 % est introduite dans des boîtes de Roux de surface 170 cm^2 Pendant l'incubation à 37°C les cellules se fixent sur le support et se développent jusqu'à l'obtention d'un tapis cellulaire continu, qui est utilisé pour réaliser des subcultures par trypsination.

I.5.2. - Trypsination des cellules

Après observation de l'état continu d'un tapis cellulaire, le milieu de culture est éliminé et remplacé par une solution de lavage (composition en annexe).

Après quelques minutes de contact à 37° celle-ci est remplacée par une solution de trypsine-versène (composition en annexe) qui dissocie le tapis cellulaire. Dès que le tapis cellulaire commence à se dissocier les cellules sont remises en suspension dans du milieu de croissance. Il est alors procédé à la détermination de la densité cellulaire par numération à la cellule de Nageotte. En fonction des besoins et de sa densité cellulaire, la suspension sera distribuée dans différents supports. (Figure n° 7).

Pour l'isolement et la quantification des virus la suspension de cellules BGM en milieu MEM 10 % de sérum de veau nouveau-né a été répartie dans des boîtes de pétri (Falcon ou Nunclon) de diamètre 55 mm à raison de 1,5 10^6 cellules pour 7 ml, ce qui permet d'obtenir un tapis de 28 cm2 en 3-4 jours d'incubation à 37°C.

Avec les cellules MA 104 des boîtes de pétri de diamètre 100 mm ont été utilisées à raison de 7.10^5 cellules pour 20 ml de milieu. Le milieu nutritif utilisé pour les cellules MA 104 est supplémenté avec du sérum de veau foetal (SVF) à raison de 10 % pour la croissance et 5 % pour la survie.

Après incubation à 37°C en atmosphère enrichie avec 5 % de CO2 (SHIPMAN 1973) pendant 4 jours, le milieu est remplacé par 20 ml de MEM 5 % SVF et on obtient un tapis continu (78,5 cm2) prêt à être inoculé au bout de 7 jours.

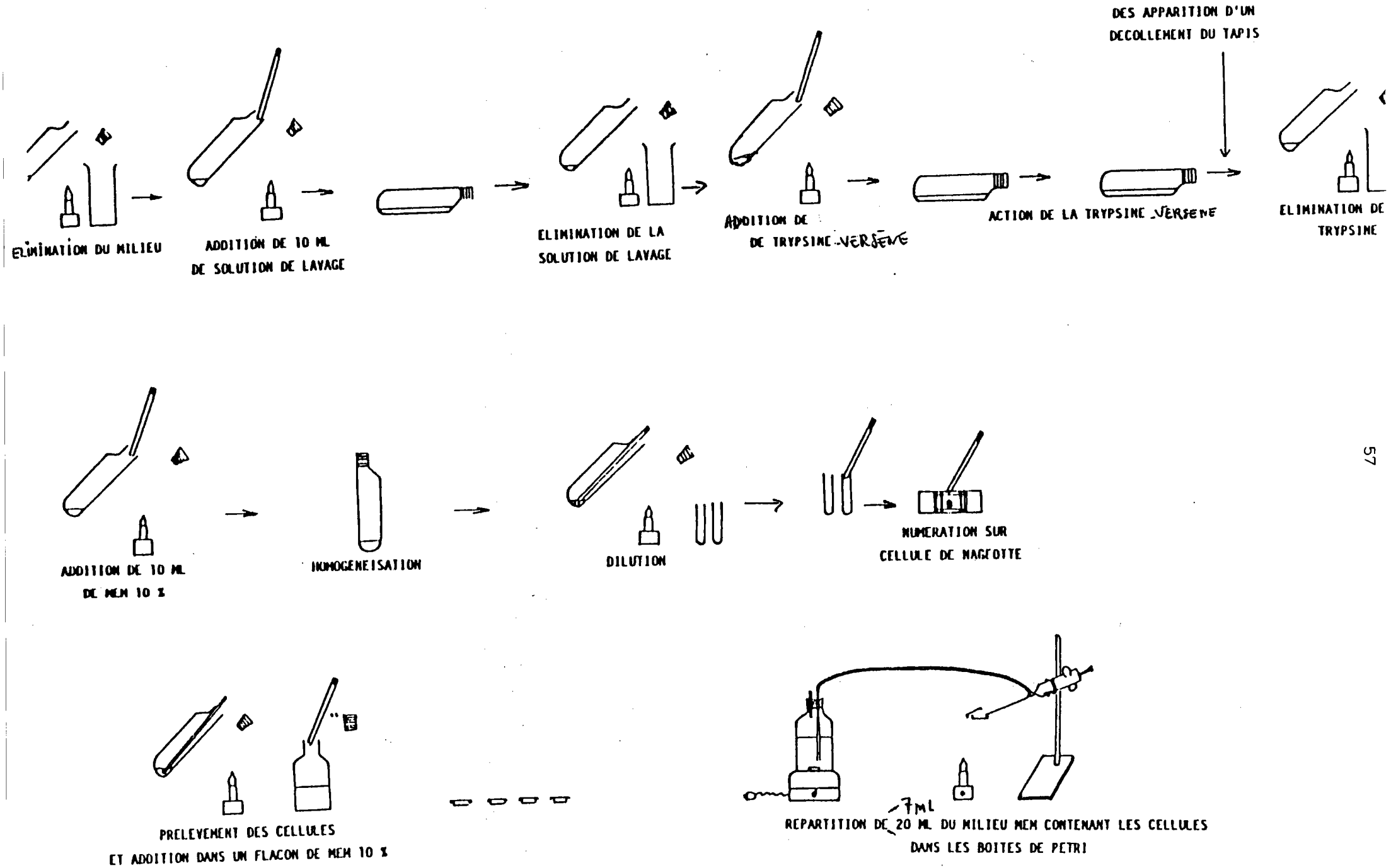


Figure n° 7 - Subculture des cellules par trypsination

II - METHODES

II.1 - METHODES D'EXTRACTION ET DE CONCENTRATION DES VIRUS

II.1.1 - Elution par agitation

L'élution des virus est réalisée par agitation de l'échantillon à tester en présence d'une solution éluante. Cette homogénéisation peut être réalisée par différents procédés. Au cours des expérimentations plusieurs modes d'agitation sont utilisés :

- l'agitation dans un appareil de type Waring-Blendor ou mixage pendant 3 minutes à la vitesse maximum

- L'utilisation d'un agitateur magnétique pendant 15 minutes (MERCK LMC télémodule 20 P) pendant 15 minutes à 350 t/mn.

- L'homogénéisation dans un appareil VIRTIS modèle 23 à la graduation 40 (bol de 150 ml).

II.1.2 - Elution par sonication

Certains échantillons sont soumis après homogénéisation dans l'éluant à l'action des ultrasons. La sonication est réalisée par immersion d'une sonotrode dans l'échantillon maintenu dans un bain de glace pendant 2 minutes à une puissance de 100 W.

Les solutions obtenues après élution et agitation ou sonication doivent être concentrées car leur volume est trop important pour être soumis directement à l'analyse virologique.

II.1.3 - Concentration des éluats

Deux protocoles différents sont utilisés.

II.1.3.1 - Techniques par floculation organique

La technique utilisée est celle préconisée par KATZENELSON et al. (1976). Elle est basée sur le fait que les protéines en solution peuvent floculer à pH acide, inférieur à leur point isoélectrique. Au cours de la floculation les virus présents dans l'échantillon sont adsorbés. Il suffit de récupérer le précipité obtenu et de le dissoudre dans un faible volume de solution tampon pour obtenir une solution virale concentrée.

La floculation est réalisée à pH=4,5 pour le lait écrémé 1%, et à pH = 3,5 pour les éluants constitués d'extrait de boeuf. A noter qu'il est nécessaire d'ajouter de l'extrait de boeuf qsp 3 % pour obtenir une précipitation avec l'éluant glycine.

L'éluant est acidifié par HCl 2N sous agitation magnétique: après 30 minutes d'agitation, une centrifugation à 1500 g permet de récupérer le floc qui contient les virus. Celui-ci est dissous dans environ 30 ml d'une solution stérile de tampon phosphate Na_2HPO_4 0,15 M pH=7,2 .

La solution obtenue constitue le concentrat viral, qui sera testé sur cultures cellulaires.

II.1.3.2 - Technique au polyéthylène glycol 6000

Le protocole est basé sur 2 précipitations successives par le polyéthylène glycol 6000 (PEG 6000 MERCK) (LEWIS and METCALF 1988)

L'éluat est additionné de 50 ml d'une solution de PEG à 50 % (composition en annexe) dans un pot à centrifuger de 250 ml.

Après incubation d'une nuit à + 4°C, une centrifugation de 90 mn à 10 000 g à + 4°C permet de récupérer le culot. Celui-ci est remis en suspension dans 40 ml de tampon borate - 3 % d'extrait de boeuf pH=9. Pour bien homogénéiser et dissoudre ce culot une agitation magnétique pendant 10 mn est nécessaire. Cette suspension est ensuite clarifiée par une centrifugation de 30 mn à + 4°C à 10 000 g. (Figure n° 8).

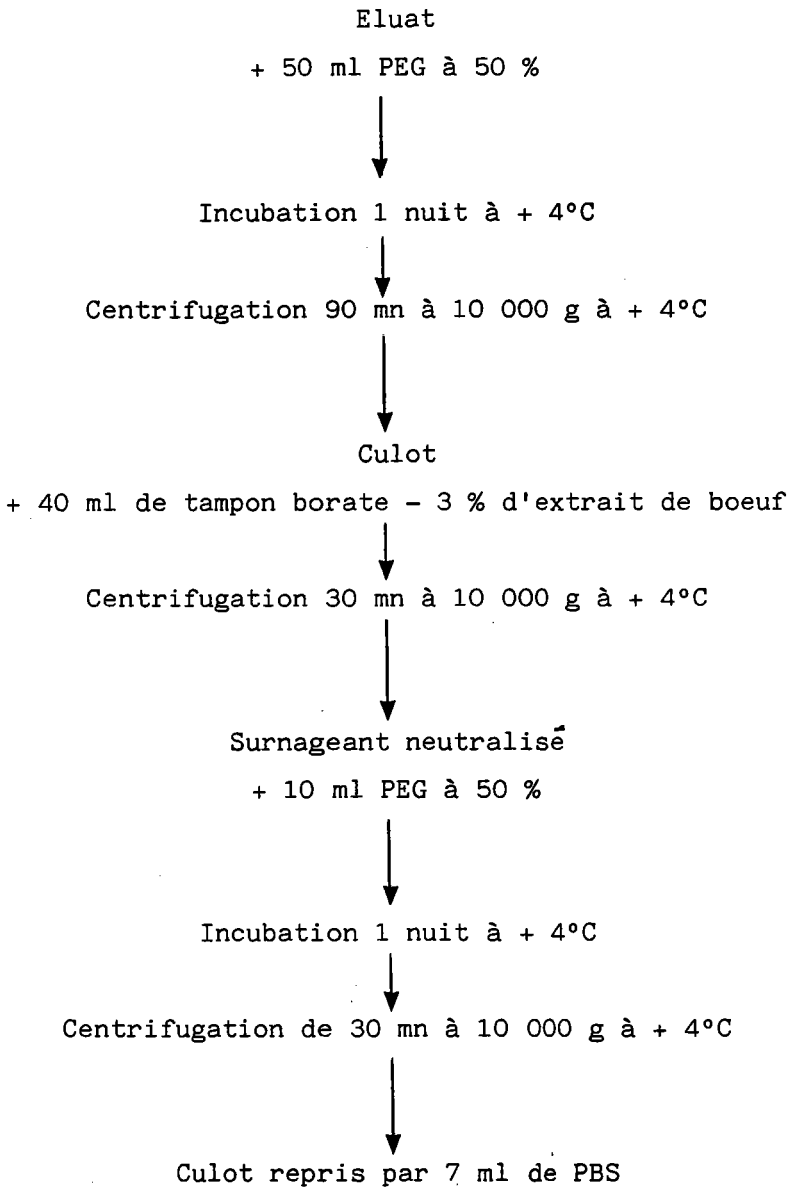


Figure n° 8 - Protocole de concentration par le PEG

Le surnageant, neutralisé à pH=7,2 est de nouveau additionné de 10 ml de PEG à 50 % puis incubé 1 nuit à + 4°C. Après une centrifugation de 30 mn à + 4°C et à 10 000 g le culot est remis en suspension dans 7 ml de tampon PBS pH=7,2; l'échantillon obtenu peut alors être inoculé sur cultures cellulaires après décontamination par addition d'antibiotiques et d'antifongiques.

II.1.4 - Méthode d'extraction-concentration de l'EPA (1984)

La méthode comprend 2 étapes, une étape d'extraction suivie d'une phase de concentration résumées dans la figure n° 9.

II.1.4.1 - Extraction

100 ml de boues sont additionnés de $AlCl_3$ (jusqu'à une concentration finale de 0,0005 M) puis ajustés à pH 3,5 avec de l'acide chlorhydrique 5 N. Après une agitation magnétique vigoureuse pendant 30 minutes la boue est centrifugée à 2500 g pendant 15 minutes et le surnageant est éliminé.

Le culot est mélangé avec 100 ml de solution d'extrait de boeuf à 10 % pH 7 et soumis à une agitation magnétique de 30 minutes de façon à éluer les virus.

La suspension est centrifugée à 10 000 g pendant 30 minutes et le surnageant est filtré sur un ensemble de 3 filtres de porosité respective de 3 µm, 0,45 µ et 0,22 µm, ce qui permet d'obtenir l'éluat filtré.

II.1.4.2 - Concentration

L'éluat filtré est additionné d'eau distillée désionisée de façon à réduire le pourcentage d'extrait de boeuf de 10 % à 3 % puis la concentration est mise en oeuvre selon la technique de KATZENELSON et al. (1976).

La solution obtenue est ajustée à pH 3,5 avec de l'acide chlorhydrique N sous agitation magnétique pendant 30 minutes.

Le floc formé est récupéré par centrifugation à 2500 g pendant 5 minutes à +4°C, puis dissous dans une solution de Na_2HPO_4 0,15 M.

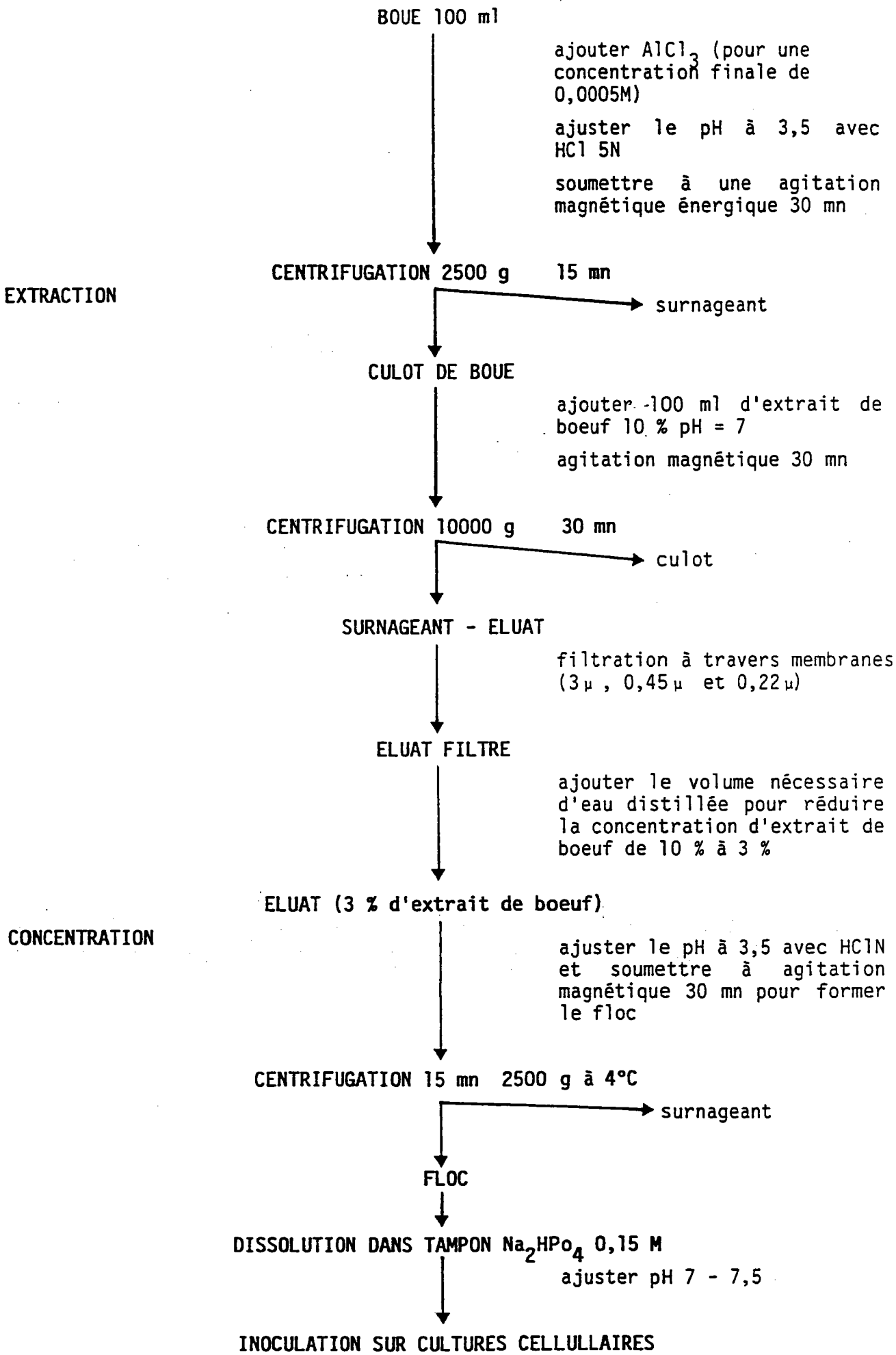


Figure n° 9 - Technique d'extraction-concentration selon E.P.A.

II.1.5 - Méthode d'extraction-concentration indirecte

Cette méthode comporte une élution des particules virales par une solution glycine - EDTA pH = 11,5, puis l'éluant est mélangé à de l'eau de mer. Ce mélange est ensuite soumis à une concentration par adsorption-élution sur poudre de verre (BLOCK and SCHWARTZBROD 1989).

En pratique 300 grammes de sédiments sont mélangés avec 900 ml de tampon glycine 0,25 M pH 11,5 additionné de 0,05 M d'EDTA. La suspension obtenue est soumise à une agitation mécanique pendant 10 minutes, puis centrifugée à 1500 g pendant 5 minutes. Le surnageant est neutralisé, additionné de $AlCl_3$ 0,05 M de façon à obtenir une concentration finale de $5,10^{-4}$ M puis mélangé à 10 litres d'eau de mer. La concentration virale s'effectue ensuite selon la technique d'adsorption-élution sur poudre de verre classiquement utilisée pour la recherche des virus dans les eaux. Elle consiste dans un premier temps à fixer à pH 3,5 les particules virales chargées positivement sur de la poudre de verre chargée négativement et maintenue en suspension sous forme d'un filtre dynamique. Dans un deuxième temps, les virus fixés sur la poudre de verre sont élués par passage de tampon glycine - 3 % d'extrait de boeuf pH 9. Les 30 à 50 ml d'éluat recueillis sont neutralisés et constituent le concentrat viral. La figure n° 16 résume les étapes de cette méthode.

II.2 - DECONTAMINATION DES ELUATS ET CONCENTRATS

Les concentrats obtenus à l'issue des opérations d'extraction des virus contiennent des quantités importantes de bactéries et de fungi qui doivent être inactivés avant inoculation sur cultures cellulaires. La décontamination s'effectue en 2 temps associant un traitement par le chloroforme (BURAS 1974) et l'addition d'antibiotique (BLOCK and SCHWARTZBROD 1989).

II.2.1 - Traitement par le Chloroforme

Le chloroforme est capable de provoquer la destruction des organismes contenant des lipides, tels que les bactéries et les fungi, en revanche il est sans effet sur les virus nus tels que les entérovirus.

L'échantillon à décontaminer est additionné de 30 % (V/V) de chloroforme, puis soumis à une agitation violente pendant 30 minutes de façon à obtenir une émulsion très fine qui permette le contact intime entre le chloroforme et les composants de la phase aqueuse.

Après décantation à +4°C la phase chloroformique est soigneusement éliminée à la pipette, puis toute trace de chloroforme est éliminée par barbotage prolongé sous hotte aspirante d'un courant d'air stérile dans le concentrat.

II.2.2 - Traitement par les antibiotiques et les antifongiques

Le traitement par le chloroforme est souvent insuffisant pour éliminer toutes les bactéries et fungi, c'est pourquoi la décontamination est poursuivie et achevée par addition d'une solution d'antibiotiques et d'antifongiques (composition en annexe) à raison de 0,1 ml par ml d'éluat. De façon à obtenir une action efficace, l'échantillon ainsi traité est incubé pendant 2 heures à 37°C avant d'être inoculé sur cultures cellulaires.

II.3 - ISOLEMENT ET QUANTIFICATION DES VIRUS

Que ce soit pour la mise en évidence des virus poliomyélitiques ajoutés aux échantillons ou pour la détection des virus indigènes, la méthode des plages sous couverture gélosée a été utilisée. Cette méthode est fondée sur le fait que certains virus provoquent un effet cytopathique se traduisant par l'apparition de plages de lyse sur tapis cellulaire constitué.

Les virus se multiplient à l'intérieur des cellules et les détruisent, le milieu gélosé qui recouvre le tapis cellulaire empêche la dispersion des virions néoformés et ceux-ci infectent uniquement les cellules adjacentes à celle qui leur a donné naissance, la multiplication d'une particule virale se traduit donc par l'apparition d'une seule plage de lyse cellulaire circulaire incolore, visible à l'oeil nu.

La révélation des plages s'effectue :

- soit par incorporation d'un colorant vital, comme le rouge neutre, au milieu gélosé. Cette technique en présence de colorant vital est employée avec les cellules MA 104
- soit, après la période d'incubation choisie et après fixation des cellules sur le support, par addition d'un colorant comme le cristal violet qui pénètre dans les cellules non lysées.
  Cette technique en l'absence de colorant vital est utilisée avec les cellules BGM.

Une méthode de quantification de type énumératif est utilisée.

II.3.1 - Méthode des plages en l'absence de colorant vital

II.3.1.1. - Ensemencement

Les échantillons à tester sont dilués dans du milieu de survie (MEM 2% de sérum de veau nouveau-né).

Les tapis cellulaires sélectionnés sont débarassés de leur milieu nutritif et sont inoculées à raison de 1 ml de dilution par boîte de pétri (diamètre = 55 mm) et de 3 boîtes par dilution.

Après contact de 2 h à 37°C en atmosphère enrichie en CO_2 l'inoculum est éliminé et le tapis cellulaire rincé avec une solution de PBS préchauffée à 37°C.

Après élimination du PBS par aspiration, le tapis cellulaire est recouvert avec 7 ml de milieu gélosé (composition en annexe) maintenu à 45°C.

Après solidification de la gélose à température ambiante, les boîtes sont incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère enrichie de 5 % de CO_2.

Des boîtes de pétri de cultures cellulaires témoin non inoculées sont préparées conjointement.

II.3.1.2 - Révélation des plages de lyse

Après 3 jours d'incubation les tapis cellulaires sont fixés par addition de 3 ml d'acide trichloracétique à 10%. Après 20 minutes de contact la couche gélosée est éliminée à l'aide d'un scalpel et les cellules sont colorées par ajout d'1 à 2 ml d'une solution de cristal violet à 1,5 g /l.

Après contact de 10 minutes, les tapis cellulaires sont lavés à l'eau courante et les boîtes de pétri sont égouttées sur papier adsorbant et séchées à l'air libre. Le tapis intact apparaît uniformément coloré en violet, les plages de lyse étant incolores.

Les boîtes témoins doivent être totalement colorées en violet. Sur chaque boîte de pétri les plages de lyse sont dénombrées. Chaque plage de lyse correspondant à une particule virale, constitue une unité formant plage ou UFP.

Les résultats sont exprimés en UFP par millilitre puis par gramme d'échantillon en tenant compte de la dilution et du volume inoculé.

II.3.2 - Méthode des plages en présence de colorant vital

II.3.2.1 - Inoculation

Après avoir préparé les dilutions nécessaires des échantillons dans le milieu de survie , les boîtes de pétri (ϕ 100 mm) présentant un tapis cellulaire continu sont vidées de leur milieu de culture et inoculées à raison de 3 ml par boîte. Selon les expériences 5 ou 10 boîtes sont utilisées par dilution.

Après une incubation de 2 h à 37°C en atmosphère enrichie en CO_2 l'inoculum est éliminé et le tapis est lavé avec 4 ml d'une solution de PBS préchauffée à 37°C.

Après élimination du liquide de rinçage, le tapis cellulaire est recouvert d'une première couche de milieu nutritif gélosé (composition en annexe) à raison de 10 ml par boîte.

Après solidification, il est ajouté une deuxième couche de 10 ml de milieu gélosé auquel a été ajouté le colorant vital, c'est-à-dire une solution de rouge neutre à 0,1 % .

Lorsque la gélose est solidifiée, les boîtes sont incubées à 37°C en atmosphère enrichie en CO_2.

II.3.2.2. - Lecture

Les cellules intactes apparaissent colorées en rouge pâle, alors que la multiplication d'une particule virale se traduit par l'apparition d'une plage de lyse cellulaire non colorée. Les boîtes sont observées chaque jour pendant 12 jours, de façon à noter l'apparition des plages de lyse et leur évolution.

Les cultures témoins doivent présenter pendant cette période un tapis homogène coloré en rouge pâle.

La quantification est réalisée en déterminant le nombre de plages évolutives sur chaque boîte de pétri. Les résultats sont exprimés en UFP par ml ou par gramme d'échantillon, en tenant compte du volume et de la dilution inoculée.

II.4 - MISE EN EVIDENCE DU VIRUS DE L'HEPATITE A

II.4.1 - Principe

La détection du virus de l'hépatite A est réalisé à l'aide d'une méthode radioimmunologique (PURCELL et al. 1976) de type sandwich dans laquelle l'antigène viral après fixation sur les anticorps est mis en évidence par des anticorps radiomarqués.

La méthode utilise au moins deux sites de l'antigène à doser

et l'antigène est pris en sandwich entre deux anticorps dont l'un est marqué à l'iode 125.

Le premier anticorps non marqué est fixé sur un support solide (la paroi d'une cupule en polyvinyl souple), l'échantillon à tester est déposé, puis l'anticorps marqué est déposé à son tour. Le taux d'anticorps marqué et fixé à l'antigène est proportionnel à la quantité d'antigène présente dans l'échantillon (Figure n° 10).

La méthode prend le nom de S.P.R.I.A. : Solid Phase Radio Immuno Assay.

La positivité du test de détection doit être vérifiée par la mise en oeuvre d'un test de confirmation. Celui-ci est fondé sur une technique radioimmunologique par compétition (FLEHMIG 1980). Dans un premier temps, l'échantillon est mis en présence d'anticorps anti- VHA fixés dans deux cupules puis sont ajoutés dans une cupule un mélange d'anticorps anti -VHA marqués et d'anticorps anti-VHA d'un sérum positif et dans l'autre cupule un mélange d'anticoprs anti- VHA marqués et de sérum négatif.

Dans la première cupule il y a compétition entre les anticorps marqués et les anticorps non marqués pour la fixation sur le VHA déjà fixé. Dans la deuxième cupule il n'y a pas de compétition. Dans ces conditions si l'antigène de l'hépatite A est effectivement présent dans l'échantillon on observe une radioactivité plus faible dans la première cupule. (Figure n° 11).

II.4.2 - Protocole expérimental

II.4.2.1 - Test de détection

La détection de l'antigène du VHA comporte les étapes suivantes (PASSAGOT 1988) :

- 100 µl d'un sérum de titre anti VHA voisin de 200 UI/ml dilué au 1/200 dans du PBS sont déposés dans chaque cupule d'une plaque de

microtitration en polyvinyl souple. Après 48 H à + 4°C en atmosphère humide, la plaque est lavée 2 fois avec une solution de lavage à 0,15 M de chlorure de sodium et 0,5 % Tween 20, puis 5 fois avec de l'eau distillée. Cette phase correspond à la fixation des anticorps anti-VHA sur les parois des cupules.

- 50 µl de chaque échantillon sont déposés par cupule et la plaque est incubée en chambre humide deux heures à + 45 °C, puis une heure à + 4°C. La plaque est alors lavée comme précédemment. Au cours de cette étape les antigènes du VHA éventuellement présents se sont combinés avec les anticorps.

- 50 µl d'IgG anti-VHA marquées à l'iode 125 (150 000 cpm) sont déposés et la plaque est incubée une nuit à température ambiante. La plaque est lavée comme précédemment puis découpée et la radioactivité fixée sur chaque cupule est mesurée directement à l'aide d'un compteur gamma (PACKARD).

Le rapport P/N entre le nombre de cpm de l'échantillon étudié (P) et celui de témoins négatifs (N) doit être supérieur ou égal à 2,1 pour pouvoir conclure à la présence de VHA.

II.4.2.2 - Test de confirmation

Les échantillons positifs au test de détection sont dans un deuxième temps soumis au test de confirmation pour apprécier la spécificité du dosage. Le protocole utilisé est le suivant (PASSAGOT et al. 1985).

- Les anticorps anti-VHA sont fixés dans les cupules selon la même méthode que celle utilisée dans le test de détection.

- 50 µl d'échantillon à étudier sont déposés dans deux cupules. Après incubation (2 H à + 45°C puis 1 H à + 4°C) qui permet la fixation de l'antigène, les lavages sont effectués comme précédemment.

- 50 µl d'un mélange d'IgG anti VHA marqués à l'iode 125 et d'un sérum contenant des anticorps anti-VHA (sérum positif : SP) sont déposés dans une des deux cupules alors que l'autre cupule reçoit 50 µl d'un mélange d'IgG anti-VHA marqué à l'iode 125 et d'un sérum ne contenant pas d'anticorps anti-VHA (sérum négatif : SN). Les sérums de référence utilisés sont soit des sérums de chimpanzé (N.I.A.I.D. Bethesda, MARYLAND) correspondant au sérum avant et après infection expérimentale par le VHA, soit des sérums de malade avant et après la maladie.

Après incubation une nuit et lavages, la radioactivité est mesurée sur les deux cupules ; on recherche une diminution de la radioactivité dans le puits contenant le sérum positif par rapport au puits contenant le sérum négatif.

Le rapport des cpm obtenus $\frac{SN}{SP}$ doit être supérieur à 2,1 pour confirmer la présence de VHA.

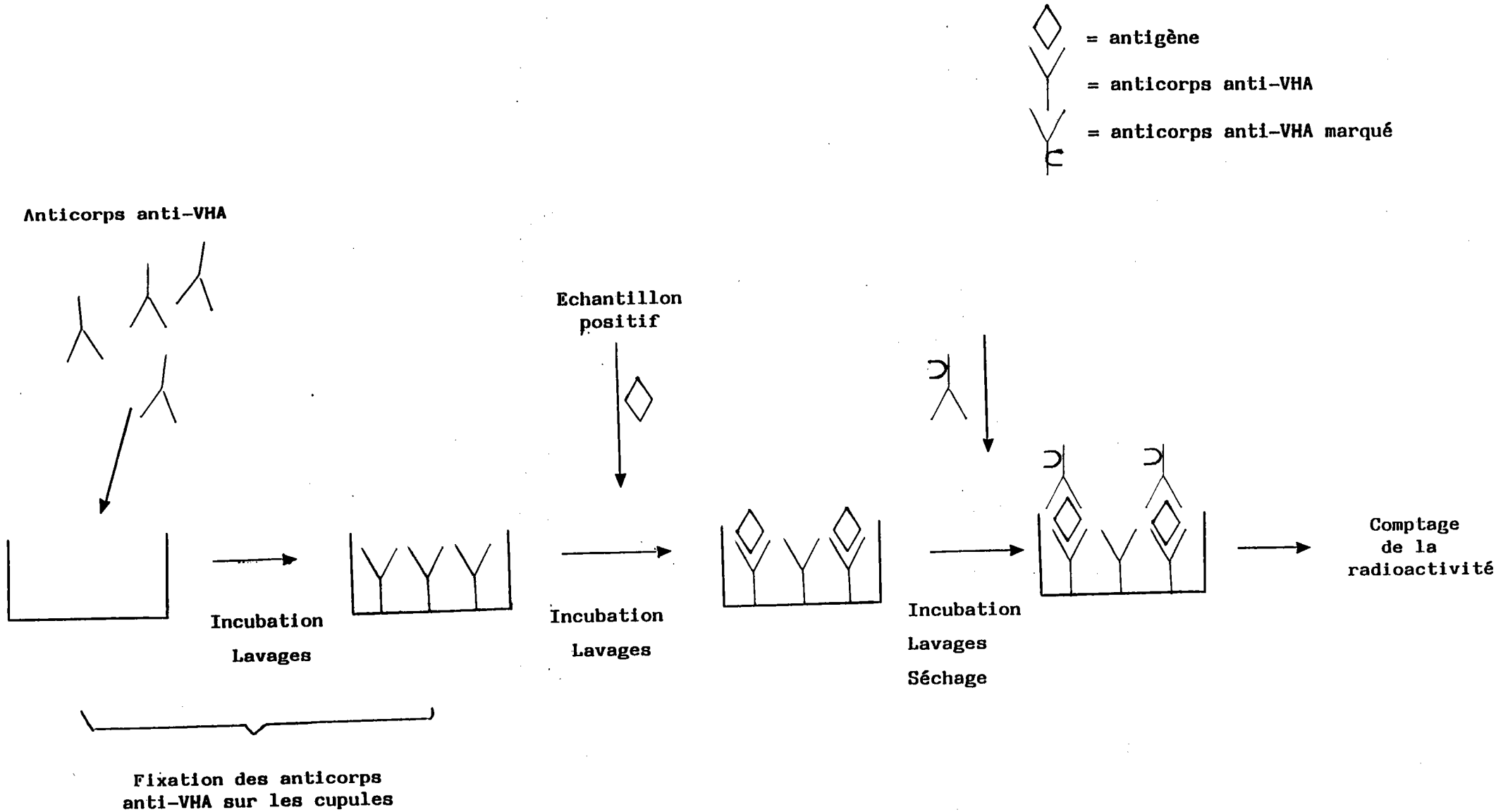


Figure n° 10 - Principe du test de détection de l'antigène du VHA (d'après PONS 1987)

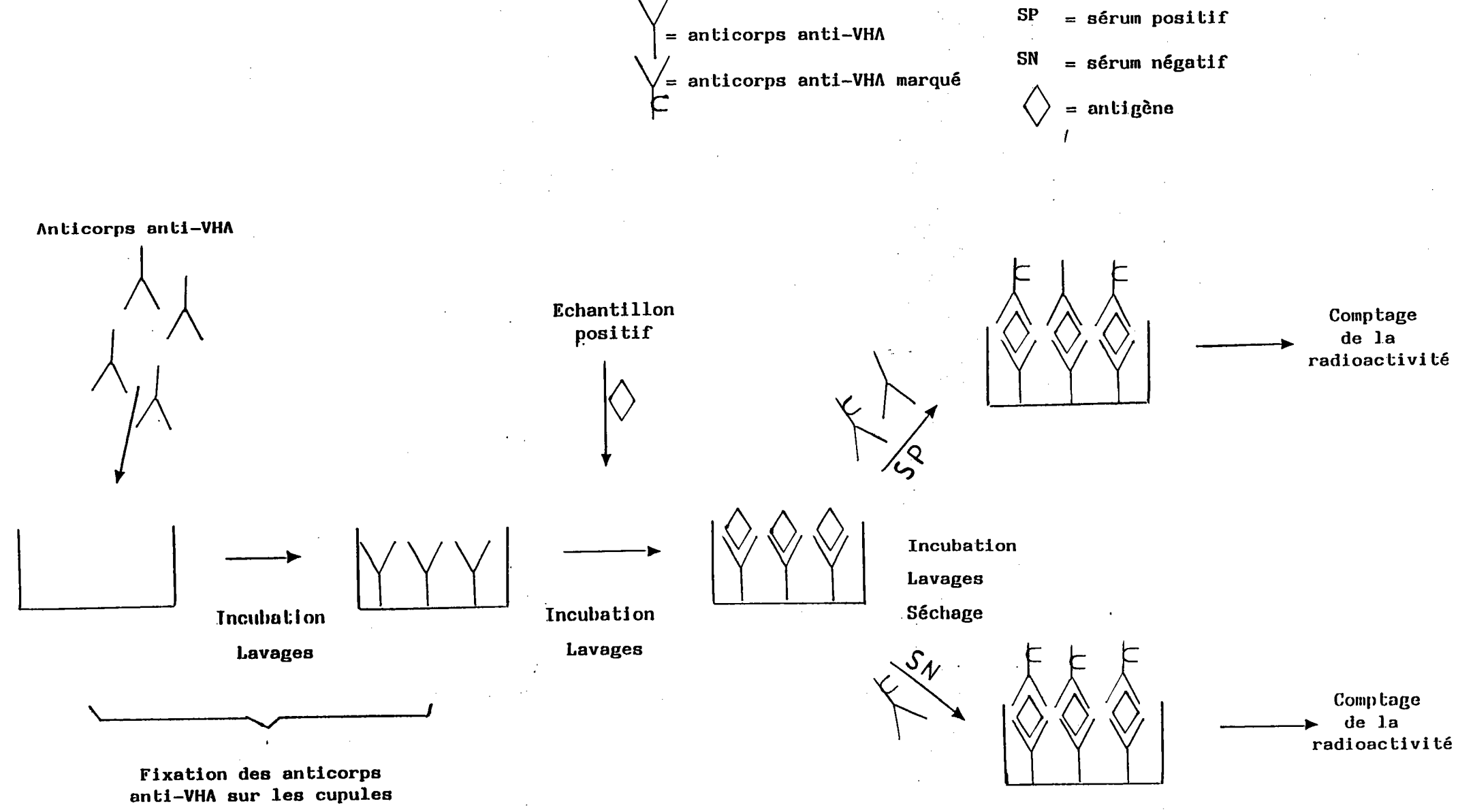


Figure n° 11 - Principe du test de confirmation de l'antigène du VHA (d'après PONS 1987)

C H A P I T R E IV

ETUDE DE L'EXTRACTION DES VIRUS A PARTIR DES BOUES ARTIFICIELLEMENT CONTAMINEES

Cette étude a été réalisée uniquement à partir de boues fraîches primaires provenant de la station d'épuration de Nancy qui ont été artificiellement contaminées par du virus poliomyélitique type 1.

I - PROTOCOLE DE CONTAMINATION DES BOUES

A partir de la solution stock de virus poliomyélitique produit en début d'expérimentation et conservée à -75°C, il est préparé une dilution, de titre variable selon les expérimentations, qui est utilisée pour contaminer 500 ml de boues fraîches primaires. Un aliquot de la dilution est prélevé pour être titré de façon à déterminer précisément la quantité de virus introduite dans l'échantillon de boues.

La boue additionnée du virus est alors soumise à une agitation violente de 1 heure à +4°C sur un agitateur à mouvement va et vient (New Brunswick Scientific modèle R2). Cette agitation a pour but d'obtenir d'une part une bonne homogénéisation du virus dans la boue liquide, d'autre part l'adsorption des virions sur les particules constitutives de la boue (figure n° 12).

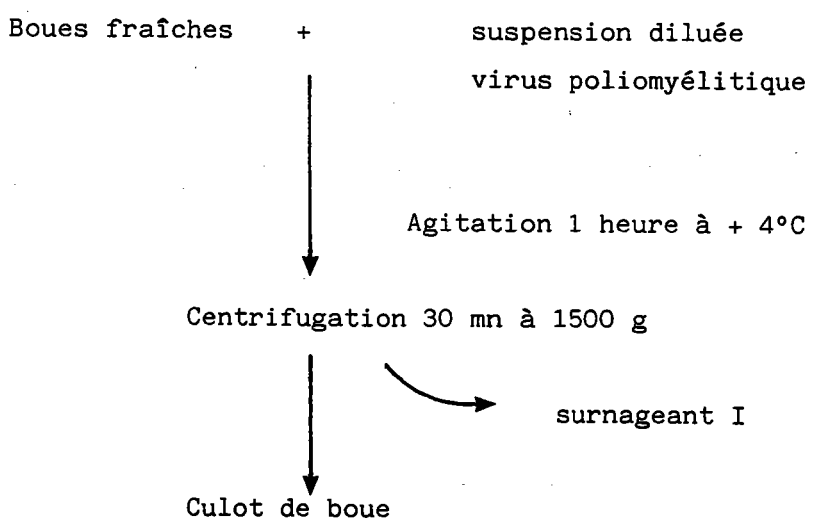


Figure n°12 - Protocole de contamination des boues

L'échantillon de boue homogénéisé est ensuite soumis à une centrifugation à 1500 g pendant 30 mn. Le surnageant (surnageant I) est recueilli, neutralisé à pH=7 et titré de façon à déterminer la quantité de virus non fixée sur la boue.

Le culot de centrifugation est recueilli et homogénéisé. Il est ensuite pesé.

II - METHODE D'EXTRACTION DES VIRUS

A partir du culot de boues sont constitués des sous-échantillons de 10 grammes à partir desquels sont testées les différentes techniques d'élution. Le protocole général consiste à homogénéiser les 10 grammes de boues dans 50 ml de la solution éluante (Figure n° 13). Deux techniques d'homogénéisation ont été testées :

- d'une part un mixage dans un appareil de type Waring-Blendor pendant 3 minutes suivie d'une sonication

- d'autre part une agitation dans un appareil VIRTIS (modèle 23)

A l'issue de l'homogénéisation les échantillons sont systématiquement soumis à une centrifugation à 1500 g pendant 15 mn. Seul le surnageant (surnageant II) est recueilli et immédiatement amené à pH 7. Il constitue l'éluat viral qui sera titré de manière à déterminer la quantité de virus effectivement extraite de l'échantillon de boue. Les résultats seront exprimés en UFP et ramenés au culot de boue obtenu avec 500 ml de boue de départ.

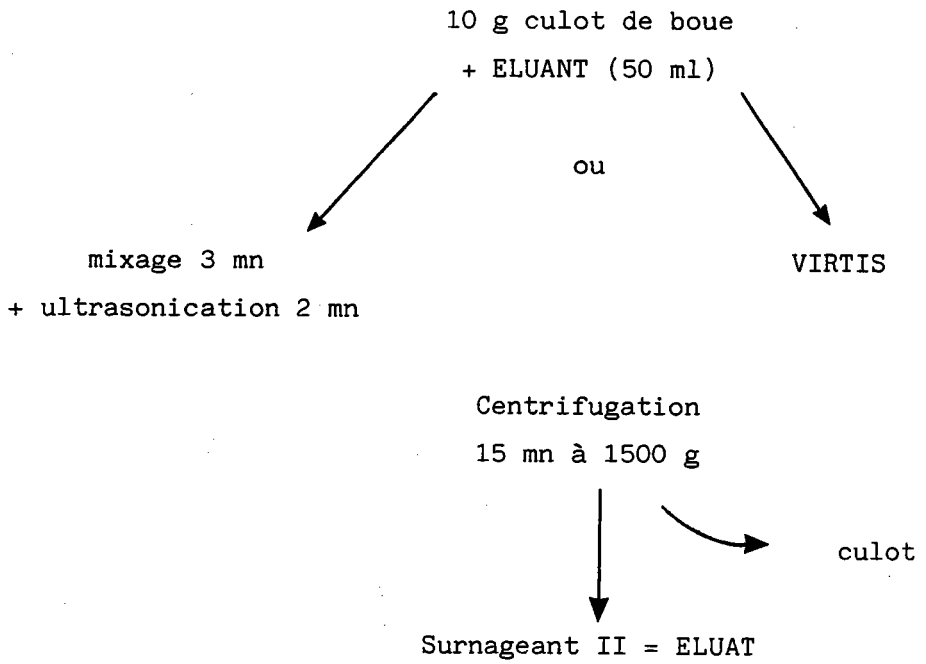


Figure n° 13 - Protocole d'extraction des virus

III - RESULTATS

Les résultats des expérimentations réalisées sont analysés :

- d'abord en déterminant le taux de fixation des virus sur la boue
- ensuite sur le plan de l'élution en étudiant l'efficacité des éluants et les techniques d'élution.

III.1 - Adsorption des virus sur la boue

A chaque expérimentation, le taux de fixation des virus sur la boue a été calculé en titrant d'une part la suspension virale inoculée et d'autre part le surnageant I (Figure n° 12) issu de la centrifugation du mélange boue-virus. On constate qu'après 1 heure de contact, l'adsorption est massive et que la majorité des virus se fixe effectivement sur les particules solides constitutives de la boue. En effet les pourcentages de virus fixés varient de 96,9 % à 99,99 % avec une majorité supérieure à

99 % (tableau n° 13). Cette constatation rejoint celle faite par différents auteurs (BITTON 1975, WULLENWEBER and JORET 1983) et confirme qu'il n'existe pratiquement pas de particules virales libres dans ce milieu (dans 7 cas sur 10, le pourcentage de virus non fixés est < 1 %) et que les virus sont effectivement adsorbés sur la boue (GERBA et al 1978, BLOCK et al 1978).

QUANTITE DE VIRUS INTRODUIT DANS 500 ML DE BOUE	QUANTITE DE VIRUS RETROUVES DANS LE SURNAGEANT I	POURCENTAGE DE VIRUS FIXES SUR LE CULOT DE BOUE
$1,96.10^7$	$4,89.10^4$	99,75 %
$2,10.10^7$	$4,74.10^4$	99,78 %
$6,50.10^7$	$3,35.10^3$	99,99 %
$2,03.10^7$	$2,94.10^3$	99,99 %
$1,83.10^7$	$5,05.10^4$	97,24 %
$1,56.10^7$	$4,84.10^5$	96,90 %
$1,66.10^7$	$2,94.10^5$	98,23 %
$1,73.10^6$	$1,39.10^4$	99,20 %
$1,06.10^6$	$3,80.10^3$	99,64 %
$1,33.10^6$	$9,60.10^3$	99,28 %
$7,30.10^6$	$8,62.10^4$	98,82 %

Tableau n° 13 - Adsorption des virus poliomyélitiques sur la boue fraîche

III.2 - Elution-extraction des virus à partir des boues

Deux groupes d'expériences ont été réalisés utilisant pour méthode d'homogénéisation au cours de l'élution :

- d'une part une technique fondée sur un mixage suivi de l'action des ultrasons
- d'autre part une technique d'agitation avec un appareil de type VIRTIS.

III.2.1 - Elution des virus par mixage associé à une sonication

Quatre solutions éluantes ont été testées :

- solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 7 (SATTAR and WESTWOOD, 1976)
- solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 9 (GLASS et al. 1978)
- solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9 (SCHWARTZBROD and MATHIEU 1986).
- solution de sodium dodecyl sulfate à 0,1 % (WARD and ASHLEY, 1976).

Pour chaque expérience, trois essais ont été réalisés avec des échantillons de boues différentes.

a) Solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 7

Les résultats des élutions effectuées avec la solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 7 sont rassemblés dans le Tableau n°14.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP. 500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
$1,96.10^{7}$	$1,95.10^{7}$	$4,83.10^{5}$	2,47 %
$2,10.10^{7}$	$2,09.10^{7}$	$6,99.10^{5}$	3,34 %
$6,50.10^{7}$	$6,49.10^{7}$	$1,31.10^{6}$	2,01 %

Tableau n° 14 - Rendement de l'élution avec la solution d'extrait de boeuf 3 % pH=7

La quantité de virus récupérée est très faible et le taux de récupération varie entre 2,01 % et 3,34 %.

b) Solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 9

A la lecture des résultats (Tableau n° 15) obtenus avec une solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 9, on observe des rendements d'élution évoluant entre 2,9 et 8,5 %. Dans 2 cas sur 3 ces pourcentages sont peu différents de ceux observés avec la même solution à pH = 7, par contre lors d'un essai le taux de récupération est supérieur puisqu'il atteint 8,5 %.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP. 500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
3.10^{7}	$2,97.10^{7}$	$10,14.10^{5}$	3,40 %
$7,30.10^{6}$	$7,25.10^{6}$	$6,18.10^{5}$	8,52 %
$2,03.10^{7}$	$1,99.10^{7}$	$5,86.10^{5}$	2,94 %

Tableau n° 15 – Rendement de l'élution avec la solution d'extrait de boeuf à 3 % pH = 9

c) Solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9

Les résultats rassemblés dans le tableau n° 16 mettent en évidence des rendements d'élution variant de 12,5 % à 55 % qui sont très nettement supérieurs à ceux obtenus avec les solutions d'extrait de boeuf à 3 %, à pH=7 et à pH=9.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP.500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
$2,10.10^{7}$	$2,09.10^{7}$	$1,15.10^{7}$	55 %
$2,03.10^{7}$	$1,99.10^{7}$	$2,52.10^{6}$	12,5 %
$1,66.10^{7}$	$1,63.10^{7}$	$3,73.10^{6}$	22,88 %

Tableau n° 16 - Rendement de l'élution avec la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9

d) Solution de sodium dodecyl sulfate à 0,1 %

Comme l'indique le tableau n°17, l'élution avec la solution de sodium dodécyl sulfate à 0,1% permet d'obtenir des rendements de récupération variant de 3,7 % à 14,4 %. Ces taux sont supérieurs à ceux obtenus avec la solution d'extrait de boeuf à 3 %, mais plus faible qu'avec la solution d'extrait de boeuf à 10 %.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP.500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
3.10^{7}	$2,97.10^{7}$	$4,3 .10^{6}$	14,47 %
$7,30.10^{6}$	$7,25.10^{6}$	$2,73.10^{5}$	3,75 %
$1,96.10^{7}$	$1,95.10^{7}$	$2,13.10^{6}$	10,92 %

Tableau n° 17 - Rendement de l'élution avec la solution de sodium dodecyl sulfate à 0,1 %

A l'issue de cette étude qui met en évidence une très nette supériorité de la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9 par rapport aux autres solutions étudiées, il nous a paru utile de confirmer et vérifier l'efficacité de cet éluant.

e) Essai de vérification de l'efficacité de la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9

L'essai a consisté à tester 6 nouveaux échantillons avec la même technique d'élution à partir de boues artificiellement contaminées.

L'analyse des résultats (Tableau n°18) confirme l'efficacité de cet éluant puisque les rendements varient de 15,59 % à 36,78 %.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP. 500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP. 500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
$1,83.10^{7}$	$1,77.10^{7}$	$6,51.10^{6}$	36,78 %
$1,56.10^{7}$	$1,51.10^{7}$	$4,49.10^{6}$	29,73 %
$2,10.10^{7}$	$2,09.10^{7}$	$5,10.10^{6}$	24,3 %
$1,73.10^{6}$	$1,68.10^{6}$	$2,62.10^{5}$	15,59 %
$1,06.10^{6}$	$1,05.10^{6}$	$2,9 .10^{5}$	27,6 %
$1,06.10^{6}$	$1,05.10^{6}$	$1,66.10^{5}$	15,8 %

Tableau n° 18 - Efficacité de la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 9

III.2.2 - Elution des virus avec homogénéisation par appareil VIRTIS

Compte tenu des résultats obtenus en utilisant le mixage et la sonication et de la nette supériorité affichée par la solution éluante constituée par de l'extrait de boeuf à 10 % pH 9, nous avons tenté de déterminer si les rendements de récupération des virus avec cette solution éluante seraient améliorés en modifiant le procédé d'homogénéisation. C'est pourquoi nous avons effectué quatre expérimentations en utilisant un appareil VIRTIS pour l'homogénéisation.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 19 et leur analyse met en évidence que les rendements de l'élution varient de 55 à 80 %.

Il est donc net que l'utilisation de cette technique d'homogénéisation de la boue dans la solution éluante permet d'améliorer très sensiblement la récupération ou l'extraction des virus présents dans les boues.

QUANTITE DE VIRUS AJOUTES A LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ADSORBES SUR LA BOUE UFP.500 ml^{-1}	QUANTITE DE VIRUS ELUES UFP.500 ml^{-1}	RENDEMENT DE L'ELUTION
2.10^6	$1,99.10^6$	$1,09.10^6$	54,77 %
2.10^6	$1,99.10^6$	$1,35.10^6$	67,83 %
2.10^6	$1,99.10^6$	$1,23.10^6$	61,80 %
$1,33.10^6$	$1,32.10^6$	$1,06.10^6$	80,30 %

Tableau n° 19 - Rendement de l'élution avec l'homogénéisation par un appareil Virtis avec la solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9

CONCLUSION

Les essais de récupération des virus effectués à partir de boues artificiellement contaminées par des virus poliomyélitiques ont montré d'une façon très nette que des virus mis en contact avec des boues s'adsorbaient rapidement sur ces boues dans des proportions de plus de 99 %. Cette observation confirme que dans les boues il y a très peu de particules virales à l'état libre. Ceci est en accord avec les constatations réalisées par ABID et al. (1978) et par BITTON (1975) WARD and ASHLEY (1976), WELLINGS et al. (1976).

Sur le plan des modalités d'extraction des virus à partir des boues, il est apparu que la meilleure méthode était fondée sur l'utilisation d'une solution éluante constituée par une solution d'extrait de boeuf à 10 % pH 9 associée à une homogénéisation dans un appareil VIRTIS.

Le rendement de récupération obtenu se situe entre 54 % et 80 % avec une moyenne de 64,9 %.

Comparé aux rendements rapportés dans la littérature les résultats apparaissent satisfaisants. Ainsi les pourcentages de récupération obtenus par BATES et GODDARD (1980), après ajout de poliovirus à de la boue sont respectivement de 37,3% avec l'extrait de boeuf 3 % pH=7 et 29,1 % avec le sodium dodecylsulfate 0,1 %. BERG et DAHLING (1980) éluent de 39 à 63 % des poliovirus avec une solution d'extrait de boeuf à 10 % pH = 7 en tampon MacIlvaine. Par contre les résultats obtenus en utilisant le sodium dodecylsulfate sont beaucoup plus faibles que ceux rapportés par BATES et GODDARD (1980).

Cependant il faut insister sur le fait que ces expérimentations ont été réalisées à partir de boues artificiellement contaminées et que, dans ce cas, les virus adsorbés ont peut être des localisations différentes de celles existant dans les processus naturels.

Il nous a donc paru nécessaire de poursuivre l'expérimentation en travaillant non plus à partir d'un milieu artificiel, mais à partir de boues naturelles non artificiellement contaminées de façon à se placer dans des conditions normales d'analyse.

C H A P I T R E V

ETUDE DES CONDITIONS D'EXTRACTION DES VIRUS A PARTIR DES BOUES DE STATION D'EPURATION ET A PARTIR DES SEDIMENTS

I - ETUDE DES BOUES

Compte tenu des résultats obtenus précédemment l'étude a été poursuivie sur des boues non contaminées artificiellement. En effet les virus apportés extemporanément lors d'une contamination expérimentale d'une boue déjà formée n'ont pas le même comportement que les virus endogènes adsorbés sur les particules de boues lors de sa formation et il est important de déterminer la valeur des techniques d'extraction des virus dans les conditions réellement rencontrées sur le terrain.

Les virus recherchés sont ceux qui provoquent en cultures cellulaires un effet cytopathique (ECP) se traduisant par l'apparition de plages de lyse sous couverture gélosée.

Deux types de boues sont étudiées : des boues digérées et des boues fraîches primaires.

La prise d'essai de culot de boues a été portés à 40 grammes car la quantité de 10 grammes précédemment testée s'est avérée trop peu importante pour permettre d'obtenir des isolements significatifs.

Les paramètres étudiés sont la nature de l'éluant, la concentration du culot de boue dans l'éluant, la technique d'homogénéisation et d'agitation lors de l'élution et enfin l'influence d'un traitement aux ultra-sons. L'extraction des virus est suivie d'une concentration des particules virales sous un plus petit volume.

I.1 - METHODES EXPERIMENTEES

La technique d'extraction utilisée est fondée sur l'élution des virus de la boue à l'aide d'une solution éluante à pH alcalin (ALBERT et al. 1988)

Au cours des expériences, quatre paramètres sont étudiés

- la nature de l'éluant : trois éluants sont retenus :
  . solution de lait écrémé à 1% pH=9
  . solution de glycine 0,05 M pH=9
  . solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9

- la concentration de la boue dans l'éluant
  Le volume de l'éluant ajouté à l'échantillon de 40 g sera
  . soit de 160 ml ce qui correspond à une concentration de 20 %
  . soit de 360 ml, c'est-à-dire une concentration de 10 %

- le mode d'homogénéisation de la boue dans l'éluant
  L'homogénéisation est effectuée :
  . soit par agitation magnétique
  . soit par mixage.

- L'homogénéisation est dans certains cas complétée par une sonication.
  La combinaison de ces paramètres aboutit à 8 protocoles d'extraction différents pour chaque éluant.

Le tableau n° 20 rassemble les différents protocoles et les sigles utilisés pour les désigner.

ABREVIATION UTILISEE	TECHNIQUE D'EXTRACTION
AM - 20	- Agitation magnétique - Concentration dans la solution éluante:20%
AM - US - 20	- Agitation Magnétique - Concentration dans la solution éluante:20% - Ultrasonication
Mix - 20	- Mixage - Concentration dans la solution éluante:20%
Mix - US - 20	- Mixage - Concentration dans la solution éluante:20% - Ultrasonication
AM - 10	- Agitation magnétique - Concentration dans la solution éluante:10%
AM - US - 10	- Agitation magnétique - Concentration dans la solution éluante:10% - Ultrasonication
Mix 10	- Mixage - Concentration dans la solution éluante:10%
Mix - US - 10	- Mixage - Concentration dans la solution éluante:10% - Ultrasonication

Tableau n° 20 - Protocoles d'extraction des virus

La concentration des éluats est réalisée par la technique de floculation organique (KATZENELSON et al. 1976).

Le concentrat est ensuite décontaminé puis testé sur cultures de cellules MA 104 par la méthode des plages en présence de colorant vital, à raison de 5 boîtes, aux dilutions 1/2, 1/5 et de 10 boîtes au 1/10.

I.2 - ANALYSE DES BOUES DIGEREES

Les premiers essais ont été effectués sur des boues digérées et l'analyse comporte deux étapes successives.

I.2.1 - Etude des techniques d'extraction avec une solution éluante d'extrait de boeuf à 10 % pH=9

Les 8 protocoles décrits précédemment sont appliqués à différents échantillons de boue traités au laboratoire immédiatement après leur prélèvement à la station d'épuration. Trois séries de prélèvements ont fait l'objet de trois investigations différentes.

I.2.1.1 - Analyse des boues digérées brutes

A partir du culot de boues digérées, 8 prises d'essai de 40 g sont effectuées et soumises aux protocoles définis en utilisant la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9 comme éluant.

Les résultats exprimés en U.F.P. pour 100 ml de boues digérées sont rassemblés dans le tableau n°21 et montrent que des virus ont été mis en évidence dans une seule prise d'essai sur 8. La technique ayant permis d'obtenir ce résultat positif associait l'agitation magnétique à une concentration de boue de 10 % dans l'éluant.

TECHNIQUE D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS EXTRAITS UFP.100 ml $^{-1}$
	Boues digérées brutes
AM - 20	ND
AM - US - 20	ND
Mix - 20	ND
Mix - US - 20	ND
AM - 10	5
AM - US - 10	ND
Mix - 10	ND
Mix - US - 10	ND

*ND : Non détecté

Tableau n° 21- Extraction des virus avec la solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9 à partir de boues digérées brutes

1.2.1.2 - Influence de l'acidification de la boue sur la mise en évidence des virus

L'échantillon de boues digérées a été dans un premier temps séparé en 2 sous-échantillons identiques de 2 litres.

- Le premier a été traité par HCl 2N sous agitation permanente pendant 30 mn jusqu'à obtention d'un pH=3,5.

Après centrifugation de 15 mn à 1500 g, 8 prises d'essai de 40 g sont préparées à partir du culot homogénéisé et traité par les différentes techniques dans les mêmes conditions qu'en I.2.1.1., avec comme solution éluante la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9.

-Le deuxième sous-échantillon n'a pas été acidifié et le culot de centrifugation a servi directement à préparer les 8 échantillons de 40 g qui ont été soumis aux mêmes techniques d'extraction.

Les résultats rassemblés dans le tableau n° 22 montrent que seule la technique d'extraction associant mixage et ultrasonication avec une concentration de boues de 10 % a permis la mise en évidence de virus. La quantité de virus retrouvée s'élève à 25 UFP 100 ml^{-1} dans la boue acidifiée, alors qu'elle est de 7 UFP. 100 ml^{-1} dans la boue non acidifiée. Dans ces conditions, il a été décidé de réaliser une nouvelle expérimentation en travaillant uniquement avec des boues acidifiées.

TECHNIQUE D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS EXTRAITS UFP.100 ml^{-1}	
	Boues digérées	
	Acidifiées	Non acidifiées
AM - 20	ND	ND
AM - US - 20	ND	ND
Mix - 20	ND	ND
Mix - US - 20	ND	ND
AM - 10	ND	ND
AM - US - 10	ND	ND
Mix - 10	ND	ND
Mix - US - 10	25	7

*ND : Non détecté

Tableau n° 22- Extraction des virus avec la solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9 avec et sans acidification

I.2.1.3 - Analyse des boues digérées acidifiées

Cette expérimentation a consisté à appliquer les 8 protocoles d'extraction sur un échantillon de boues digérées ayant subi une acidification dans les mêmes conditions que précédemment (I.2.1.2).

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 23.

On constate que deux prises d'essais sur 8 se sont révélées positives et que le nombre de particules virales mises en évidence est très faible : 5 et 6 UFP.100 ml^{-1}.

Dans les deux cas positifs la concentration de la boue dans l'éluant était de 10 % et l'homogénéisation réalisée par agitation magnétique associée dans un cas à une ultrasonication.

Il ressort de ces 3 études que seule la concentration de 10 % de la boue dans l'éluant a permis la détection de particules virales et que les taux de virus sont toujours extrêmement faible. En ce qui concerne la comparaison des 8 techniques d'extraction, le faible nombre de résultats positifs ne permet pas de tirer de conclusions.

TECHNIQUE D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS EXTRAITS UFP.100 ml^{-1}
	Boues digérées acidifiées
AM - 20	ND
AM - US - 20	ND
Mix - 20	ND
Mix - US - 20	ND
AM - 10	5
AM - US - 10	6
Mix - 10	ND
Mix - US - 10	ND

* ND : Non détecté

Tableau n° 23 - Extraction des virus avec la solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9 à partir de boues digérées acidifiées

I.2.2 - Etude comparative des techniques d'extraction des virus avec 3 solutions éluantes

Cette étude a été réalisée à partir d'un seul prélèvement de boues digérées qui est homogénéisé puis divisé en plusieurs échantillons qui ont été congelés à - 20°.

A chaque expérience, la boue décongelée a été acidifiée puis centrifugée et 8 prises d'essais de 40 g ont été préparées à partir du culot de centrifugation.

Les trois éluants utilisés sont le lait écrémé 1 %, la glycine 0,05 M et l'extrait de boeuf à 10 %, tous à pH=9. les résultats de la comparaison de ces 3 éluants avec les 8 techniques d'extraction sont rassemblés dans le tableau n° 24 .

On constate que des virus ont été mis en évidence dans 7 cas sur 24 : 3 fois avec la solution d'extrait de boeuf, 1 fois avec la solution de lait écrémé et 3 fois avec la solution de glycine.

Les concentrations virales obtenues sont toujours très faibles de 2 à 6 UFP pour 100 ml de boues digérées.

L'influence de la concentration de la boue dans la solution éluante n'est pas significative puisque 3 échantillons sont positifs avec une concentration de 20 % et 4 avec une concentration de 10 %.

Enfin il ne se dégage pas de technique d'homogénéisation privilégiée.

En fonction de ces observations, il apparait que dans les boues digérées analysées, la concentration détectée de virus est trop faible pour pouvoir réaliser une étude comparative des différents paramètres intervenant dans l'extraction des particules virales.

C'est pourquoi la suite du travail a été consacrée à l'analyse des boues fraîches primaires dont la concentration en virus est plus importante (SCHWARTZBROD and MATHIEU 1986).

TECHNIQUE D'EXTRACTION	NOMBRE DE VIRUS EXTRAITS UFP.100 mL^{-1}		
	Solution d'extrait de boeuf à 10 %	Solution de lait écrémé à 1 %	Solution de glycine 0,05 M
AM - 20	ND*	ND	ND
AM - US - 20	ND	ND	ND
Mix - 20	ND	ND	4
Mix - US - 20	6	2	ND
AM - 10	5	ND	3
AM - US - 10	ND	ND	3
Mix 10	ND	ND	ND
Mix - US - 10	3	ND	ND

*ND : Non détecté

Tableau n° 24- Etude comparative de 3 solutions éluantes à pH=9 pour l'extraction des virus à partir de boues digérées

I.3 - ANALYSE DES BOUES FRAICHES PRIMAIRES

Les 8 protocoles d'extraction utilisés précédemment (Tableau n° 20) sur les boues digérées ont été appliqués à 40 g de culot de boues fraîches primaires et l'étude a consisté dans un premier temps à tester successivement les trois éluants, puis dans un deuxième temps à comparer l'efficacité de ces 3 éluants.

I.3.1 - ETUDE DES PARAMETRES DE L'ELUTION AVEC CHAQUE ELUANT

1.3.1.1. - Protocole expérimental

Deux échantillons de boue différents sont analysés avec chaque éluant (solution d'extrait de boeuf 10 %, solution de lait écrémé 1 % , solution de glycine 0,05 M tous à pH=9).

Au cours d'un même essai un seul éluant est testé avec les 8 voies de traitement selon le protocole décrit dans la Figure n° 14 L'étape de concentration est réalisée par la technique de floculation organique (KATZENELSON et al.1976) avec ajout d'extrait de boeuf qsp 3 % avec la glycine. La décontamination et la révélation sur cultures cellulaires sont menées selon les techniques décrites au chapitre Matériel et méthodes II.2 ET II.3 et utilisées pour les boues digérées.

Les résultats sont exprimés en UFP (unité formant plage) pour 40 g de culot de boue, en UFP pour 100 ml de boues fraîches primaires et enfin en UFP par gramme de poids sec de boue.

Ils sont analysés à l'aide du test de Wilcokson pour la comparaison de séries appariées afin de vérifier que le classement des techniques selon leur efficacité est valable quelle que soit la série des prélèvements et la dilution inoculée.

Pour un éluant donné pris séparément, les 8 techniques d'extraction sont d'abord classées par ordre décroissant du nombre d'UFP isolées pour chacun des deux échantillons testés. Il est ensuite procédé à la comparaison des rangs obtenus par chaque technique dans les deux échantillons en calculant la somme des différences positives de rang (P), la somme des différences négatives (N). La plus petite des deux valeurs absolue (T) est comparée à une table de T qui indique la valeur limite de T pour que la différence entre les classements obtenus avec les 2 échantillons soit significative aux risques de 5 %.

Il ressort de la mise en oeuvre du test de Wilcokson que pour chaque éluant les deux échantillons ne présentent pas de différence significative dans le classement des techniques d'extraction et que par voie de conséquence les résultats peuvent être discutés en prenant en compte les quantités globales de virus isolés pour chaque couple d'échantillons.

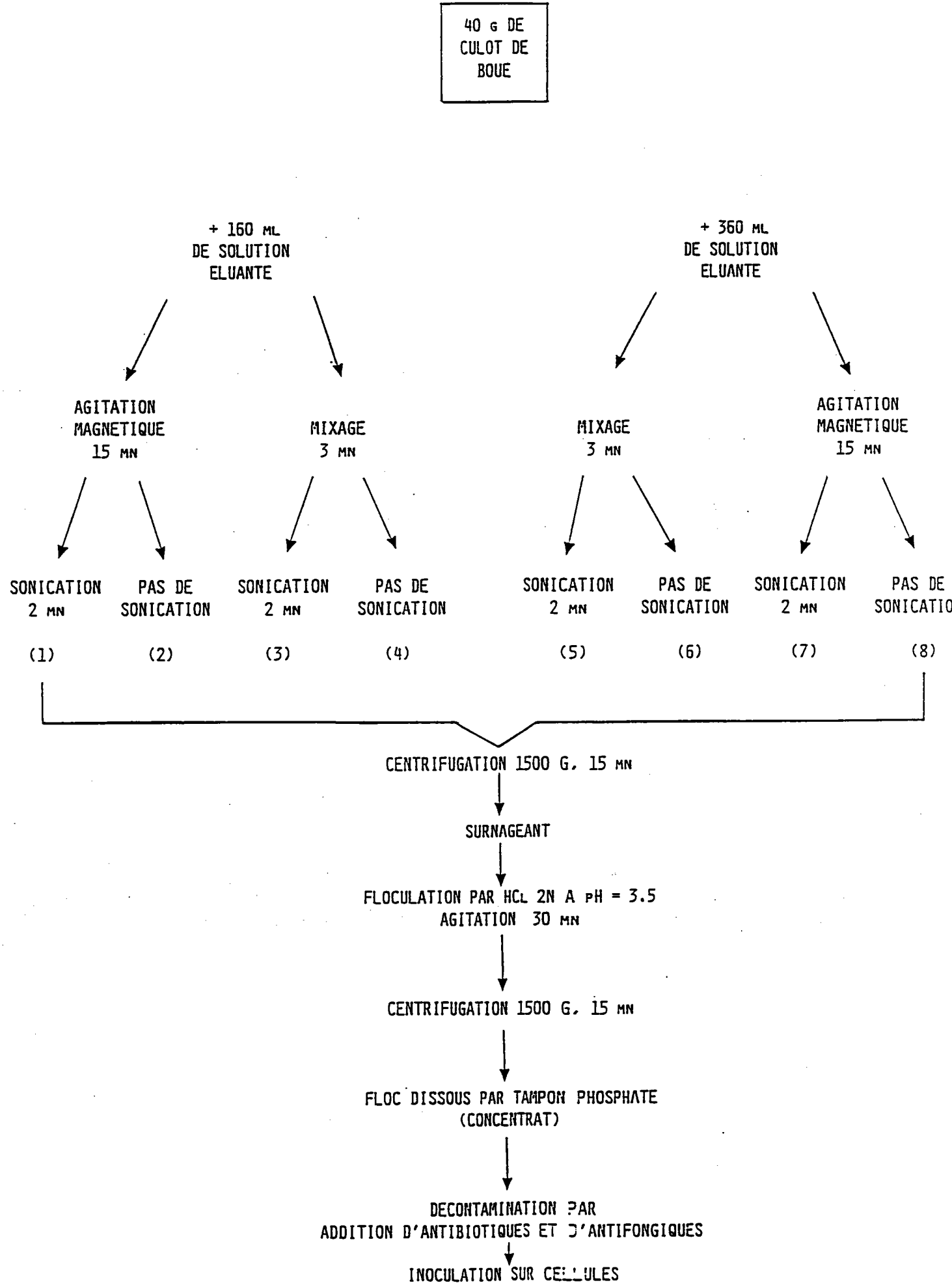


Figure n° 14 – Protocole d'analyse des boues fraîches primaires

1.3.1.2. - Résultats obtenus avec la solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9

Les résultats sont regroupés dans 3 tableaux. le tableau n° 25 indique le nombre de particules virales éluées à chaque dilution avec le premier échantillon. Le tableau n° 26 correspond au deuxième échantillon prélevé. Le tableau n° 27 permet de comparer les résultats en tenant compte des valeurs obtenues pour 1 dilution donnée.

En ce qui concerne les 3 dilutions du concentrat inoculées sur cultures cellulaires, il apparait clairement que des phénomènes toxiques ont été constatés dans 94 % des cas avec la dilution à 1/2 et dans 44 % des cas avec 1 dilution au 1/5ème. Seuls les résultats obtenus avec le concentrat dilué au 1/10ème ont ainsi pu être pris en compte. L'analyse par le test de Wilcokson indique une valeur de T = 17 largement supérieure à celle indiquée par la table de T (T = 4). Dans ces conditions, il n'y a pas de différence significative de classement entre les deux échantillons analysés.

En ce qui concerne la concentration de la boue dans la solution éluante, le nombre de virus isolés est près de 2 fois plus important lorsque la concentration de la boue est de 10 % (641 UFP versus 352 UFP avec la concentration de 20 %) (Tableau n° 27).

La meilleure technique d'extraction-élution est celle qui fait appel à l'agitation magnétique d'une boue à 10 % dans l'éluant.

Enfin, il existe une différence très importante de concentration virale entre les 2 prélèvements effectués, l'échantillon n° 1 contenant 6,46 fois plus de virus que l'échantillon n° 2.

La méthode d'extraction sélectionnée dans le cadre de l'utilisation de la solution éluante "extrait de boeuf" sera donc :

Agitation magnétique - concentration de boue 10% (AM - 10) le concentrat étant inoculé sur des cultures cellulaires à la dilution 1/10.

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP.g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	T*	T	77	T	T	41	T	T	5
AM - US - 20	T	T	142	T	T	76	T	T	9
Mix - 20	T	T	38	T	T	20	T	T	2
Mix - US - 20	T	54	40	T	29	21	T	3,6	3
AM - 10	T	T	251	T	T	134	T	T	17
AM - US - 10	T	T	119	T	T	63	T	T	8
Mix - 10	T	T	51	T	T	27	T	T	3
Mix - US - 10	T	T	142	T	T	76	T	T	9

T* : échantillon toxique

Tableau n° 25 - Quantité de virus isolés avec la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9

Echantillon N° 1

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP. g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	T*	ND**	ND	T	ND	ND	T	ND	ND
AM - US - 20	T	11	ND	T	27	ND	T	4	ND
Mix - 20	4	ND	32	11	ND	80	1,5	ND	11,5
Mix - US - 20	T	23	23	T	57	57	T	8	8
AM - 10	T	ND	33	T	ND	83	T	ND	12
AM - US - 10	T	ND	11	T	ND	28	T	ND	4
Mix - 10	T	11	ND	T	28	ND	T	4	ND
Mix - US - 10	T	ND	34	T	ND	85	T	ND	12

T* : échantillon toxique

ND** : non détecté

Tableau n° 26 - Quantité de virus isolés avec la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9

Echantillon N° 2

B.U. METZ

TECHNIQUES D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS ISOLES UFP.40 g^{-1} (culot)		
	Echantillon N° 1	Echantillon N° 2	Total 80 g^{-1}
AM - 20	77	ND	77
AM - US - 20	142	ND	142
Mix - 20	38	32	70
Mix - US - 20	40	23	63
Total (concentration 20 %) 160 g^{-1}	297	55	
AM - 10	251	33	284
AM - US - 10	119	11	130
Mix - 10	51	ND	51
Mix - US - 10	142	34	176
Total (concentration 10 %) 160 g^{-1}	563	78	
TOTAL GENERAL	860	133	993

*ND : Non détecté

Tableau n° 27 - Evaluation des techniques d'extraction avec la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9 (dilution 1/10ème)

I.3.1.3 - RESULTATS OBTENUS AVEC LA SOLUTION DE LAIT ECREME 1 % pH=9

Avec cet éluant, seules les dilutions du concentrat au 1/5 et au 1/10e seront étudiées car avec l'un des échantillons, la dilution au 1/2 a provoqué des altérations du tapis cellulaire qui a rendu toute lecture impossible (Tableaux n° 28 et n° 29).

Le test de Wilcokson a donc été appliqué aux résultats obtenus avec la dilution au 1/5e et au 1/10e. les valeurs de T respectivement de 17 et de 14 étant supérieures à celle indiquée par la table de T (T = 4), il n'y a donc pas de différence significative de classement entre les deux échantillons analysés pour la dilution au 1/5e et au 1/10e.

Les valeurs obtenues sont plus élevées avec la dilution 1/10e qui permet de mettre en évidence 1351 UFP contre 992 UFP avec la dilution 1/5e (Tableau n° 30).

En ce qui concerne la concentration de boues dans la solution éluante, si l'on cumule les résultats obtenus avec les deux dilutions, il apparaît que la concentration de 20 % permet d'obtenir une quantité de virus légèrement plus importante (1255 contre 1088) qu'avec la concentration de 10 %. Mais si l'on tient compte uniquement de la dilution au 1/10e (qui permet d'obtenir globalement les meilleurs résultats), il apparaît que les résultats sont supérieurs avec la concentration de 10 % de boues dans la solution éluante. Comme dans l'expérimentation précédente il a été constaté une variation importante de la concentration virale selon les échantillons.

En prenant en compte les résultats des deux échantillons parmi les huit techniques d'extraction testées et avec la dilution au 1/10e, la meilleure, quelle que soit la concentration en boues, est celle associant l'agitation magnétique et l'action des ultrasons (Tableau n°30)

La méthode d'extraction sélectionnée dans le cadre de l'utilisation de la solution éluante "lait écrémé" sera donc : agitation magnétique - ultrasons - concentration de boues 10 % (AM - US - 10).

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP.g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	T	141	82	T	135	78	T	27	16
AM - US - 20	T	55	177	T	53	169	T	11	34
Mix - 20	T	92	69	T	89	66	T	18	13
Mix - US - 20	T	109	121	T	104	116	T	21	23
AM - 10	T	103	148	T	98	141	T	20	28
AM - US - 10	T	83	274	T	79	262	T	16	52
Mix - 10	T	T*	T	T	T	T	T	T	T
Mix - US - 10	T	73	133	T	70	127	T	14	25

T* : échantillon toxique

Tableau n° 28 - Quantité de virus isolés avec la solution de lait écrémé à 1 % pH=9

Echantillon N° 3

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP.g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	55	40	40	53	39	39	11	8	8
AM - US - 20	22	11	56	21	11	54	4	2	11
Mix - 20	17	131	33	16	126	32	3	25	6
Mix - US - 20	24	49	49	23	47	47	5	9	9
AM - 10	34	45	62	33	43	60	7	9	12
AM - US - 10	38	8	16	37	8	15	7	2	3
Mix - 10	T*	52	52	T	50	50	T	10	10
Mix - US - 10	10	ND**	39	10	ND	37	2	ND	7

T* : échantillon toxique

ND** : non détecté

Tableau n° 29- Quantité de virus isolés avec la solution de lait écrémé à 1 % pH=9

Echantillon N° 4

TECHNIQUES D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS UFP. 40 g^{-1} Dilution au 1/5			QUANTITE DE VIRUS UFP. 40 g^{-1} Dilution au 1/10		
	Echantillon N° 3	Echantillon N° 4	Total 80 g^{-1}	Echantillon N° 3	Echantillon N° 4	Total 80 g^{-1}
AM - 20	141	40	181	82	40	122
AM - US - 20	55	11	66	177	56	233
Mix - 20	92	131	223	69	33	102
Mix - US - 20	109	49	158	121	49	170
Total 160 g^{-1} (concentration 20 %)	397	231		449	178	
AM - 10	103	45	148	148	62	210
AM - US - 10	83	8	91	274	16	290
Mix - 10	T	52	52	T	52	52
Mix - US - 10	73	ND*	73	133	39	172
Total 160 g^{-1} (concentration 10 %)	259	105		555	169	
TOTAL GENERAL	656	336	992	1004	347	1351

ND* : non détecté

T** : échantillon toxique

Tableau n° 30 - Evaluation des techniques d'extraction avec la solution de lait écrémé à 1 % pH=9

1.3.1.4 - Résultats obtenus avec la solution glycine 0,05 M pH=9

Avec la solution de glycine les résultats des trois dilutions sont interprétables et ont été soumis à l'analyse statistique (tableaux 31 et 32)Les valeurs de T obtenues sont respectivement de 10, 13 et 18. Elles sont nettement supérieures à celle de la table de T et par conséquent, il n'y a pas de différence significative de classement entre les deux échantillons analysés, quelle que soit la dilution envisagée.

Globalement, les meilleurs résultats sont obtenus avec la dilution au 1/5e mais ceux concernant les deux autres dilutions sont pratiquememnt équivalents (tableau n° 33).

En ce qui concerne la concentration de boues dans la solution éluante, en cumulant les résultats obtenus avec les 3 dilutions, on constate que la concentration de 10 % de boues permet d'extraire plus de virus que la concentration de 20 % (1064 contre 876 UFP 40 g^{-1} de culot de boue).

Cette observation est par ailleurs confirmée séparément pour les dilutions au 1/2 et au 1/10e.

Dans le cadre optimum d'une concentration de 10 % de boues dans l'éluant la meilleure des 8 techniques d'extraction est différente selon la dilution inoculée sur les systèmes cellulaires.

En effet, pour les dilutions au 1/5e et au 1/10e, la meilleure technique est celle qui fait appel à l'agitation magnétique, alors que pour la dilution au 1/2 l'agitation magnétique doit être associée à l'action des ultra-sons.

Compte tenu de ces différents éléments et du fait que pour les deux autres éluants testés la dilution au 1/10e a été systématiquement choisie et qu'enfin pour la technique d'extraction AM-10

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP.g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	ND*	60	12	ND	66	13	ND	7	1
AM - US - 20	32	149	40	35	165	44	3	14	5
Mix - 20	56	31	37	62	34	41	5	3	4
Mix - US - 20	ND	40	59	ND	44	65	ND	5	7
AM - 10	20	37	50	22	41	55	2	5	6
AM - US - 10	16	81	68	18	90	75	2	10	8
Mix - 10	6	24	49	7	27	54	1	3	6
Mix - US - 10	32	13	40	35	14	44	4	2	5

ND* : non détecté

Tableau n° 31 - Quantité de virus isolés avec solution de glycine 0,05 M pH=9

Echantillon n° 5

TECHNIQUES D'EXTRACTION \ DILUTIONS	UFP.40 g^{-1} (culot)			UFP.100 ml^{-1} (boues)			UFP.g^{-1} (poids sec)		
	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10	1/2	1/5	1/10
AM - 20	64	37	ND*	66	38	ND	10	6	ND
AM - US - 20	61	28	20	63	29	21	10	4	2
Mix - 20	27	28	15	28	29	16	4	4	2
Mix - US - 20	40	40	ND	41	41	ND	6	6	ND
AM - 10	49	97	97	51	100	100	8	15	15
AM - US - 10	83	28	35	86	29	36	13	4	5
Mix - 10	42	63	14	43	65	14	7	10	2
Mix - US - 10	59	37	24	61	38	25	9	6	4

ND* : non détecté

Tableau n° 32 - Quantité de virus retrouvés avec la solution de glycine 0,05 M pH=9

Echantillon N° 6

TECHNIQUES D'EXTRACTION	QUANTITE DE VIRUS UFP. 40 g^{-1} (culot) Dilution au 1/2		TOTAL 80 g^{-1}	QUANTITE DE VIRUS UFP. 40 g^{-1} (culot) Dilution au 1/5		TOTAL 80 g^{-1}	QUANTITE DE VIRUS UFP. 40 g^{-1} (culot) Dilution au 1/10		TOTAL 80 g^{-1}
	Echantillon N° 5	Echantillon N° 6		Echantillon N° 5	Echantillon N° 6		Echantillon N° 5	Echantillon N° 6	
AM - 20	ND*	64	64	60	37	97	12	ND	12
AM - US - 20	32	61	93	149	28	177	40	20	60
Mix - 20	56	27	83	31	28	59	37	15	52
Mix - US - 20	ND	40	40	40	40	80	59	ND	59
Total UFP 160 g (Concentration 20 %)	88	192		280	133		148	35	
AM - 10	20	49	69	37	97	134	50	97	147
AM - US - 10	16	83	99	81	28	109	68	35	103
Mix - 10	6	42	48	24	63	87	49	14	63
Mix - US - 10	32	59	91	13	37	50	40	24	64
Total UFP 160 g (Concentration 10 %)	74	233		155	225		207	170	
Total général	162	425	587	435	358	793	355	205	560

ND* : non détecté

Tableau n° 33 - Evaluation des techniques d'extraction avec la solution de glycine 0,05 M pH=9

sélectionnée les quantités de virus retrouvés sont légèrement supérieures avec la dilution au 1/10e, il a été décidé de sélectionner dans le cadre de l'utilisation de la solution éluante "glycine" la technique : agitation magnétique - concentration de boues 10 % (AM-10), la dilution d'ensemencement étant celle au 1/10e.

1.3.1.5 - Conclusion

L'étude des 8 protocoles d'extraction-concentration avec 3 solutions éluantes a permis de montrer d'une part que la concentration virale des échantillons de boues fraîches primaires variait considérablement d'un échantillon à un autre, mettant ainsi en évidence une grande hétérogénéité de ce milieu, d'autre part de sélectionner pour chaque éluant étudié la meilleure technique d'extraction.

Cependant et compte tenu de l'hétérogénéité des échantillons de boues, il n'est pas possible de comparer entre eux les résultats des essais réalisés. C'est pourquoi il a semblé important de réaliser l'analyse virologique sur un même échantillon de boues avec les 3 éluants en utilisant la technique d'extraction sélectionnée pour chacune des solutions éluantes. Ceci devrait permettre de réaliser l'étude comparative de l'efficacité des 3 éluants.

I.3.2 - ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFICACITE DE 3 ELUANTS

La technique la plus efficace parmi les 8 testées ayant été déterminée pour chaque éluant, les trois éluants sont utilisés simultanément sur le même échantillon de boue .

I.3.2.1 - Protocole expérimental

Deux échantillons de boues fraîches primaires prélevés à des dates différentes ont été analysés. Chaque échantillon a été testé avec les 3 méthodes d'extraction appliquées chacune à 3 prises d'essai différentes provenant du même échantillon.

Les 3 techniques sélectionnées étaient :

1) - solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9 : agitation magnétique avec un culot de boue à 10 % dans la solution éluante.
2) - Solution de lait écrémé à 1 % pH=9 : agitation magnétique suivie de l'action des ultra-sons avec une concentration du culot de boue de 10 %.
3) - Solution de glycine 0,05M pH=9 : agitation magnétique avec un culot de boue à 10 % dans la solution éluante.

Après concentration par floculation organique et décontamination le concentrat est inoculé sur des cellules MA 104 et la quantification a été réalisée à partir de la dilution au 1/10e et par ensemencement de 10 boîtes de pétri.

I.3.2.2 - Résultats

Les résultats sont exprimés en UFP pour 40 g de culot de boue, en UFP pour 100 ml de boue et en UFP par gramme de poids sec, ceci pour chaque prélèvement (Tableaux n° 34 et n° 35).

Pour le premier prélèvement envisagé, on constate que les résultats obtenus avec les 3 éluants sont relativement proches avec toutefois une légère supériorité du lait et surtout de la glycine sur la solution d'extrait de boeuf.

Pour le deuxième échantillon, la solution de lait écrémé et le tampon glycine se révèlent sensiblement supérieurs à la solution d'extrait de boeuf : le nombre d'UFP obtenus étant plus de 2 fois supérieur :

. 350 UFP avec la solution de lait écrémé pour 300 ml de boues fraîches
. 390 UFP avec le tampon glycine
. contre 150 UFP avec la solution d'extrait de boeuf

ces 2 méthodes ont des rendements pratiquement identiques

TECHNIQUE D'EXTRACTION	N° de la prise d'essai	QUANTITE DE VIRUS ISOLES			
		UFP. 40 g^{-1} (culot)	UFP. 100 ml^{-1} (boues)	UFP. 300 ml^{-1}	UFP. g^{-1} (Poids sec)
SOLUTION D'EXTRAIT DE BOEUF à 10 %	1	58	60		10
	2	69	71	182	12
AM - 10	3	50	51		9
	4	63	65		11
SOLUTION DE LAIT ECREME 1 %	5	73	75	204	13
AM - US - 10	6	62	64		11
	7	91	94		16
SOLUTION DE GLYCINE 0,05 M	8	60	62	230	11
AM - 10	9	72	74		13

Tableau n° 34 - Comparaison de l'efficacité de 3 éluants. Echantillon n° 1

TECHNIQUE D'EXTRACTION	N° de la prise d'essai	QUANTITE DE VIRUS ISOLES			
		UFP. 40 g^{-1} (culot)	UFP. 100 ml^{-1} (boues)	UFP. 300 ml^{-1}	UFP. g^{-1} (Poids sec)
SOLUTION D'EXTRAIT DE BOEUF à 10 %	1	53	60		12
	2	35	40	150	8
AM - 10	3	44	50		10
	4	86	98		19
SOLUTION DE LAIT ECREME 1 %	5	116	132	350	25
AM - US - 10	6	106	120		23
	7	107	121		23
SOLUTION DE GLYCINE 0,05 M	8	118	134	390	26
AM - 10	9	119	135		26

Tableau n° 35 - Comparaison de l'efficacité de 3 éluants - Echantillon n° 2

I.3.3 - CONCLUSION

Cette étude avait pour but la détermination d'un protocole simple et efficace d'extraction des virus entériques à partir des boues.

Après une étude combinée des différents paramètres avec trois éluants, trois protocoles ont été sélectionnés. Il est apparu clairement que le protocole fondé sur l'utilisation d'une solution d'extrait de boeuf à 10 % associé à l'agitation magnétique pouvait être éliminé car les résultats obtenus étaient nettement plus faibles que ceux obtenus avec les deux autres protocoles.

Il est par contre impossible d'effectuer un classement entre les deux autres protocoles : l'un utilisant la solution de lait écrémé 1 % avec l'agitation magnétique et l'ultrasonication, l'autre utilisant la solution de glycine avec l'agitation magnétique, en effet les résultats sont pratiquement identiques.

Cependant il nous a paru intéressant de sélectionner la technique fondée sur l'utilisation de la solution de lait écrémé 1 % pH=9 car cette technique ne nécessite pas d'ajout d'extrait de boeuf et de plus l'acidification de l'éluat lors de la floculation organique s'effectue à un pH plus élevé (pH=4,5) qu'avec la solution de glycine (pH=3,5).

En effet GODDARD et al. (1981) ont montré que l'utilisation d'un pH=3,5 pouvait avoir une action drastique sur les virus entériques.

DUBROU et al. (1989) émettent l'hypothèse que, dans ce cas, se produisent des modifications irréversibles des capsides virales empêchant certains virus de pénétrer et donc de se répliquer dans les cellules.

Par ailleurs, FRINOT et HARTEMANN (1989) dans une étude parallèle à la nôtre effectuée sur des boues conditionnées par floculation et filtration (Laneuveville - devant - Nancy) ont aussi sélectionné un protocole fondé sur l'utilisation d'une solution de lait écrémé, en insistant sur le fait que dans ces conditions le floc obtenu était important contrairement à celui obtenu avec la solution de glycine.

Par ailleurs il faut souligner l'extrême variabilité de la concentration virale dans les différents échantillons de boue.

II - ETUDE DES SEDIMENTS

II.1 - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

L 'analyse virologique des sédiments fluviaux et marins a été réalisée en utilisant pour l'extraction des virus 3 techniques différentes. Deux techniques dénommées : extraction-concentration directe ont été sélectionnées à la suite des résultats que nous avons obtenus à partir des boues de station d'épuration. Elles différent uniquement par la nature de la solution éluante constituée soit par une solution de lait écrémé à 1 % pH=9, soit par une solution de glycine 0,05 M pH=9 (Figure n° 15). La troisième intitulée technique d'extraction concentration indirecte a été proposée pour les sédiments marins par BOSCH et al. (1988) (Figure n° 16).

Les sédiments analysés proviennent de la baie de Morlaix comme il est indiqué dans le chapitre Matériel et Méthodes. Ils ont été prélevés à des distances variables en aval du rejet d'eaux usées de la ville de Morlaix. Deux campagnes de prélèvements ont été réalisées.

Les virus recherchés sont ceux qui provoquent en culture cellulaire un effet cytophatique (ECP) se traduisant par l'apparition de plages de lyse sous couverture gélosée.

Les concentrats ont été inoculés sur le tapis cellulaire d'une part purs et d'autre part dilués au 1/2 à raison de 5 boîtes de pétri dans les 2 cas.

Après incubation à 37° les plages de lyse ont été numérées chaque jour pendant 12 jours et les résultats exprimés en UFP par kg de sédiments.

FIGURE N° 15

TECHNIQUE D'EXTRACTION-CONCENTRATION DIRECTE

SEDIMENT + SOLUTION ÉLUANTE (LAIT ÉCRÉMÉ 1 % pH = 9 ; GLYCINE 0,05 M pH = 9)

40G — 360 ML

AGITATION MAGNÉTIQUE 15 MN

SUSPENSION HOMOGÈNE

SONICATION 2 MN

SUSPENSION SONICÉE

CENTRIFUGATION
1500 G 15 MN

SURNAGEANT

ACIDIFICATION À (pH 3,5 POUR LA GLYCINE ; pH 4,5 POUR LE LAIT ÉCRÉMÉ)

AGITATION MAGNÉTIQUE 30 MN

FLOC EN SUSPENSION

CENTRIFUGATION
3000 TOURS/MINUTE 15 MN

FLOC

DISSOLUTION DANS
15 À 20 ML DE Na_2HPO_4 0,15M pH 7,2

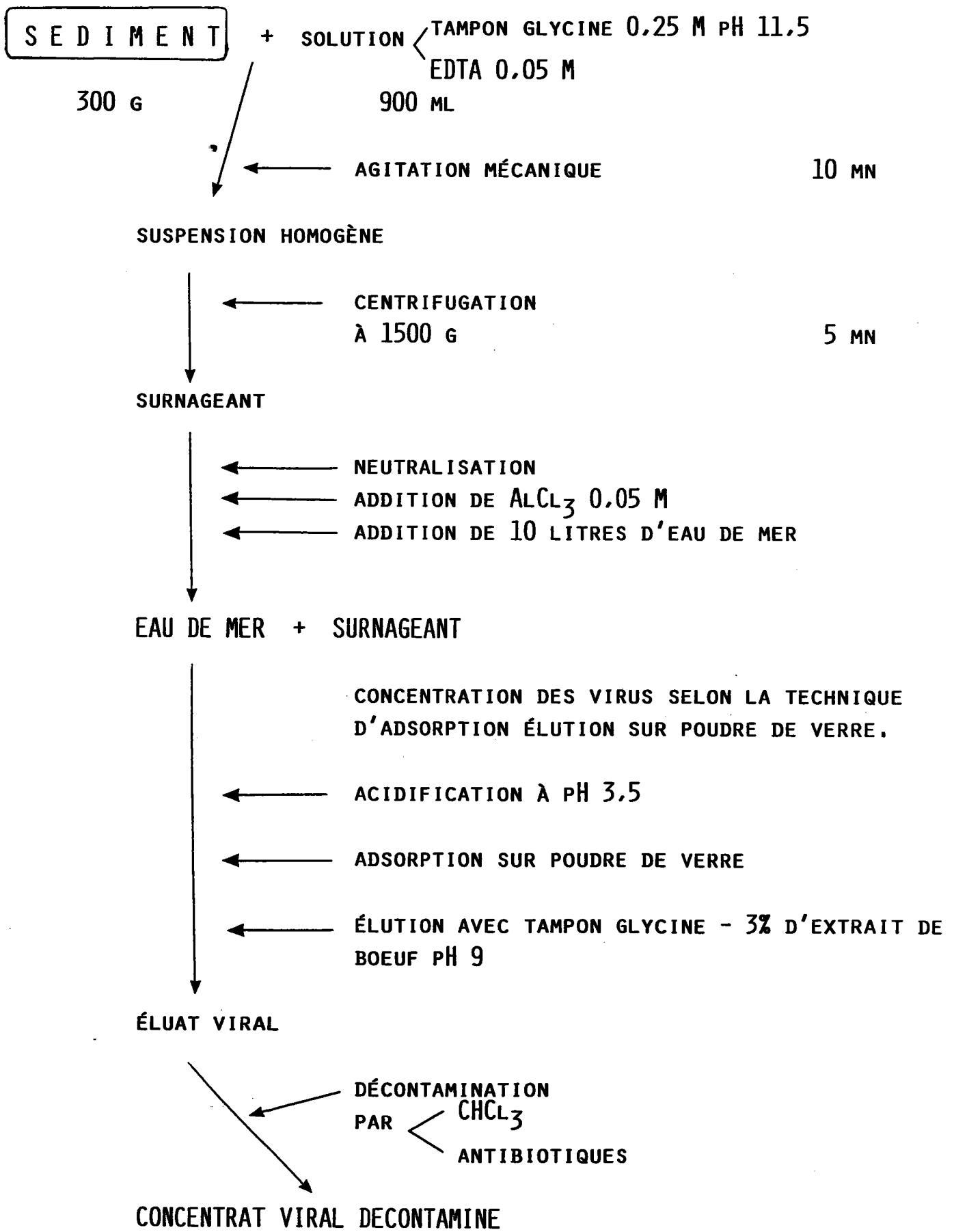
CONCENTRAT VIRAL

DÉCONTAMINATION PAR ($CHCl_3$; ANTIBIOTIQUES)

CONCENTRAT VIRAL DECONTAMINE

FIGURE N° 16

TECHNIQUE D'EXTRACTION-CONCENTRATION INDIRECTE



II.2 - RESULTATS

II-2-1 - Résultats de la première campagne de prélèvement

Ils sont rassemblés dans le tableau n° 36 où sont indiqués les lieux de prélèvement, les méthodes de traitement testées et la quantité de virus isolés.

Six des huit échantillons contiennent des virus et les concentrations détectées varient de 15 à 407 UFP pour 1000 g de sédiments humides.

Sur le plan méthodologique on peut remarquer que :

- 4 échantillons sont positifs avec la technique extraction-concentration indirecte.
- 4 échantillons sont positifs avec la technique extraction-concentration directe en utilisant le lait écrémé comme éluant.
- 2 échantillons sont positifs avec la technique extraction-concentration directe en utilisant la solution de glycine comme éluant.
- 1 seul échantillon (C41.2) est positif avec les trois méthodes mais la technique "directe lait écrémé" permet d'obtenir un résultat très supérieur.
- 2 échantillons (C6 et C7) sont positifs avec deux méthodes.
- 3 échantillons sont positifs avec une seule technique.

La méthode d'extraction-concentration indirecte permet la mise en évidence de virus 4 fois sur 8, de même que la méthode d'extraction-concentration "directe lait écrémé" alors que la méthode d'extraction-concentration "directe glycine" ne permet que 2 résultats positifs sur 8.

NUMERO DE L'ECHANTILLON	DISTANCE PAR RAPPORT AU REJET	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION INDIRECTE	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION DIRECTE solution éluante : lait écrémé 1 % pH 9	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION DIRECTE solution éluante : solution de glycine 0,05 M pH 9
		Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})	Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})	Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})
C 4-2	10 m	15	Néant	Néant
C 6-2	180 m	Néant	Néant	Néant
C 13-1	925 m	Néant	Néant	Néant
C 27-3	2 500 m	Néant	91	Néant
C 41-2	3 900 m	44	407	73
C 47-2	4 600 m	51	Néant	Néant
C 6	5 100 m	Néant	275	52
C 7	6 400 m	50	81	Néant

TABLEAU N° 36 - RESULTATS DE L'ANALYSE VIROLOGIQUE DES SEDIMENTS - 1ère campagne

NUMERO DE L'ECHANTILLON	DISTANCE PAR RAPPORT AU REJET	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION INDIRECTE	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION DIRECTE solution éluante : lait écrémé 1 % pH 9	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION DIRECTE solution éluante : solution de glycine 0,05 M pH 9
		Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})	Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})	Entérovirus (UFP.1000 g^{-1})
C 4-2	10 m	Néant	Néant	Néant
C 6-2	180 m	180	Néant	Néant
C 13-1	925 m	Néant	Néant	Néant
C 27-3	2 500 m	Néant	Néant	Néant
C 41-2	3 900 m	Néant	Néant	Néant
C 47-2	4 600 m	Néant	Néant	Néant
C 6	5 100 m	Néant	Néant	Néant
C 7	6 400 m	Néant	Néant	Néant

TABLEAU N° 37 – RESULTATS DE L'ANALYSE VIROLOGIQUE DES SEDIMENTS – 2ème campagne

Sur le plan quantitatif, les concentrations en particules virales les plus élevées sont obtenues avec la méthode d'extraction-concentration directe utilisant le lait écrémé comme éluant.

II-2-2 - Résultats de la deuxième campagne de prélèvements

Les 3 méthodes ont été appliquées aux 8 échantillons différents et les résultats obtenus sont rassemblés dans le tableau n° 37

On constate que des virus ont été mis en évidence dans un seul échantillon sur 8, à raison de 180 UFP pour 1000 g de sédiments.

Le résultat positif est obtenu avec la méthode d'extraction indirecte. Or avec cette technique, la quantité de sédiments analysés est de 300 g alors que les 2 autres protocoles testent seulement 40 g de sédiments.

Il faut signaler que les quantités de virus retrouvés se situent à la limite de la détection, en effet, elles correspondent à l'isolement effectif d'une quantité extrêmement faible de particules virales.

II.3 - CONCLUSION

En comparant les deux tableaux de résultats, on peut remarquer que lors de la campagne de prélèvement réalisée en octobre 1987 (1ère campagne), six échantillons sont positifs sur huit alors qu'en avril 1988 (2ème campagne) des virus n'ont été détectés que dans un seul échantillon.

Il apparaît que dans la première campagne les 3 méthodes testées ont permis d'obtenir simultanément des résultats positifs uniquement dans un cas sur huit. Le protocole fondé sur l'utilisation d'une technique d'extraction-concentration directe avec la solution de glycine donne des résultats peu satisfaisants (2 positfs sur 8). Par contre la technique d'extraction-concentration indirecte et l'extraction concentration directe utilisant la solution de lait écrémé 1 % comme solution éluante donne des résultats quantitativement identiques puisque chacune de ces deux méthodes permet de mettre en évidence des virus dans 50 % des échantillons.

Sur le plan quantitatif, c'est la technique d'extraction-concentration directe avec le lait écrémé qui permet l'extraction du plus grand nombre de particules virales (854 contre 160).

S'il est difficile de faire un choix entre ces deux méthodes, il apparaît clairement que l'utilisation conjointe de ces deux protocoles permet d'augmenter les chances d'isolement des virus : dans ces conditions 75 % des prélèvements sont positifs alors qu'en utilisant une seule méthode la positivité est seulement de 50 %.

Enfin, il est nécessaire d'insister sur l'extrême variabilité de la concentration virale des échantillons puisque dans la deuxième campagne de prélèvements effectuée sur les mêmes sites que la première campagne un seul échantillon s'est révélé positif avec un seul protocole analytique.

Pour l'ensemble des résultats obtenus, 44 % des échantillons sont positifs, ce qui est tout à fait comparable aux pourcentages obtenus par RAO et al. (1984) dans la baie de Galveston qui rapporte que 47 % des sédiments de surface sont positifs. De même SCHWARTZBROD et al. (1987 a), lors d'une étude effectuée sur le site de Barcelone mettent en évidence des entérovirus dans 38 % des échantillons dans le secteur Besos et 50 % dans le secteur Llobregat. Le taux moyen de particules virales dans les sédiments marins de Barcelone est de 10 à 530 UFP/kg donc du même ordre de grandeur que celui obtenu dans la baie de Morlaix (15 à 407 UFP/kg).

C H A P I T R E VI

EVALUATION DU PROTOCOLE D'ELUTION CONCENTRATION SELECTIONNE

Ayant sélectionné une méthode d'extraction concentration des entérovirus à partir de boues fraîches primaires il nous a semblé intéressant de comparer son efficacité avec :

- d'une part la méthode utilisée par l'Environmental Protection Agency (E.P.A.), (1984).
- d'autre part une méthode préconisée par BIZIAGOS (1988) pour la recherche du virus de l'hépatite A dans les coquillages.

I - ETUDE COMPARATIVE DU PROTOCOLE SELECTIONNE ET DE LA METHODE PRECONISEE PAR L'E.P.A.

I.1 Protocole expérimental

Le travail a porté sur 2 échantillons de boues fraîches primaires prélevés à des dates différentes dans la station d'épuration des eaux usées de Nancy.

A partir de chaque échantillon 6 prises d'essais ont été réalisées : 3 de 100 ml et 3 de 40 g. En effet, la technique de l'E.P.A. est appliquée à des échantillons liquides et la méthode que nous avons préconisée est utilisée à partir d'échantillons solides (culot). Pour permettre des comparaisons tous les résultats sont exprimés pour 100 ml de boues et par gramme de poids sec en tenant compte de la correspondance établie entre le volume de boues liquides et le poids de culot.

La technique préconisée est fondée sur une élution du culot à une concentration de 10 % par une solution de lait écrémé à 1 % pH=9 associée à une agitation magnétique et une ultrasonication. L'étape de concentration est réalisée par floculation organique.

Les modalités de la technique E.P.A. décrites dans le chapitre Matériel et Méthodes en II.1.4 ont été intégralement respectées sauf au niveau de la décontamination du concentrat. En effet plusieurs expérimentations préliminaires ont montré que lors de l'étape de filtration stérilisante se produisait de très importants colmatages des filtres nécessitant l'utilisation de plusieurs membranes et augmentant considérablement la durée du traitement. La décontamination a donc été réalisée par traitement au chloroforme et addition d'antibiotiques.

Les ensemencements sur cultures cellulaires ont été réalisés avec les concentrats, soit purs, soit dilués au ½, en effet la faible teneur en virus des échantillons au moment des prélèvements ne permettait pas d'inoculer les dilutions au 1/5 ou 1/10 utilisées précédemment.

I.2 - Résultats

Les résultats sont rassemblés dans les tableaux n°38 et n°39 et font l'objet des remarques suivantes :

. En ce qui concerne les dilutions on constate que le concentrat obtenu par la méthode préconisée (AM.US.10-lait écrémé) est toxique lorsqu'il est inoculé sur les cultures cellulaires à l'état pur et que seule la dilution au ½ permet d'obtenir des résultats interprétables. Par contre le concentrat obtenu par la méthode de l'E.P.A. permet d'observer des plages qu'il soit inoculé pur ou dilué. Dans ce cas les quantités de virus obtenues sont à peu près identiques quelle que soit la dilution inoculée.

. Dans l'échantillon n° 1, (Tableau n° 38) l'analyse des résultats montre que, pour les 3 prises d'essais testées (soit 300 ml de boues analysées), on obtient :

- 50 UFP avec la méthode AM.US.10-Lait écrémé
- 43 UFP (dilution au ½) ou 42 UFP (pur) avec la méthode de l'E.P.A.

. Dans l'échantillon n° 2, une des 3 prises d'essai analysée par la méthode préconisée (AM.US.10-lait écrémé) n'a pas permis de révéler de particules virales. Dans ces conditions la technique préconisée à permis d'isoler 45 UFP dans 300 ml de boues alors qu'avec celle de l'E.P.A. le nombre d'UFP s'élève à 96 dans le même volume.

Compte tenu des intervalles de confiance des valeurs obtenues il n'y a pas de différence significative entre les deux techniques. Cependant, il faut insister sur le fait que la technique préconisée s'est trouvée en défaut une fois sur six et qu'elle nécessite l'inoculation de dilutions au ½ car à l'état non dilué l'éluat manifeste une toxicité pour les cellules. Par ailleurs la méthode préconisée par l'E.P.A. a permis l'isolement du virus dans les 6 échantillons analysés et l'inoculation d'éluats non dilués sur les cultures cellulaires mais il a été impossible de mettre en oeuvre la décontamination de l'éluat par filtration sur membrane préconisée dans la technique originale.

TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	N° DE LA PRISE D'ESSAI	QUANTITE DE VIRUS			
		UFP.100 ml^{-1}		UFP.g^{-1} (poids sec)	
		PUR	½	PUR	½
SOLUTION DE LAIT ECREME 1 % pH=9 AM.US.10	1	T	16	T	3
	2	T	15	T	3
	3	T	19	T	4
METHODE DE L'E.P.A.	4	10	17	2	3
	5	20	19	4	4
	6	12	7	2,5	1

T : Toxique

Tableau n° 38 - Comparaison du protocole sélectionné avec la méthode de l'E.P.A. - Echantillon n° 1

TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	N° DE LA PRISE D'ESSAI	QUANTITE DE VIRUS			
		UFP 100 ml^{-1}		UFP g^{-1} (poids sec)	
		PUR	½	PUR	½
SOLUTION DE LAIT ECREME 1 % pH=9 AM.US.10	1	T	30	T	6
	2	T	15	T	3
	3	T	ND	T	ND
METHODE DE L'E.P.A.	4	44	17	9	4
	5	31	31	7	7
	6	21	32	4	7

ND : Non Détecté
T : Toxique

Tableau n° 39 - Comparaison du protocole sélectionné avec la méthode de l'E.P.A. - Echantillon n° 2

II - ETUDE COMPARATIVE DU PROTOCOLE SELECTIONNE ET DE LA METHODE EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - PEG

La technique d'élution concentration sélectionnée lors des expériences décrites précédemment est comparée à une méthode proposée par BIZIAGOS (1988). Ce protocole préconisé pour la recherche du virus de l'hépatite A dans les coquillages a été adapté au traitement d'un échantillon de boues fraîches primaires.

II.I - Protocole expérimental

Les expériences réalisées comparent 2 protocoles d'extraction-concentration des virus :

- Elution par une solution de lait écrémé 1 % pH=9 associée à un agitation magnétique et une ultrasonication. La concentration est réalisée par floculation organique.

- Elution par une solution d'extrait de boeuf à 3 % en tampon borate pH=9 avec agitation magnétique et sonication suivie d'une concentration par double précipitation avec le PEG 6000 (Figure n° 17).

Deux prélèvements de boues fraîches primaires ont été effectués à la station d'épuration de Nancy-Maxéville à deux dates différentes. Pour chaque prélèvement les deux protocoles ont été appliqués, chacun sur 3 prises d'essais de 40 g, soit 6 essais par prélèvement.

Les concentrats obtenus ont été inoculés sur cultures de cellules MA 104 à 3 dilutions : pur, 1/2, 1/5. Les résultats sont exprimés en UFP pour 40 g de culot de boue, en UFP par 100 ml de boues fraîches et UFP par gramme de poids sec.

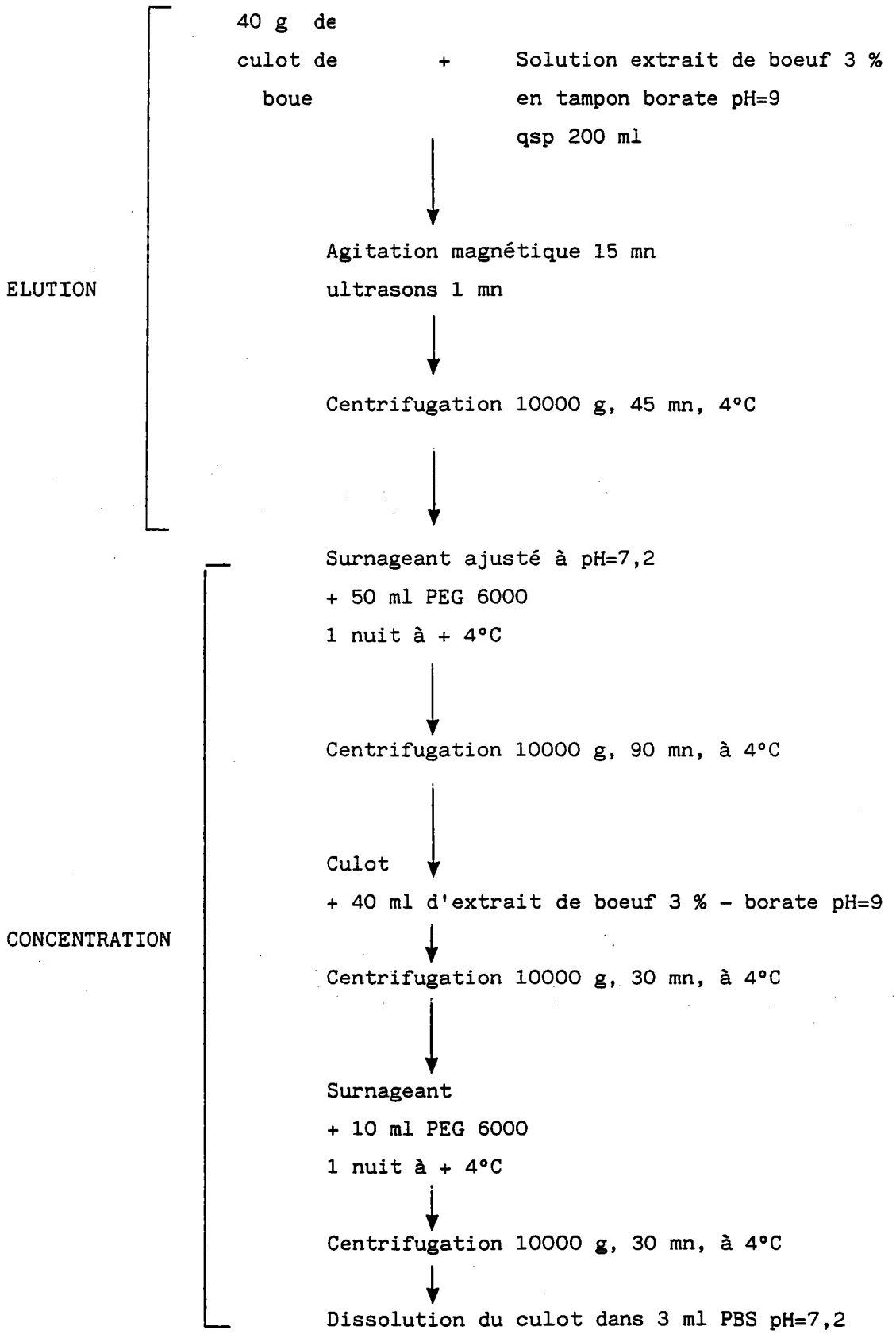


Figure n° 17 - Protocole utilisant l'élution par l'extrait de boeuf 3 % pH=9 suivie d'une concentration par le P.E.G. 6000

II.2 - Résultats

En ce qui concerne les dilutions de concentrat inoculées sur les cultures cellulaires, on observe que, avec les 2 méthodes, le concentrat non dilué provoque toujours une altération du tapis et se révèle toxique pour les cellules. Pour les dilutions 1/2 et 1/5 il n'a pas été constaté d'effet toxique.

Les résultats (tableau n° 40 et n° 41) sont présentés en tenant compte de la dilution permettant la détection du plus grand nombre d'UFP.

Le protocole fondé sur l'utilisation d'une solution d'extrait de boeuf3 %-PEG s'est, pour les deux prélèvements, révélé supérieur, permettant l'isolement de 2,2 à 3 fois plus de virus que la technique préconisée.

Par ailleurs, il est remarquable de constater que, avec la méthode extrait de boeuf 3 %-PEG les résultats obtenus, avec des prises d'essai identiques, sont très homogènes (de 77 à 98 UFP. 40 g^{-1} dans un échantillon, de 73 à 97 UFP. 40 g^{-1} dans le second échantillon). Au contraire, avec la méthode préconisée, l'hétérogénéité des valeurs obtenues est très grande (de 17 à 49 UFP. 40 g^{-1} et de 0 à 88 UFP. 40 g^{-1}).

Dans ces conditions le protocole fondé sur l'utilisation d'une solution à 3 % d'extrait de boeuf pH=9 avec agitation magnétique et sonication pour éluer les virus, associée à une concentration par double précipitation avec le P.E.G. 6000 donne de meileurs résultats que la méthode préconisée. Cependant l'importance des intervalles de confiance ne permet pas de conclure d'une manière significative en faveur de l'une ou de l'autre méthode.

TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	QUANTITE DE VIRUS				
	N° DE LA PRISE D'ESSAI	UFP.40 g^{-1} (culot)	TOTAL 120 g^{-1} (culot)	UFP.100 ml^{-1} (boues)	UFP.g^{-1} (poids sec)
SOLUTION LAIT ECREME 1 % pH=9 (AM.US.10) FLOCULATION ORGANIQUE	1	ND		ND	ND
	2	25	113	27,5	4,7
	3	88		97	17
EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 PEG	4	97		106	18
	5	80	250	88	15
	6	73		81	14

Tableau n° 40 - Comparaison du protocole sélectionné avec la méthode extrait de boeuf 3 % - PEG
Echantillon n° 1

TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	QUANTITE DE VIRUS				
	N° DE LA PRISE D'ESSAI	UFP.40 g^{-1} (culot)	TOTAL 120 g^{-1} (culot)	UFP.100 ml^{-1} (boues)	UFP g^{-1} (poids sec)
SOLUTION LAIT ECREME 1 % pH=9 (AM.US.10) FLOCULATION ORGANIQUE	1	17	85	16	1,7
	2	49		46	5
	3	19		17	1,8
EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 PEG	4	77	256	71	7,6
	5	81		75	8
	6	98		91	9,8

Tableau n° 41 - Comparaison du protocole sélectionné avec la méthode extrait de boeuf 3 % - PEG
Echantillon n° 2

III - CONCLUSION

L'étude comparative de la méthode d'extraction-concentration sélectionnée lors de notre étude vis à vis d'une part de la technique de référence EPA, d'autre part d'une technique associant une élution par une solution d'extrait de boeuf à 3 % et une concentration par précipitation avec le PEG a permis de montrer que cette dernière méthode présente des avantages non négligeables par rapport aux deux autres protocoles testés. En effet, même si du fait de l'importance des intervalles de confiance il n'est pas possible de conclure avec une assurance statistique, il apparaît que non seulement les quantités de virus retrouvés sont nettement plus élevées avec cette méthode mais que ces résultats présentent un remarquable reproductibilité en regard de l'hétérogénéité avec la méthode préconisée.

C H A P I T R E VII

RECHERCHE DU VIRUS DE L'HEPATITE A DANS LES BOUES FRAICHES PRIMAIRES

I - PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Compte tenu de l'impossibilité pratique d'isolement en routine du virus de l'hépatite A sur cultures cellulaires, la mise en évidence du virus a été réalisée par une méthode immunologique. Il est indispensable de souligner d'emblée que, par définition, ce type de technique décèle non pas le virus infectieux mais seulement l'antigène du virus.

La recherche de l'antigène du VHA a été réalisée au laboratoire de l'unité de biologie moléculaire du Centre de Recherches du Service de Santé des Armées de Grenoble (Dr DELOINCE) par radioimmunologie selon la méthode S.P.R.I.A. décrite dans le chapitre "Matériel et Méthodes II.4".

La recherche s'effectue en deux étapes :

- Détection de l'antigène
- Détermination de la spécificité de la réaction antigène -anticorps.

Elle a été appliquée à des prélèvements de boues fraîches primaires. Ceux-ci ont été soumis à un protocole d'extraction concentration des virus (Figure n° 18) qui comporte une phase d'élution suivie d'une phase de concentration.

L'éluat obtenu à l'issue de l'extraction et le concentrat final ont été soumis à l'analyse.

Trois méthodes d'extraction concentration ont été utilisées :

1) Elution par une solution de lait écrémé 1 % pH=9 suivie d'une concentration par floculation organique
2) Elution par solution de glycine 0,05 M pH=9 suivie de concentration par floculation organique
3) Elution par 3 % d'extrait de boeuf en tampon borate suivie d'une double précipitation par le P.E.G. 6000

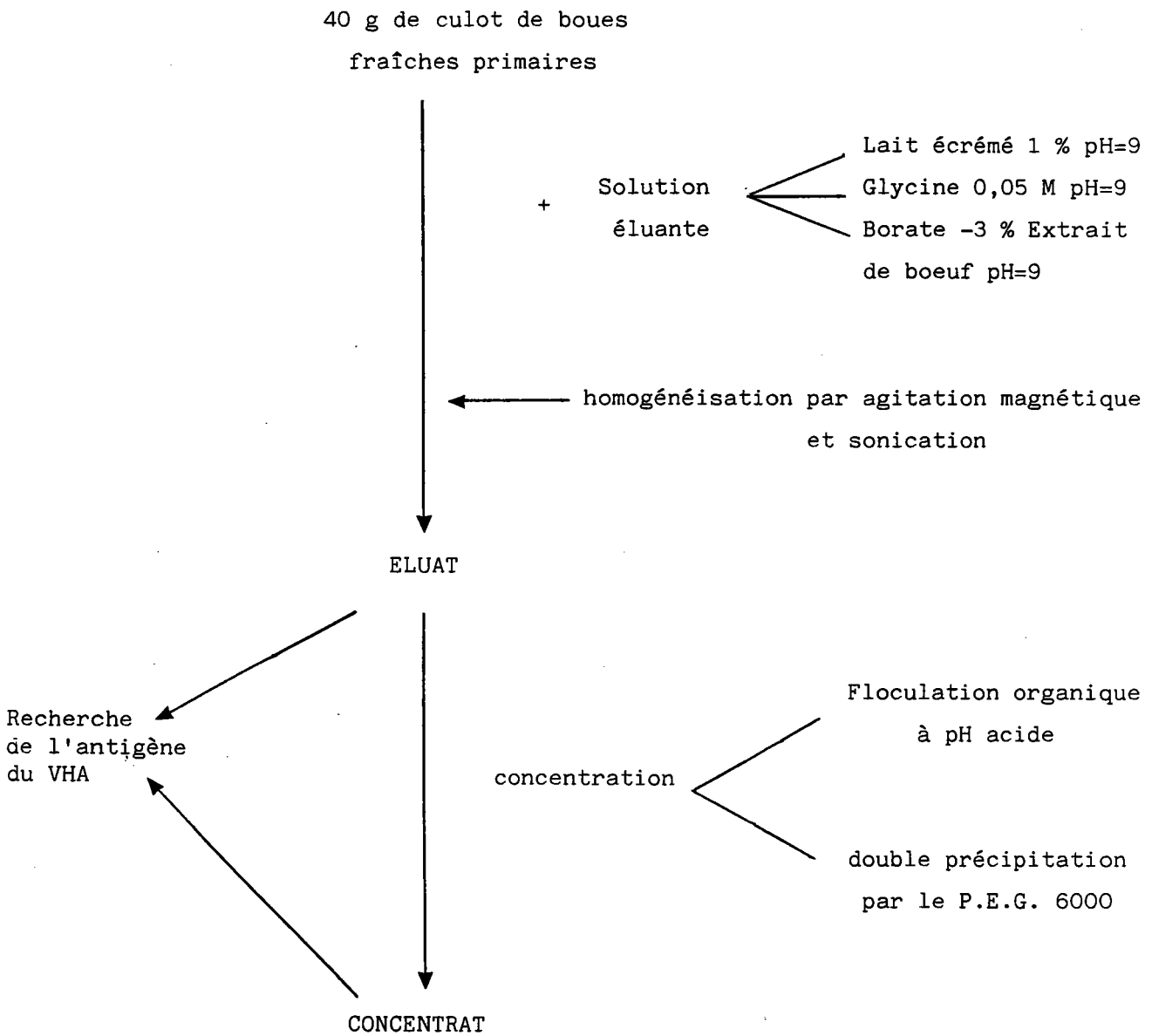


Figure n° 18 - Recherche du virus de l'hépatite A dans les boues

L'homogénéisation de la boue dans le liquide d'élution a été réalisée dans les trois méthodes par agitation magnétique et sonication.

A l'issue des opérations d'élution ou de concentration les solutions obtenues ont été immédiatement neutralisées puis congelées à - 70°C avant d'être soumises simultanément aux tests radioimmunologiques.

II - RESULTATS

II.1 - Recherche du virus de l'hépatite A dans les éluats

Elle a été réalisée sur deux échantillons de boues fraîches primaires différents et chaque méthode d'élution a été appliquée à deux prises d'essai de 40 g pour chaque échantillon.

Le test radioimmunologique a été réalisé à partir d'une fraction de chacun des 12 éluats obtenus et les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 42 .

Pour l'échantillon n° 1 tous les tests sont négatifs quelle que soit la solution éluante employée.

Pour l'échantillon n° 2 la réaction de détection s'est révélée positive avec les deux éluats obtenus à l'issue du traitement de la boue par une solution d'extrait de boeuf 3 % pH=9. Cependant, ces deux résultats positifs ne peuvent pas être pris en compte car le test de spécificité qui a été appliqué à ces deux éluats a été négatif montrant ainsi que la réaction de détection était faussement positive.

Il apparaît donc que dans les 12 éluats analysés le virus de l'hépatite A n'a pu être mis en évidence. Cette négativité peut être due soit à une absence de virus dans l'échantillon, soit à un mauvais rendement de la phase d'extraction par élution, soit à une trop faible concentration du virus dans l'éluat.

Pour vérifier cette dernière hypothèse, nous avons testé les concentrats correspondant aux éluats précédement analysés.

II.2 - Recherche du virus de l'hépatite A dans les concentrats

Dans un premier temps l'analyse a été effectuée sur les 12 concentrats correspondant aux deux échantillons de boues fraîches primaires traités en II.1.

Pour l'échantillon n° 1 les résultats (Tableau n° 43) montrent que le test de détection est positif uniquement avec les deux concentrats obtenus après élution par le protocole tampon borate - 3 % d'extrait de boeuf pH=9 et concentration par une double précipitation par le P.E.G. 6000. Cependant un seul de ces deux résultats est confirmé par le test de spécificité.

Pour l'échantillon n° 2, 4 concentrats sur 6 sont positifs au test de détection. Il s'agit des deux concentrats obtenus après traitement par le protocole tampon borate - extrait de boeuf - P.E.G. 6000 ainsi que des deux concentrats issus du traitement par le protocole "glycine - floculation organique".

L'épreuve de spécificité confirme la positivité d'un seul concentrat obtenu avec le protocole "tampon borate - extrait de boeuf - P.E.G.".

Ces résultats montrent d'une part que les deux échantillons de boues fraîches primaires analysés contenaient des antigènes du virus de l'hépatite A, d'autre part que la technique de détection a donné des résultats faussement positifs dans 4 cas sur 6, enfin que le seul protocole d'extraction concentration ayant permis d'obtenir des résultats positifs confirmés est celui faisant appel à l'élution par un tampon borate - 3 % d'extrait de boeuf pH=9 associé à une concentration par double précipitation avec le P.E.G. 6000.

Dans un second temps de façon à pouvoir confirmer ou infirmer ces premiers résultats, trois nouveaux échantillons de boues fraîches primaires ont été soumis à l'analyse avec les trois protocoles d'extraction concentration testés précédemment. Seuls les concentrats finaux ont été analysés par le test de détection et en cas de positivité par le test de spécificité, une seule prise d'essai étant étudiée avec chacun des protocoles.

ECHANTILLON	ELUTION	TEST RADIOIMMUNOLOGIQUE	
		DETECTION	SPECIFICITE
N° 1	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9	-	NE
	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9	-	NE
	LAIT ECREME 1 % pH=9	-	NE
	LAIT ECREME 1 % pH=9	-	NE
	GLYCINE 0,05 M pH=9	-	NE
	GLYCINE 0,05 M pH=9	-	NE
N° 2	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9	+	-
	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9	+	-
	LAIT ECREME 1 % pH=9	-	NE
	LAIT ECREME 1 % pH=9	-	NE
	GLYCINE 0,05 M pH=9	-	NE
	GLYCINE 0,05 M pH=9	-	NE

NE : Non Effectué

Tableau n°42 - Recherche de l'antigène du VHA dans les éluats

ECHANTILLON	PRISE D'ESSAI	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	TEST RADIOIMMUNOLOGIQUE	
			DETECTION	SPECIFICITE
N° 1	1	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	-
	2	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	+
	3	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	4	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	5	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	6	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
N° 2	1	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	-
	2	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	+
	3	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	4	LAIT ECREME1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	5	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-
	6	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-

NE : Non Effectué

Tableau n° 43 - Recherche de l'antigène du VHA dans les concentrats

ECHANTILLON	PRISE D'ESSAI	TECHNIQUE D'EXTRACTION CONCENTRATION	TEST RADIOIMMUNOLOGIQUE	
			DETECTION	SPECIFICITE
N° 3	1	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-
	2	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-
	3	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	+
N° 4	1	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-
	2	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	3	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 P.E.G.	+	+
N° 5	1	LAIT ECREME 1 % pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	-	NE
	2	GLYCINE 0,05 M pH=9 FLOCULATION ORGANIQUE	+	-
	3	EXTRAIT DE BOEUF 3 % pH=9 - P.E.G.	+	+

NE : Non Effectué

Tableau n° 44 - Recherche de l'antigène du VHA dans les concentrats

Les résultats sont rassemblés dans le tableau n° 44 . On constate que :

- pour le prélèvement n° 3 le test de détection est positif avec les trois concentrats mais seul le concentrat "borate - extrait de boeuf - P.E.G." est déclaré positif après l'épreuve de spécificité.

- pour le prélèvement n° 4 le test de détection est positif pour deux concentrats mais un seul s'avère positif après réalisation du test de spécificité. Il s'agit de celui obtenu avec le protocole "tampon borate - extrait de boeuf - P.E.G.".

- pour le prélèvement n° 5 deux concentrats sont positifs à l'épreuve de détection mais seul le concentrat obtenu avec le protocole "tampon borate - extrait de boeuf - P.E.G." est confirmé dans sa positivité par le test de spécificité.

III - CONCLUSION

A l'issue de cette recherche du virus de l'hépatite A dans les boues il apparaît que :

- sur le plan de la contamination des boues fraîches primaires, les 5 échantillons analysés prélevés à des dates différentes se sont tous révélés positifs.
. d'une part l'analyse des éluats ne permet pas la mise en évidence de l'antigène et il est donc impératif de concentrer les éluats avant de pratiquer l'analyse.
. d'autre part le seul protocole d'extraction-concentration permettant la mise en évidence des antigènes du VHA est celui fondé sur l'élution par un tampon borate - 3 % d'extrait de boeuf pH=9 et une concentration par une double précipitation par le P.E.G. 6000.

Par ailleurs, on observe des discordances très importantes entre les résultats du test de détection et ceux du test de confirmation. En effet, sur 13 échantillons déclarés positifs en détection, seuls 5 ont

été confirmés par le test de positivité. Il est donc absolument impératif d'effectuer systématiquement un test de confirmation.

Enfin, il est nécessaire de s'interroger sur la signification et la valeur d'un test radioimmunologique appliqué à la recherche du virus de l'hépatite A dans un milieu environnemental tel que les boues.

En effet ce test met uniquement en évidence des antigènes et il permet en cas de positivité de conclure à la présence d'antigène du virus de l'hépatite A et ne permet en aucun cas d'affirmer la présence du virus infectieux. Celle-ci ne peut être rapportée qu'après culture positive sur des cellules in-vitro.

BIZIAGOS et al. (1987) ont certes montré que dans de l'eau distillée artificiellement contaminée par du VHA, les pourcentages de récupération obtenues par détection de l'antigène (76 % à 85 %) n'étaient pas significativement différents de ceux obtenus par cultures cellulaires (89 % à 97 %). Cependant il s'agissait d'eau distillée et d'une contamination artificielle avec du virus purifié ce qui représente des conditions nettement différentes de celles rencontrées dans des boues de station d'épuration, milieu très complexe dans lequel les virus ont subi la pression de divers facteurs agressifs qui sont susceptibles d'avoir détruit le potentiel infectieux en laissant intact les antigènes.

Il semble donc nécessaire d'être extrêmement prudent dans l'interprétation des tests immunologiques appliqués à des produits de l'environnement et de bien spécifier que seuls les antigènes sont mis en évidence. La présence d'antigène VHA prouve uniquement que ce virus a été ou est présent dans le milieu.

C H A P I T R E VIII

CONCLUSION - DISCUSSION

L'évaluation du risque virologique dans le milieu hydrique devient de plus en plus utile. En effet, il existe une tendance de plus en plus prononcée à utiliser soit des eaux usées, soit des boues résiduaires en irrigation ou en amendement agricole avec comme conséquence un risque non négligeable de contamination d'une part des produits maraîchers consommés crus, d'autre part des eaux profondes.

Par ailleurs la contamination du domaine maritime côtier par des rejets urbains et la pollution des sédiments qui en découle pose le problème de la protection et de la surveillance des zones conchylicoles.

Si comme l'indiquent PROST et BOUTIN (1989) le risque virologique ne doit pas être surestimé, il n'en demeure pas moins qu'il est indispensable de disposer de moyens techniques nécessaires pour déterminer le niveau de contamination des différents éléments du milieu hydrique.

De très nombreuses méthodes de mise en évidence des virus entériques dans les boues et les sédiments ont été décrites dans la littérature mais aucune n'est suffisamment sensible pour détecter la présence de faibles quantités de virus. Dans ces conditions nous avons entrepris d'étudier la première étape de l'analyse virologique des boues et des sédiments c'est-à-dire l'extraction des virus à partir des milieux solides. En effet, aussi bien au niveau des boues que des sédiments, les virus sont fortement adsorbés sur les particules solides et il est difficile de les en séparer sans risquer d'altérer leur structure. Pour ce faire nous avons envisagé l'influence de quatre paramètres fondamentaux (la nature de l'éluant, la concentration de la boue dans l'éluant, le mode d'homogénéisation de la boue dans l'éluant et l'usage des ultrasons) régissant l'élution des particules virales de leur support.

Dans un premier temps des essais préliminaires ont été réalisés en contaminant artificiellement avec du poliovirus 1 des boues fraîches primaires. Parmi les trois éluants testés, la solution d'extrait de boeuf à 10 % pH=9 a présenté une efficacité très supérieure avec des rendements de récupération de 54 à 80 %. Le haut niveau de récupération est comparable à ceux rapportés dans la littérature.

Cependant, il ne faut pas perdre de vue qu'avec une contamination artificielle des boues, les virus sont placés dans des conditions très différentes de celles existant en milieu naturel lors de la formation de boues. Il est très vraisemblable que la situation des virus, notamment au niveau de l'adsorption n'est pas comparable.

L'essentiel du travail a donc été réalisé à partir d'échantillons naturels prélevés sur le terrain. Les virus recherchés sont ceux qui provoquent un effet cytopathique sur les cultures cellulaires in vitro.

L'analyse des boues ayant subi une digestion anaérobie s'est révélée très décevante car le nombre d'échantillons positifs et les concentrations virales observées sont extrêmement faibles. De ce fait, il n'a pas été possible de tirer des conclusions valables quant à l'efficacité des protocoles testés mais ces résultats ont mis en évidence soit la faible sensibilité des méthodes d'extraction lorsqu'elles sont appliquées à des échantillons de terrain, soit le très faible taux de contamination virale de ce milieu.

L'étude des boues fraîches primaires a permis de sélectionner avec chacun des trois éluants, un protocole optimum pour l'extraction virale. En fonction des résultats obtenus chacun de ces trois protocoles a été étudié comparativement. Deux techniques fondées sur l'élution, soit par une solution de glycine 0,05 M pH=9, soit par une solution de lait écrémé 1 % pH=9 ont permis l'obtention des meilleures récupérations. Par contre, l'élution par une solution d'extrait de boeuf 10 % pH=9 a donné des résultats nettement inférieurs. La concentration des virus présents dans les éluats est effectuée dans tous les cas à l'aide d'une floculation organique à pH acide. Compte tenu des conditions de réalisation pratique de la phase de concentration, nous préconisons pour l'analyse des boues fraîches primaires un protocole utilisant une solution éluante à 1 % de lait écrémé pH=9 associé à une agitation magnétique suivie d'une ultrasonication, la concentration des boues dans l'éluant étant de 10 %.

De façon à valider la méthode préconisée celle-ci a été confrontée d'une part à la technique de référence de l'Environmental Protection Agency (E.P.A.) et d'autre part à celle proposée pour l'analyse des coquillages par BIZIAGOS (1988). Si la technique que nous avons préconisée donne des résultats peu différents de ceux obtenus avec la méthode de l'E.P.A., par contre la méthode proposée par BIZIAGOS présente des avantages non négligeables. En effet, non seulement les quantités de virus retrouvés sont nettement plus élevées mais en plus les résultats présentent une remarquable homogénéité par rapport à l'hétérogénéité constatée avec les autres méthodes.

Compte tenu de l'importance de l'hépatite A et des résultats précédemment obtenus, trois protocoles d'extraction-concentration ont été appliqués à la recherche du VHA :

1) Elution par une solution de lait écrémé 1 % pH=9 suivie d'une concentration par floculation organique
2) Elution par solution de glycine 0,05 M pH=9 suivie de concentration par floculation organique
3) Elution par 3 % d'extrait de boeuf en tampon borate suivie d'une double précipitation par le P.E.G. 6000.

La détection du VHA est réalisée par une méthode radio-immunologique.

Tous les échantillons de boues fraîches primaires contenaient des antigènes du VHA. Sur le plan méthodologique, seule l'élution par un tampon borate à 3 % d'extrait de boeuf pH=9 suivie d'une concentration par double précipitation par le P.E.G. 6000 a permis l'obtention de résultats positifs.

Il semblerait donc pour la recherche des entérovirus classiques comme pour le VHA que la concentration des éluats par le P.E.G. 6000 à pH=7 présente des avantages très importants par rapport à la floculation organique à pH acide.

Des sédiments fluviaux et marins prélevés sur le site de Morlaix ont par aileurs été soumis à l'analyse virologique en utilisant trois protocoles d'extraction différents : l'un proposé par BOSCH et al. (1988), pour l'analyse de sédiments marins, les deux autres correspondant aux méthodes sélectionnées pour les boues et utilisant les solutions de lait écrémé à 1 % et de glycine 0,05 M pH=9 comme éluant.

La méthode fondée sur l'élution par la solution de lait écrémé permet de récupérer la plus grande quantité de particules virales mais qualitativement, elle ne peut pas être distinguée de la méthode de BOSCH et al. (1988). En fait, il a été montré qu'il serait intéressant d'appliquer ces deux méthodes simultanément sur un même échantillon car le pourcentage d'échantillons positifs passe de 50 à 75 %.

A L'issue de ce travail il apparait que l'efficacité des méthodes d'extraction des virus est différente selon la nature du milieu analysé et des virus contaminants. Il est souhaitable que les différents résultats obtenus tant au niveau de l'élution que de la concentration servent de base à des études ultérieures qui sont indispensables pour tenter d'améliorer le rendement et surtout la sensibilité des méthodes de récupération des virus à partir des boues et des sédiments.

ANNEXES

COMPOSITION DU MINIMUM ESSENTIAL MEDIUM (MEM) DE EAGLE

Amino-acides :	m/l
L-arginine	126,0
L-cystine	24,0
L-glutamine	292,0
L-histidine HCl-H_2O	42,0
L-leucine	52,4
L-isoleucine	52,5
L-lysine HCl	73,0
L-méthionine	15,0
L-phénylalanine	33,0
L-thréonine	48,0
L-tryptophane	10,0
L-tyrosine	36,0
L-valine	47,0

Vitamines :	
Acide folique	1,0
Biotine	1,0
Choline, chlorure	1,0
L-inositol	2,0
Nicotinamide	1,0
D-Ca pantothénate	1,0
Pyridoxal HCl	1,0
Riboflavine	0,01
Thiamine HCl	1,0

Solution saline équilibrée de Earle :	
NaCl	6800,0
KCl	400,0
$CaCl_2$, $2H_2O$	266,0
$MgSO_4$, $2H_2O$	140,0
$NaHCO_3$	2200,0
Glucose	1000,0
Rouge de phénol	10,0

Référence : MEM 0011 - Eurobio.

SOLUTION DE TRYPSINE

. 2,5 g de trypsine 1/250 (conservé à + 4°C) ou difco en salle de virologie
. 0,2 g de versène (titriplex III)
. Solution de lavage qsp 1000 ml
pH 7,0 - 7,2
. Stérilisation par filtration, répartition : 50 ml/flacon
. Conservation à + 4°C

SOLUTION DE LAVAGE : P.B.S. MODIFIE

. 1000 ml d'eau désionisée
. Ajouter dans l'ordre suivant :
- 8 g NaCl
- 0,20 g KCl
- 1,15 g Na_2 H PO_4, $2H_2O$ ou 2,57 g de Na_2 HPO_4, $12H_2O$

pH 7,3, répartition 30 à 40 ml par flacon
. Stérilisation 120°C 20 minutes
. Conservation à +4°C

COMPOSITION DES SOLUTIONS UTILISEES POUR LA DECONTAMINATION

Solution d'antibiotiques

. Spécilline G (spécia)	10 millions d'unités
. Streptomycine (Diamant)	10 grammes
. Néomycine	1,5 gramme
. Eau bidistillée stérile	q.s.p. 100 ml

Répartir sous de petits volumes
A conserver au congélateur.

Solution d'amphotéricine B

. Amphotéricine B	5 mg
. Eau bidistillée stérile	q.s.p. 100 ml

Répartir sous de petits volumes
A conserver à +4°C.

Ces solutions sont utilisées à raison de 0,1 ml par ml d'échantillon.

COMPOSITION DU MILIEU GELOSE POUR LA TECHNIQUE DES PLAGES EN PRESENCE DE COLORANT VITAL

. MEM 2 X

2 sachets de MEM sans colorant et sans glutamine
100 ml de glutamine
environ 30 g bicarbonate
eau bidistillée q.s.p. 4850 ml
vérifier le pH = 6,8
stériliser par filtration.

. MILIEU GELOSE

. MEM 2 X	200 ml
. Sérum de veau foetal décomplementé	38 ml
. Gélose à 27 g/litre	200 ml
. Antibiotiques	4 ml
. Fungizone (250 ug/ml)	2 ml

COMPOSITION DU MILIEU NUTRITIF POUR LA TECHNIQUE DES PLAGES SANS COLORANT VITAL

. MEM 2 X

MEM 10 x C sachet pour 5 litres de milieu sans bicarbonate avec glutamine	1 sachet
$NaHCO_3$	3,5 g
$MgCl_2$, $6H_2O$ à 1 %	50 ml ou 0,5 g
Spécilline 10^4 UI/ml Streptomycine 10^4 ug/ml	50 ml
Amphotéricine B 250 ug/ml	50 ml
Sérum de veau foetal décomplémenté (30 mn à 56°C)	100 ml
Eau bidistillée	q.s.p. 2500 ml

Stériliser par filtration (0,22 µm)

. GELOSE

Bacto Agar	1,5 g
Eau désionisée	q.s.p. 1000 ml

Répartir en erlens, autoclaver à 120°C pendant 20 minutes

Mélanger la gélose et le MEM 2X volume à volume.

PREPARATION DU PEG, SOLUTION A 50 % P/V

- 90 ml de PBS
- 12 g NaCl
- 80 g PEG 6000

ajouter progressivement le PEG dans le PBS car il se dissout difficilement et mélanger jusqu'à ce que la solution soit limpide.

compléter à 160 ml final par du PBS

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABID S.H., LUE-HING C., SEDITA S. (1978)
Development of a method for concentrating enterovirus in anaerobically digested sludge
Report 78-13. The metropolitan Sanitary District of greater CHICAGO

AGBALIKA F. (1985)
Contribution à l'étude du virus de l'hépatite A (VHA) dans les eaux : techniques de concentration et mise en évidence par immuno-enzymologie
D.E.A. Alimentation Nutrition. Université de Nancy I.

ALBERT M., GOULON C., SCHWARTZBROD L. (1988)
Recovery of virus from sludge
Z. gesamte Hyg., 34, Heft 9 516-517.

APHA (1980)
Standard methods for the examination of water and wastewater, 15th edition. American Public Health Association, Washington, D.C.

BARRON A.L. and OLSHEVSKY C., COHEN M.M. (1970)
Characteristics of the BGM line of cells from african green monkey Kidney.
Arch. Ges. Virusforsch., 32, 389-392.

BATES J. and GODDARD M.R. (1980)
Recovery of seeded viruses from activated sludge in "Viruses and wastewater treatment".
Goddard M.R. and Butler M. édit 205-209. PERGAMON Publishers.

BENNANI A. (1981)
Contribution à l'étude épidémiologique et au diagnostic des infections à rotavirus par microscopie électronique et immunoenzymologie.
Thèse de doctorat es Sciences Pharmaceutiques, Université de Nancy I,n° 5

BERG G. (1973) a
Removal of virus from sewage, effluents and waters
1. A review
Bull. W.H.O., 49, 451-460.

BERG G. (1973) b
Removal of virus from sewage, effluents and waters
2. Present and futur trends
Bull. W.H.O., 49, 461-469.

BERG G. and BERMAN D. (1980)
Destruction by anaerobic mesophilic and thermophilic digestion of viruses and indicator bacteria indigenous to domestic sludges
Appl. Environ. Microbiol., 39, 361-368.

BERG G. and DAHLING D.R. (1980)
Method for recovering viruses from river water solids.
Appl. Environ. Microbiol., 39, 850-853.

BERG G., SULLIVAN G., VENOSA A.D. (1988)
Low temperature stability of viruses in sludges
Appl. Environ. Microbiol., 54, 839-841.

BERG G. and SULLIVAN G. (1988)
Optimum pH levels for eluting enteroviruses from sludge solids with beef extract
Appl. Environ. Microbiol., 54, 1880-1881.

BERMAN D., BERG G. and SAFFERMAN R.S. (1981)
A method for recovering viruses from sludges
J. Virol. Methods, 3, 283-291.

BITTON G. (1975)
Adsorption of viruses onto surfaces in soil and water
Water Res., 9, 473-484.

BITTON G. (1980)
Introduction to environmental virology
John Wiley and sons, New-York, 326 p.

BITTON G., CHOU Y.J. and FARRAH S.R. (1982)
Technique for virus detection in aquatic sediments
J. Virol. Methods, 4, 1-8.

BITTON G., FELDBERG B.N. and FARRAH S.R. (1979)
Concentration of enterovirus from seawater and tap water by organic floculation using non fat dry milk and casein
Water Air Soil Pollut., 12, 187-195.

BITTON G., PANCORBO O.C. and FARRAH S.R. (1984)
Virus transport and survival after land application of sewage sludge
Appl. Environ. Microbiol., 47, 905-909.

BIZIAGOS E. (1988)
Communication personnelle : Recherche du VHA dans l'eau et les coquillages.

BIZIAGOS E. (1989)
Virus de l'hépatite A : méthodes d'étude dans les milieux hydriques. Effet de substances antivirales sur la multiplication in vitro
Doctorat de l'Université Cl. Bernard, Lyon 1, 170 p.

BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M., AGBALIKA F., LAVERAN H. and DELOINCE R. (1987)
Concentration of hepatitis A virus
Water Res., 21, 683-686.

BIZIAGOS E., PASSAGOT J., CRANCE J.M. and DELOINCE R. (1988) a
Long term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water
Appl. Environ. Microbiol., 54, 2705-2710.

BIZIAGOS E., PASSAGOT J., PONS M., CRANCE J.M. et DELOINCE R. (1988) b
Recherche du virus de l'hépatite A dans l'eau.
112ème congrès national des Sociétés Savantes, Lyon
Sciences, histoire des sciences et des techniques, 149-156.
Editions du Comité des Travaux Historiques et Scientifiques, Paris.

BLOCK J.C. (1983)
Viruses in environmental waters in : Viral Pollution of the environment.
C.R.C. Press, Boca Raton, 117-145.
Edited by G. BERG

BLOCK J.C., COLLIN J.F., JORET J.C., ROLLAND D. et FOLIGUET J.M. (1978)
Elimination des entérovirus au cours du traitement par boues activées des eaux usées urbaines.
Comm. Hydr. Appl. A.G..H.T.M., Bordeaux.

BLOCK J.C. and SCHWARTZBROD L. (1989)
Viruses in water systems : detection and identification.
V.C.H. publishers, New-York, 136 p.

BOSCH A., LUCENA F., GIRONES R and JOFRE J. (1986)
Survey of viral pollution in Besos river (Barcelona)
J. Water Pollut. Control Fed., 58, 87-91.

BOSCH A., LUCENA F.,GIRONES R. and JOFRE J. (1988)
Occurence of enteroviruses on marine sediment along the coast of Barcelona (Spain)
Can. J. Microbiol., 34, 921-924.

BOSCH A., LUCENA F. and JOFRE J. (1986) .
Fate of human enteric viruses (rotaviruses and enteroviruses) in sewage after primary sedimentation.
Wat. Sci. Techn., 18, 47-52.

BRASHEAR D.A. and WARD R.L. (1982)
Comparaison of methods for recovering indigenous viruses from raw wastewater sludge
Appl. Environ. Microbiol., 43, 1413-1418.

BRASHEAR D.A. and WARD R.L. (1983)
Inactivation of indigenous viruses in raw sludge by air drying
Appl. Environ. Microbiol., 45, 1943-1945.

BRYDEN A.S., DAWIES H.A, THOU LESS M.E. and FLEWETT T.H. (1977)
Diagnosis of rotavirus infection by cell culture
J. Med. Microbiol., 10, 121-125.

BURAS N. (1974)
Recovery of viruses from wastewater and effluent by the direct inoculation method
Water Res., 8, 19-22.

CARRE J., BARON D., LEGERS M. et MAURIN J. (1986)
Charges en métaux lourds, bactéries et virus, présents dans les boues d'une station d'épuration par lagunage naturel.
Environ. Techn. Letters, 7, 119-127

CLARKE N.A. (1961)
Removal of enteric viruses from sewage by activated sludge treatment
Am. J. Public Health, 51, 1118-1120.

COLLIN J.F. (1977)
Contribution à l'étude microbiologique des boues activées.
D.E.A. Alimentation Nutrition. Université Nancy I.

DE LEON R., SINGH S.N., ROSE J.B., MULLINAY R.L., MUSIAL C.E., KUTZ S.M., SINCLAIR N.A. and GERBH C.P. (1986)
Microorganisms removal from wastewater by rapid mixed media filtration
Water Res., 20, 583-587.

DIVIZIA M., DE FILIPPIS P., DI NAPOLI A., VENUTI A., PEREZ BERCOFF and PANA A. (1989)
Isolation of wild type hepatitis A virus from the environment
Water Res., 23, 1155-1160.

DIZER H., NASSER A., and LOPEZ J.M. (1984)
Penetration of different human pathogenic viruses into sand column percolated with distilled water, groundwater or wastewater
Appl. Environ. Microbiol., 47, 409-415.

DOW M.A., LOH P.C. and FUJIOKA R.S. (1988)
A rapid nitrocellulose enzyme immunosorbent assay technique (NC-EIA) for monitoring viruses in the environment
Wat. Sci. Tech., 20, 421-423.

DUBROU S., PREVOT J. et FESTY B. (1989)
Evaluation des méthodes d'élution des virus à partir de boues résiduaires séchées sur lit
J. Fr. Hydrol., 20, 55-64.

E.P.A. : Environmental Protection Agency (1984)
USEPA manual of methods for virology
United States E.P.A., Research and Development, 600/4-84-013.

FARRAH S.R., GERBA C.P., WALLIS C. and MELNICK J.L. (1976)
Concentration of viruses from larges volumes of tap water using pleated membrane filters.
Appl. Environ. Microbiol., 31, 221-226.

FARRAH S.R., SCHEUERMAN P.R. and BITTON G. (1981)
Urea-lysine method for recovery of enteroviruses from sludge
Appl. Environ. Microbiol., 41, 455-458.

FATTAL B., GUTTMAN-BASS N., AGURSKY T. and SHUVAL H.I. (1988)
Evaluation of health risk associated with drinking water quality in agricultural communities.
Wat. Sci. Tech., 20, 409-415.

FENTERS J., REED J., LUE-HING C. and BERTUCI J. (1979)
Inactivation of viruses by digested sludge components
J. Water Pollut. Control Fed., 51, 689-694.

FLEHMIG B. (1980)
Hepatitis A virus in cell culture
I - Propagation of different hepatitis A virus isolates in a fetal rhesus monkey cell line (Frhk-4)
Med. Microbiol. Immunol., 168, 239-248.

FRINOT C. (1987)
Etude comparative de méthodes de concentration des entérovirus dans les boues de station d'épuration, influence de la 5.Iodo 2.Déoxyuridine pour la détection de ces virus sur cultures de cellules.
Doctorat de l'université de Nancy I, 217 p.

FRINOT C. et HARTEMANN Ph. (1989)
Etude virologique des boues résiduaires en vue de leur valorisation en agriculture : étude comparative des techniques d'analyses
J. Fr. Hydrol., 20, 43-54.

GERBA C.P. (1984)
Applied an theoretical aspects of virus adsorption to surface
Adv. Appl. Microbiol., 30, 133-168.

GERBA C.P. and GOYAL S.M. (1986)
Development of a qualitative pathogen risk assessment methodology for ocean disposal of municipal sludge
U.S. Environmental Protection Agency, ELAO CIN - 943 CINCINNATI, OH

GERBA C.P. and GOYAL S.M. (1988)
Enteric virus : risk assesment of ocean disposal of sewage sludge
In Proceedings International conference on water and wastewater microbiology, Newport Beach California, USA. February 8-11, 1988.

GERBA C.P., SMITH E.M. and MELNINCK J.L. (1977)
Development of a quantitative method of detecting enteroviruses in estuarine sediments.
Appl. Environ. Microbiol., 34, 158-163.

GERBA C.P., STAGG C.H. and ABADIE M.C. (1978)
Characterization of sewage solid associated viruses and behavior in natural waters
Water Res., 12, 805-812.

GLASS J.S., van LUIS R.J. and YANKO W.A. (1978)
Pratical method for detecting poliovirus in anaerobic digester sludge
Appl. Environ. Microbiol., 35, 983-985.

GODDARD M.R., BATES J. and BUTLER M. (1981)
Recovery of indigenous enteroviruses from raw and digested sewage sludges
Appl. Environ. Microbiol., 42, 1023-1028.

GODDARD M.R., BATES J. and BUTLER M. (1982)
Isolation of indigenous enteroviruses from chemically treated and dewatered sludge samples
Appl. Environ. Microbiol., 44, 1042-1046.

GOYAL S.M., ADAM W.N., O'MALLEY M. and LEAR D.W. (1984) a
Human pathogenic viruses at sewage sludge disposal sites in the middle atlantic region
Appl. Environ. Microbiol., 48, 758-763.

GOYAL S.M., RADEMACHER R.A. and POMEROY K.A. (1987)
Comparison of electron microscopy with three commercial test for the detection of rotavirus in animal feces
Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 6, 249-254.

GOYAL S.M., SCHAUB S.A., WELLINGS F.M., BERMANN D., GLASS J.S., HURST C.J., BRASHEAR D.A., SORBER C.A., MOORE B.E., BITTON G., GIBBS P.H. and FARRAH S.R., (1984) b
Round robin investigation of methods for recovering human enteric viruses from sludge
Appl. Environ. Microbiol., 48, 531-538.

GUILLAUD J.F. (1988)
Programme Rejets urbains en mer. Etat d'avancement des études sur le site de Morlaix. Rapport IFREMER, Brest.
DERO - 88 - 24 - EL.

GUTTMAN-BASS N. and NASSER A. (1984)
Simultaneous concentration of four enteroviruses from tap, waste and natural waters
Appl. Environ. Microbiol., 47, 1311-1315.

HAMPARIAN V.V., OTTOLENGHI A.C. and HUGHES J.H. (1985)
Enterovirus in sludge : multiyear experience with four wastewater treatment plants
Appl. Environ. Microbiol., 50, 280-286.

HUGUES B., PIETRI Ch., PUEL D., CRANCE J.M., CINI C. and DELOINCE R. (1988)
Research of enterovirus, hepatitis A virus in a bathing aera over a six mounth period and their salubrity impact
Zbl. Backt. Hyg. B., 185, 560-568.

HURST C.J. (1988)
Effect of environmental variables on enteric virus survival in surface freshwaters in Proceedings International conference on water and wastewater microbiology.
New Port Beach, California, USA, February 8-11, volume 2

HURST C.J., DAHLING D.R., SAFFERMAN R.S and GOYKE T (1984)
Comparison of commercial beef extracts and similar materials for recovering viruses from environmental samples.
Can. J. Microbiol., 30, 1253-1262.

HURST C.J., FARRAH S.R., GERBA C.P., MELNICK J.L. (1978)
Development of quantitative methods for the detection of enteroviruses in sewage sludges during activation and following land disposal
Appl. Environ. Microbiol., 36, 81-89.

HURST C.J., GERBA C.P. and CECH I. (1980) a
Effects of environmental variables and soil characteristics on virus survival in soil
Appl. Environ. Microbiol., 40, 1067-1079.

HURST C.J., GERBA C.P., LANCE C.J. and RICE R.C. (1980) b
Survival of enteroviruses in rapid filtration basins during the land application of wastewater
Appl. Environ. Microbiol., 40, 192-200.

HURST C.J., and GOYKE T. (1986)
Improved method for recovery of enteric viruses from wastewater sludges
Water Res., 10, 1321-1324.

IRVING L. and SMITH F.A. (1981)
One year survey of enteroviruses, adenoviruses and reoviruses isolated from effluent at an activated sludge purification plant
Appl. Environ. Microbiol., 41, 51-59.

JANSONS J., EDMONDS L.W., SPEIGHT B. and BUCENS M.R. (1989) a
Survival of viruses in ground water
Water Res., 23, 301-306.

JANSONS J., EDMONDS L.W., SPEIGHT B. and BUCENS M.R. (1989) b
Movement of viruses after artificial recharge
Water Res., 23, 293-299.

JOHNSON R.A., ELLENDER R.D. and TSAI S.C. (1984)
Elution of enterovic viruses from sediments with lecithin supplemented eluents
Appl. Environ. Microbiol., 48, 581-585.

KAPLIKIAN A.Z., WYATT R.L., DOLIN R., THORNHILL T.S., KALICA A.R. and CHANOK R.M. (1972)
Visualization by immunoelectron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infection non bacterial gastroenteritis
J. Virol., 10, 1075-1081.

KATZENELSON E., FATTAL B. and HOSTOVESKY T. (1976)
Organic method for the detection of viruses in tap water
Appl. Environ. Microbiol., 32, 638-639.

KEDMI S. and FATTAL B. (1981)
Effectiveness of the organic flocculation method in concentrating echovirus 7 and coxsackievirus A9 from water
Water Res., 15, 13-15.

KNOWLTON D.R and WARD R.L. (1987)
Characterization of virucidal agents in activated sludge
Appl. Environ. Microbiol., 53, 621-626.

KRIKELIS V., MARKOULATOS P. and SPYROU N. (1986)
Viral pollution of coastal waters resulting from the disposal of untreated sewage effluents
Wat. Sci. Tech., 18, 43-48.

LABELLE R.L., GERBA C.P., GOYAL S.M., MELNICK J.L., CECH I. and BOGDAN G.F. (1980)
Relationships between environmental factors, bacterial indicators and the occurence of enteric viruses in estuarine sediments
Appl. Environ. Microbiol., 39, 588-596.

LANDRY E.F., VAUGHN J.M. and PENELLO W.F. (1980)
Poliovirus retention in 75 cm soil cores after sewage and rainwater application
Appl. Environ. Microbiol., 40, 1032-1038.

LANDRY E.F., VAUCHN J.M., VICALE T.J. and MANN R. (1983)
Accumulation of sediment-associated viruses in shellfish
Appl. Environ. Microbiol., 45, 238-247.

LE BRIS J.M., BILLAUDEL S., BERTRAND P., LOUKOU G. et COURTIEU A.L. (1983)
Recherche des virus et des salmonelles dans la Loire par une méthode d'adsorption-élution sur filtres en microfibre de verre
Tech. Sci. Munic., L'eau, 6, 303-306.

LEWIS G.D., AUSTIN F.J., LOUTIT M.W. and SHARPLES K. (1986)
Enterovirus removal from sewage
Water Res., 20, 1291-1297

LEWIS G.D. and METCALF T.C. (1988)
Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water and sediment samples
Appl. Environ. Microbiol., 54, 1983-1988.

LEWIS M.A., NATH M.W. and JOHNSON J.C. (1983)
A multiple extraction-centrifugation method for the recovery of viruses from wastewater treatment plant effluents and sludges
Can. J. Microbiol., 29, 1661-1670.

LIEW P. and GERBA C.P. (1980)
Thermostabilization of enteroviruses by estuarine sediment
Appl. Environ. Microbiol., 40, 305-308.

LUND E. (1971)
Observations on the virus binding capacity of sludge
In S.H. JENKINS, Advances in Water Pollution Research, Proceeding of the Fifth International Conference in San Francisco and Hawaï 1970, Pergamon Press, Oxford, 1971, 1, p. 1-24/1 - 1-24/5.

MAC CONNELL L.K., SIMS R.C. and BARNETT B.B. (1984)
Reovirus removal and inactivation by slow rate sand filtration
Appl. Environ. Microbiol., 48, 818-825.

MAC NULTY M.S., ALLAN G.M. and MAC FERRAN J.B. (1977)
Cell culture studies with a cytopathic bovine rotavirus
Arch. Virol. 54, 201-209.

MARTINS M.T., SOARES L.A., MARQUES E. and MOLINA A.G. (1983)
Human enteric viruses isolated from influents of sewage treatment plants in Sao Paulo, Brazil
Wat. Sci. Tech., 15, 69-73.

MELNICK J.L., SAFFERMAN R., RAO V.C., GOYAL S., BERG G., DAHLING D.R., WRIGHT B.A., AKIN E., STETLER R., SORBER C., MOORE B., SOBSEY M.D., MOORE R., LEWIS A.L. and WELLINGS F.M. (1984)
Round robin investigation of methods for the recovery of poliovirus from drinking water
Appl. Environ. Microbiol., 38, 365-368.

METCALF T.C., RAO V.C. and MELNICK J.L. (1984)
Solid associated viruses in a polluted estuary
Monog. Virol. 15, 97-110.

MOORE B.E., SAGIK B.P. and SORBER C.A. (1978)
Land application of sludges : minimizing the impact of viruses on water resources
In the proceedings of the conference on "Risk assessment and health effects of land application of municipal wastewater and sludges", 154-167.

MORRIS R. (1984)
Reduction of naturally occuring enteroviruses by wastewater treatment processes
J. Hyg. Camb., 92, 97-103.

MORRIS R. and WAITE W.M. (1980)
Evaluation of procedures for recovery of viruses from water
1 - Concentration systems
Water Res., 14, 791-793.

NIELSEN A.L. and LYDHOLM B. (1980)
Methods for the isolation of virus from raw and digested wastewater sludge
Water Res., 14,175-178.

ORAGUI J.I. and MARA D.D. (1989)
Simple method for the detoxification of wastewater ultrafiltration concentrates for rotavirus assay by indirect immunofluorescence
Appl. Environ. Microbiol., 55, 401-405.

OUVRARD S., COIRON C., PREVOT J. and FESTY B. (1982)
Bilan d'une surveillance virologique systématique des eaux résiduaires en région parisienne
Tech. Sci. Munic., L'eau, 8-9, 427-433

PANCORBO O.C., BITTON G., FARRAH S.R., GIFFORD G.E. and OVERMAN A.R. (1988)
Poliovirus retention in soil columns after application of chemical and polyelectrolyte-conditionned dewatered sludges
Appl. Environ. Microbiol., 54, 118-123.

PANCORBO O.C., EVANSHEN B.G., CAMPBELL W.F., LAMBERT S., CURTIS S.K., and WOOLEY T.W. (1987)
Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strrain Wa in fresh waters.
Appl. Environ. Microbiol., 53, 1803-1811.

PANCORBO O.C., SCHEUERMAN P.R., FARRAH S.R. and BITTON G. (1981)
Effect of sludge type on poliovirus association with and recovery from sludge solids
Can. J. Microbiol., 27, 279-287.

PASSAGOT J. (1988)
Virus de l'hépatite A : purification et caractérisation de la souche CF 53 adaptée en cultures cellulaires.
Recherche et étude de substances actives contre ce virus : mise au point et développement de protocoles expérimentaux.
Thèse de doctorat n° 119/88
Université Cl. Bernard, Lyon I

PASSAGOT J., CRANCE J.M., DELOINCE R., LAVERAN H., BEYTOUT D. et FONTANGES R. (1985)
Conentration du virus de l'hépatite A sur des membranes de cellulose
Water Res., 19, 1167-1170.

PAYMENT P., FORTIN S. and TRUDEL M. (1984)
Ferric chloride flocculation for non-flocculating beef extract preparations.
Appl. Environ. Microbiol., 47, 591-592.

PAYMENT P., FORTIN S. and TRUDEL M. (1986)
Elimination of human enteric viruses during conventional wastewater treatment by activated sludges
Can. J. Microbiol., 32, 922-925.

PAYMENT P. and TRUDEL M. (1985)
Immunoperoxidase method with human immune serum globulin for broad spectrum detection of cultivable human anteric viruses : application to enumeration of cultivable viruses in environmental samples
Appl. Environ. Microbiol., 50, 1308-1310.

PAYMENT P. and TRUDEL M. (1987)
Second step reconcentration of environmental samples by amnonium sulfate floculation of beef extract
Can. J. Microbiol., 33, 571-572.

PAYMENT P., MORIN E. and TRUDEL M. (1988)
Coliphages and enteric viruses in the particulate phase of river water
Can. J. Microbiol., 34, 907-910.

PIETRI C., HUGUES B. and PUEL D. (1988)
Immune electron microscopy in the detection of viruses other than enteroviruses on cell culture in untreated sewage
Zbl. Bakt. Hyg. B., 186, 67-72.

PONS M. (1987)
Concentration du virus de l'hépatite A à partir d'eaux expérimentalement contaminées
Thèse de Pharmacie, Université Cl. Bernard, Lyon I.

PROST A. et BOUTIN P. (1989)
Le risque infectieux lors de l'utilisation d'eaux usées en agriculture
Tech. Sci. Munic., L'eau, 1, 23-33.

PURCELL R.H., WONG D.C., MORITSUGU Y., DIENSTAG J.L., ROUTENBERG J.A. and BOGGS J.D. (1976)
A microtiter solid-phase radioimmunoassay for hepatitis A antigen and antibody
J. Immunol., 116, 349-356.

RAPHAEL R.A., SATTAR S.A. and SPRINGTHORPE V.S. (1985)
Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water.
Can. J. Microbiol., 31, 124-128.

RAMIA S. and SATTAR S.A. (1979)
Second-step concentration of viruses in drinking and surface waters using polyethylene glycol hydroextraction
Can. J. Microbiol., 25, 587-592.

RAO V.C., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1986)
Virus humains dans les sédiments, les boues et les sols
Bull. O.M.S., 64, 341-356.

RAO V.C., SEIDEL K.M., GOYAL S.M., METCALF T.G. and MELNICK J.L. (1984)
Isolation of enteroviruses from water suspended solids and sediments from Galveston Bay : survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments
Appl. Environ. Microbiol., 48, 404-409.

RAO V.C., WAGHMARE S.V. and LAKHE S.B. (1981)
Detection of viruses on drinking water usin magnetic iron oxide
Appl. Environ. Microbiol., 42, 421-426.

RIDINGER D.N., SPENDLOVE R.S., BARNETT B.B., GEORGE D.B. and ROTH J.C. (1982)
Evolution of cell lines and immunofluorescence and plaque assay prodecures for quantifying reoviruses in sewage
Appl. Environ. Microbiol., 43, 740-746.

SAFFERMAN R.S., ROHR M.E. and GOYKE T. (1988)
Assessment of recovery efficiency of beef extract reagents for concentrating viruses from municipal wastewater sludge solids by the organic flocculation procedure
Appl. Environ. Microbiol., 54, 309-316.

SANDERS D.A., MALINA J.F., MOORE B.E., SAGIK B.P. and SORBER C.A (1979)
Fate of poliovirus during anaerobic digestion
J. Water Pollut. Control Fed., 51, 333-343.

SATO K., INABA Y., SHINOZAKI T., FUJII R. and MATUMOTO M. (1981)
Isolation of human rotavirus in cells cultures
Brief report
Arch. Virol., 69, 155-160.

SATTAR S.A. and WESTWOOD J.C.N. (1976)
Comparison of four eluents in the recovery of indigenous viruses from raw sludge
Can. J. Microbiol., 22, 1586-1589.

SATTAR S.A. and WESTWOOD J.C.N. (1979)
Recovery of viruses from field samples of raw digested and lagoon dried sludges
Bull. W.H.O., 57, 105-108.

SCHAUB S.A. and SAGIK B.P. (1975)
Association of enteroviruses with natural and artificially introduced colloïdal solids in water and infectivity of solids associated virions
Appl. Environ. Microbiol., 30, 212-222.

SCHEUERMAN P.R., FARRAH S.R. and BITTON G. (1986)
Development of a method for the recovery of enteroviruses from aerobically digested wastewater sludges
Water Res., 1, 15-19.

SCHNEITER R.W., MIDDELBROOKS E.J. and SLETTEN R. (1984)
Wastewater lagoon sludge characteristics
Water Res., 18, 861-864.

SCHWARTZBROD L. (1984)
Epidémiologie des maladies virales à transport hydrique
Microbiologie - Aliments - Nutrition, 2, 217-231.

SCHWARTZBROD L., BENNANI A., DELAVERGNE E. et SCHWARTZBROD J. (1983)
Détection des rotavirus dans les eaux usées par immuno-enzymologie : étude préliminaire
Revue française des sciences de l'Eau, 2, 145-152.

SCHWARTZBROD J., DIXNEUF P., SCHWARTZBROD L., BROCHET J.C. et FOLIGUET J.M. (1975)
Etude du comportement du virus poliomyélitique de type I dans différents milieux hydriques
Rev. Epidém. Méd. soc. et Santé Publ.,23, 235-252.

SCHWARTZBROD J., LUCENA F., BOSCH A., BERIL C., SCHWARTZBROD L. et PARES R. (1987) a
Influence des eaux continentales et des eaux usées sur la contamination microbiologique des sédiments marins
J. Fr. Hydrol., 18, 141-156.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F., BOSCH A. et SCHWARTZBROD J. (1988)
Micro-organismes, eau de mer et sédiments : étude du site de Barcelone
Océanis, 14, 51-59.

SCHWARTZBROD L., LUCENA F. and FINANCE C. (1979)
Etude quantitative de la polution virale dans l'affluent et l'effluent d'une station d'épuration d'eaux résiduaires.
J. Fr. Hydrol., 10, 7-20.

SCHWARTZBROD L. and MATHIEU E. (1986)
Virus recovery from wastewater treatment plant sludge
Water Res., 8, 1011-1013.

SCHWARTZBROD J., MATHIEU C., THEVENOT M.T., BARADEL J.M. and SCHWARTZBROD L. (1987) b
Wastewater sludge : parasitological and virological contamination
Wat. Sci. Tech., 19, 33-40.

SHELADIA V.L., ELLENDER R.D. and JOHNSON R.A. (1982)
Isolation of enteroviruses from oxidation pound waters
Appl. Environ. Microbiol., 43, 971-974.

SHIMOHARA E., NASHIDA M. and KANEKO M. (1986)
Studies of procedures for recovery of viruses from activated sludge
Wat. Sci. Tech., 18, 149-156.

SHIELDS P.A. and FARRAH S.R. (1983)
Influence of salts on electrostatic interactions between Poliovirus and membrane filters
Appl. Environ. Microbiol., 45, 526-531.

SHIPMAN C. (1973)
Chapter 7. Control of culture pH with synthetic buffers in:Tissue culture, KRUSE P.F. and PATTERSON M.K., Edit.
Academic Press Publishers, New York, 709-712.

SINGH N.S., BASSOUS M., GERBA C.P. and KELLEY L.M. (1986)
Use of dyes and proteins as indicators of virus adsorption to soils
Water Res., 20, 267-272.

SMITH E.M., GERBA C.P. and MELNICK J.L. (1978)
Role of sediment in the persistence of enteroviruses in the estuarine environment.
Appl. Environ. Microbiol., 35, 685-689.

SOBSEY M.D., DEANC.H., KNUCKLES M.E. ans WAGNER R.A. (1980)
Interactions and survival of enteric viruses in soil materials
Appl. Environ. Microbiol., 40, 92-101.

SOBSEY M.D., OGLESBEE S.E. and WAIT D.A. (1985)
Evaluation of methods for concentrating hepatitis A virus from drinking water
Appl. Environ. Microbiol., 50, 1457-1463.

SORBER C.A., MOORE B.E., JOHNSON D.E., HARDING H.J. and THOMAS R.E. (1984)
Microbiological aerosols from the application of liquid sludge to land
J. Water Pollut. Control Fed., 56, 830.

SPILLMANN S.K., TRAUB F., SCHWYZER M. and WYLER R. (1987)
Inactivation of animal viruses during sewage sludge treatment
Appl. Environ. Microbiol., 53, 2077-2081.

SUBRAHMANYAN T.P.,(1977)
Persistence of enteroviruses in sewage sludge
Bull. W.H.O., 55, 431-434.

TANDON R.K. and TANDON B.N. (1975)
Stool weights in North Indians
Lancet., 2, 560-561.

TRAUB F., SPILLMANN S.K. and WYLER R. (1986)
Method for determining virus inactivation during sludge treatment processes
Appl. Environ. Microbiol., 52, 498-503.

TSAI S.C., ELLENDER R.D., JOHNSON R.A. and HOWELL F.G. (1983)
Elution of viruses from coastal sediments
Appl. Environ. Microbiol., 46, 797-804.

TURK C.A., MOORE B.E., SAGIK B.P. and SORBER C.A. (1980)
Recovery of indigenous viruses from wastewater sludges using a bentonite concentration procedure
Appl. Environ. Microbiol., 40, 423-425.

VAUGHN J.M., LANDRY E.F., BECKWITH C.A. and MC HARRELL Z.T. (1981)
Virus removal during groundwater recharge : effects of infiltration rate on adsorption of poliovirus to soil
Appl. Environ. Microbiol., 41, 139-147.

WAIT A.D. and SOBSEY M.D. (1983)
Method for recovery of enteric viruses from estuarine sediments with chaotropic agents
Appl. Environ. Microbiol., 46, 379-385.

WALTER R., MACHT W., DURKOP J., HECHT R., HORNIG U. and SCHULZE P. (1989)
Virus levels in river waters
Water Res., 23, 133-138.

WARD R.L. (1982)
Evidence that microorganisms cause inactivation of viruses in activated sludge
Appl. Environ. Microbiol., 43, 1221-1224.

WARD R.L. and ASHLEY C.S. (1976)
Inactivation of poliovirus in digested sludges
Appl. Environ. Microbiol., 31, 921-930.

WARD R.L., KNOWLTON D.R. and WINSTON P.E. (1986)
Mechanism of inactivation of enteric viruses in fresh water
Appl. Environ. Microbiol., 52, 450-459.

WELLINGS F.M., LEWIS A.L. and MOUNTAIN C.W. (1976)
Demonstration of solids-associated virus in wastewater and sludge
Appl. Environ. Microbiol., 31, 354-358.

WHITE A.U. (1977)
Patterns of domestic water use in low-incone communities
in : Water, wasters and Health in hot climates
Eds Feachem R.G.A., MAC GARRY M.G. and MARA D.D., p. 96-112
London : John Wiley and Sons Publishers

WULLENWEBER and AGBALIKA F. (1984)
Enteroviruses types in samples of activated sewage sludge
Zbl. Bakt. Hyg., B 178, 522-526.

WULLENWEBER and JORET J.C. (1983)
Comparative study on methods to recover indigenous viruses from samples of activated sewage sludge
Zbl. Bakt. Hyg., B 177, 482-489.

ZDRAZILEKJ., DRASNAR M., HLAVOVA H., JADRNICLOVA E., JANDASEK L., KASOVA V., KOZA J., MATYASOVA I., UVIZI M., VALIHARACH J. and WEIGENDOVA J. (1982)
Presence of polioviruses and other enteral viruses in sewage : a survey in the Socialistic Republic
J. Hyg. Epid. Microbiol. Immunol., 26, 1-14.

Ce travail a été rapporté dans :

- PUBLICATIONS :

. Recovery of virus from sludge
ALBERT M., GOULON C. and SCHWARTZBROD L. (1988)
Z. gesamte Hyg., 34, Heft 9, 516-517.

. Extraction des virus à partir des boues de station d'épuration
ALBERT M. et SCHWARTZBROD L. (1989)
J. Fr. Hydrol., 20, 31-42.

- RAPPORTS DE CONTRAT DE RECHERCHE :

. Evaluation de la contamination virale sur le site de Morlaix
(Décembre 1987)
SCHWARTZBROD L., ALBERT M. et BERIL C.
Contrat de recherche IFREMER, Brest.

. Evaluation de la contamination virale sur le site de Morlaix
(Septembre 1988)
SCHWARTZBROD L., ALBERT M., BERIL C. et BOHER S.
Contrat de recherche IFREMER, Brest.

. Analyse virologique des boues résiduaires
Evaluation de protocoles d'extraction-concentration des virus
SCHWARTZBROD L. et ALBERT M. (Mars 1988).
contrat de recherche avec le Ministère de l'Environnement.

- COMMUNICATION AFFICHEE :

Influence of sewage discharge on the pollution of an estuary (Morlaix, France)
SCHWARTZBROD L., POMMEPUY M., ALBERT M., DUPRAY E. and BOHER S. (1989)
Présentée à :
"International Symposium of wastewater management problems in agro-industries" - ISTANBUL, 25-28 September 1989.