

LES BACTÉRIOPHAGES ARN F-SPÉCIFIQUES POUR ÉVALUER LA QUALITÉ VIROLOGIQUE DES COQUILLAGES LORS DE LEUR DÉPURATION

Cédric HARTARD¹

Présenté par Hubert LAUDE (section 6 - Sciences de la Vie)

Résumé

Compte tenu des limites fréquemment décrites concernant la recherche d'*E. coli* pour évaluer l'efficacité des procédés de dépuración appliqués aux coquillages, le recours à d'autres indicateurs est aujourd'hui souhaitable. Dans ce contexte, le potentiel des bactériophages ARN F-spécifiques est particulièrement étudié. De nombreuses études se sont intéressées au comportement de ces indicateurs viraux et à celui des norovirus lors de la dépuración des coquillages. Elles semblent cependant biaisées par l'emploi de techniques difficilement comparables pour rechercher ces deux types de microorganismes. En utilisant des méthodes de détection analogues, nos travaux ont montré pour la première fois une meilleure persistance des phages dans ces conditions. Ces nouvelles données pourraient relancer le débat concernant l'utilisation de ces indicateurs pour évaluer le danger viral lié à la consommation de coquillages.

On the use of F-specific RNA bacteriophages to assess shellfish viral depuration

Abstract

The limitations concerning the use of traditional fecal pollution indicators to assess foodstuff microbiological quality are well known when focusing on oyster farming. Indeed, while fecal indicator bacteria (e.g. E. coli) are recognized, their unreliability is well described to assess viral hazard which represents the major risk in the case of shellfish consumption. Noroviruses are the leading cause of gastroenteritis outbreaks linked to shellfish consumption and contrary to E. coli, these pathogens are characterized by high persistence and stability in these kinds of foodstuff. Differences between these pathogens and traditional indicators are especially described in the case of shellfish depuration. In this context, others indicators are needed to assess the efficiency of this process. F-specific RNA bacteriophages are viruses which are often used as indicators because of their fecal origin. However, most of studies have also shown a difference of persistence with that of noroviruses during shellfish depuration. All these data are however skewed taking into account the use of very different approaches to track them. Using similar detection methods, we have shown for the first time the better persistence of phages compared to that of noroviruses during depuration

¹ Laboratoire de Chimie Physique et Microbiologie pour l'Environnement, LCPME UMR 7564 CNRS - Université de Lorraine, Faculté de Pharmacie, 5 rue Albert Lebrun 54000, Nancy cedric.hartard@gmail.com
Copyright Académie d'agriculture de France, 2018.

process. These new data may revive the question about the use of indicators to assess shellfish viral pollution.

A. Evaluation de la qualité microbiologique des coquillages

1. L'indicateur réglementaire et ses limites

Le lien entre la consommation de coquillages et la transmission des pathogènes entériques est décrit depuis plus d'un siècle. Ces aliments sont en effet bien connus pour accumuler les microorganismes présents dans les eaux environnementales, en particulier en cas de rejets d'eaux usées urbaines à proximité des zones conchylicoles (*i.e.* stations d'épuration). Parmi l'ensemble des coquillages, les huîtres sont particulièrement impliquées dans la transmission de pathogènes à l'Homme car elles sont généralement consommées crues. La recherche de l'ensemble des pathogènes n'étant pas réalisable en routine, la qualité microbiologique des coquillages est actuellement évaluée par la recherche d'*Escherichia coli* (*E. coli*), l'indicateur universel de pollution fécale.

Lorsque les zones conchylicoles ne répondent pas aux exigences sanitaires (ce qui est la plupart du temps le cas en Europe) (EFSA, 2011), une étape de purification est nécessaire avant la commercialisation des coquillages. Ce procédé consiste à placer les fruits de mer dans des bassins d'eau propre pour que ces organismes filtreurs puissent éliminer les microorganismes qu'ils contiennent. Dans ce cas, c'est également la recherche d'*E. coli* qui permettra ou non la libération des lots.

S'il est incontestable que la recherche d'*E. coli* présente de nombreux intérêts en termes de sécurité alimentaire, les limites de cet indicateur sont souvent décrites dans le domaine conchylicole. Elles sont notamment perçues lorsqu'il s'agit d'évaluer la présence des norovirus (NoV), les pathogènes responsables de plus de 80% des toxi-infections alimentaires collectives (TIAC) en lien avec la consommation de coquillages (Bellou *et al.*, 2013). Ces virus présentent en effet une résistance bien supérieure à celle d'*E. coli* dans l'environnement et sont également caractérisés par une persistance importante dans les coquillages. En effet, alors qu'une purification de 48 h est généralement suffisante pour réduire d'une unité logarithmique la concentration d'*E. coli* (T_{90}), le T_{90} mesuré dans le cas des NoV est parfois supérieur à 28 jours dans les mêmes conditions (Lees, 2000). Ces différences de comportement entre indicateurs et pathogènes conduisent à observer des épidémies de gastroentérites en lien avec la consommation de fruits de mer qui répondent pourtant à toutes les exigences réglementaires actuelles (Lowther *et al.*, 2010).

Ces différents aspects conduisent aujourd'hui les autorités à conclure que « les indicateurs fécaux conventionnels ne sont pas fiables pour démontrer la présence ou l'absence de norovirus de type Norwalk et que le recours à l'élimination des indicateurs bactériens fécaux pour déterminer les durées de purification des mollusques constitue une pratique dangereuse ». Il convient alors « de fixer des critères applicables aux virus pathogènes dans les mollusques bivalves vivants lorsque les méthodes d'analyse seront suffisamment développées » (Parlement Européen, 2005).

2. Des alternatives ?

Dans ce contexte particulier, deux autres approches peuvent être envisagées. La première correspond à la recherche directe des NoV dans les coquillages, elle est rendue possible par la mise en place de la norme ISO 15216-1 (International Organization for Standardization, 2017). Les NoV étant difficilement cultivables en routine, cette approche s'appuie sur l'utilisation de techniques moléculaires (*i.e.* détection des génomes viraux) et suppose alors certaines limites. Il est en effet bien décrit aujourd'hui que la persistance des génomes viraux permet difficilement de conclure à la présence concomitante des particules infectieuses correspondantes et donc à un danger pour le consommateur en cas de résultat positif (Gassilloud *et al.*, 2003). En cas de TIAC, la législation prévoit ainsi la réouverture des zones conchylicoles concernées après un délai de 28 jours, alors même que des génomes viraux puissent encore être détectés dans les coquillages (DGAL, 2013). Dans ce cas, la difficulté de savoir si ces génomes correspondent ou non à la présence de particules infectieuses peut conduire à la survenue de nouvelles TIAC (Le Mennec *et al.*, 2017).

La seconde approche correspond à la définition d'autres indicateurs qui seraient plus pertinents pour évaluer la pollution de type viral dans ces situations particulières.

B. Les bactériophages ARN F-spécifiques comme indicateurs de pollution virale

1. Etat de l'art et controverse

Dans le contexte décrit précédemment, le potentiel des bactériophages fécaux en tant qu'indicateurs est particulièrement étudié (Jofre *et al.*, 2016). Parmi eux, les bactériophages ARN F-spécifiques (FRNAPH) semblent présenter plusieurs intérêts.

Les FRNAPH sont des virus non pathogènes pour l'Homme capables de se multiplier en infectant certaines bactéries du tractus digestif des animaux à sang chaud. Excrétés dans les selles, ils sont retrouvés en concentrations importantes dans les eaux usées et leur intérêt comme indicateurs de pollution fécale n'est aujourd'hui plus à démontrer. Leur morphologie et leur persistance ont souvent conduit la communauté scientifique à les utiliser comme modèles pour étudier l'inactivation des virus pathogènes (McMinn *et al.*, 2017). Enfin, le dernier intérêt de ces indicateurs concerne la possibilité d'identifier les contaminations fécales d'origine humaine puisque certains génogroupes de phages sont préférentiellement présents chez l'Homme (Hartard *et al.*, 2015).

Si bon nombre d'arguments attestent donc du potentiel des FRNAPH en cas de pollution virale, leur intérêt ne fait pas l'unanimité puisque la littérature regorge de résultats contradictoires lorsqu'il s'agit d'étudier la corrélation entre ces indicateurs et les virus pathogènes, y compris dans les coquillages (Hodgson *et al.*, 2017).

Le comportement particulier des NoV en termes d'accumulation et surtout leur persistance lors de la purification des coquillages conduit souvent à penser qu'aucun indicateur ne serait suffisamment performant pour évaluer leur présence. Cette hypothèse est par ailleurs largement renforcée si on évoque le possible rôle de ligands spécifiques des NoV au sein des coquillages (Tian *et al.*, 2006).

Un projet initié par le CEFAS (*Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*) visant à évaluer l'efficacité de la purification des coquillages en y recherchant les NoV, les FRNAPH et *E. coli* résume parfaitement l'état de l'art (**Figure 1**) (Neish, 2013). Alors que l'élimination extrêmement rapide d'*E. coli* est confirmée, ces données soulignent une persistance des FRNAPH inférieure à celle des NoV.

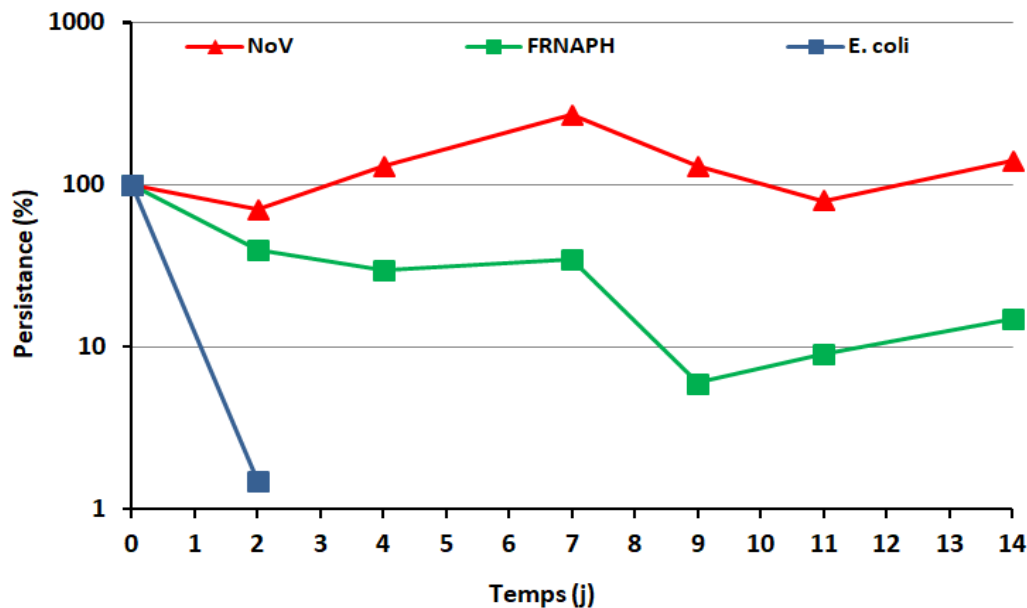


Figure 1 : Persistance des génomes de norovirus, des FRNAPH infectieux et d'*E. coli* lors de la purification des coquillages, d'après Neish, 2013.

Behavior of noroviruses genome, infectious FRNAPH and E. coli during shellfish depuration. Neish, 2013.

Ces différentes études présentent néanmoins une limite non négligeable. En effet, si les NoV y sont détectés par biologie moléculaire, les FRNAPH sont quant à eux recherchés par culture. Il semble donc aléatoire de vouloir comparer la persistance de ces microorganismes en ne tenant pas compte de ce biais.

2. Persistance des génomes de FRNAPH et des NoV lors de la purification des coquillages

Lors de la dépuración des coquillages, la disparition plus rapide des FRNAPH peut être liée à deux phénomènes qu'il conviendrait de distinguer. Il s'agit d'une part de l'élimination physique des particules infectieuses (*i.e.* disparition des génomes et des particules infectieuses) et d'autre part de leur inactivation au sein des coquillages (*i.e.* perte du caractère infectieux mais persistance des génomes). Si une élimination plus rapide des FRNAPH infectieux par rapport aux NoV infectieux est confirmée, leur intérêt en tant qu'indicateur viral serait évidemment compromis. Cette hypothèse n'est aujourd'hui pas vérifiable faute de méthode analytique permettant la détection des NoV infectieux. A l'inverse, si la persistance des NoV est uniquement liée à la stabilité des génomes, la

Copyright Académie d'agriculture de France, 2018.

recherche des FRNAPH par des techniques moléculaires apporterait alors de nouvelles informations concernant leur potentiel. C'est cette approche qui a été envisagée ici.

Dans cette étude, différents lots d'huîtres initialement positifs pour la recherche des FRNAPH et des NoV ont été placés dans des conditions standards de dépuración. Dans ces conditions, la persistance importante des NoV a été confirmée puisque leurs génomes étaient toujours détectés dans les coquillages après 30 jours de dépuración ($T_{90} = 36$ jours) (**Figure 2**). Concernant les FRNAPH, les investigations se sont limitées à la détection des membres du génogroupe II d'origine humaine (*i.e.* FRNAPH-II). En utilisant la culture, la persistance inférieure des FRNAPH infectieux a été confirmée ($T_{90} = 14$ jours). De manière intéressante, le recours aux approches moléculaires a cette fois montré une persistance importante des génomes de FRNAPH-II ($T_{90} = 105$ jours), supérieure à celle des FRNAPH infectieux ou à celle des génomes de NoV (t-test; $P < 10^{-4}$). De ce fait, alors que les génomes des FRNAPH-II sont encore détectés dans les coquillages après 30 jours de stockage, l'absence des particules virales infectieuses correspondantes a été notée durant les derniers jours de dépuración.

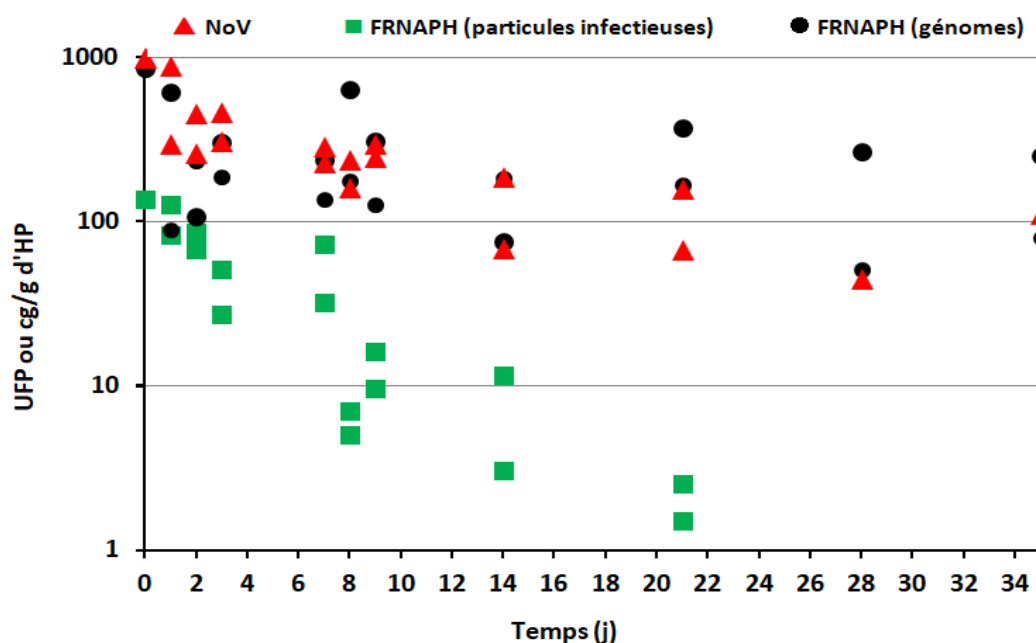


Figure 2 : Persistance des génomes de norovirus et des FRNAPH-II (particules infectieuses et génomes) lors de la purification des coquillages. UFP = unités formant plaque, cg = copies de génome, HP = hépatopancréas (glandes digestives des coquillages).

Behavior of noroviruses genome and FRNAPH-II (infectious particles and genome) during shellfish depuration. UFP = plaque forming units, cg = genome copies, HP = hepatopancreas (digestive tissue).

Conclusion

Actuellement, les FRNAPH sont utilisés avec beaucoup de prudence en tant qu'indicateurs de contamination virale, notamment à cause des résultats contradictoires obtenus au cours des études de corrélation avec les virus entériques pathogènes dans l'environnement. Ce phénomène est particulièrement décrit lorsqu'on s'intéresse aux NoV et aux coquillages. Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier cette corrélation lors de la dépuración des coquillages en s'affranchissant des limites méthodologiques identifiées. Cette approche a déjà permis de montrer une forte corrélation entre les génomes de FRNAPH-II et ceux des NoV dans des coquillages issus de différents sites conchylicoles européens, quel que soit leur niveau de contamination fécale (Hartard *et al.*, 2016, 2018). Toujours en utilisant des méthodes de détection comparables, nous mettons ici en évidence la meilleure persistance des génomes de FRNAPH par rapport à celle des NoV lors de la purification des coquillages.

La recherche concomitante des FRNAPH infectieux démontre également que les approches moléculaires permettent difficilement de conclure à la présence des particules infectieuses correspondantes. Appliquées aux NoV, ces observations suggèrent que la pertinence des méthodes moléculaires pour évaluer le danger viral lors de l'analyse de matrices alimentaires est limitée.

Ces données relancent le débat sur la définition de nouveaux indicateurs et semblent en faveur de la recherche des FRNAPH dans certaines situations. En effet, compte tenu de la spécificité humaine des FRNAPH-II et de la corrélation observée entre la présence de leurs génomes et ceux des NoV dans les coquillages, la recherche des FRNAPH-II infectieux dans ce type de matrice pourrait constituer un critère intéressant pour évaluer le danger viral. Dans ce contexte, une méthode de détection rapide et sensible des différents génogroupes de FRNAPH infectieux dans les matrices alimentaires a été mise au point (Hartard *et al.*, 2017).

Rappelons toutefois que la recherche d'*E. coli* demeure une première étape indispensable à la gestion du risque microbiologique puisque si cet indicateur est présent dans une matrice hydrique ou un aliment, il n'existe alors aucun doute quant au danger associé. C'est uniquement en son absence que le recours à d'autres indicateurs doit être envisagé.

Références bibliographiques

Direction Générale de l'Alimentation, 2013. Contamination des zones de production de coquillages par les norovirus - Protocole cadre de gestion DGAL/SDSSA/N2013-8187 du 20 novembre 2013.

European Food Safety Authority, 2011. Scientific Opinion on an update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. EFSA J. 9, 2190.

Bellou, M., Kokkinos, P., Vantarakis, A., 2013. Shellfish-Borne Viral Outbreaks: A Systematic Review. Food Environ. Virol. 5, 13–23.

Gassilloud, B., Schwartzbrod, L., Gantzer, C., 2003. Presence of Viral Genomes in Mineral Water: a Sufficient Condition To Assume Infectious Risk? Appl. Environ. Microbiol. 69, 3965–3969.

- Hartard, C., Banas, S., Loutreul, J., Rincé, A., Benoit, F., Boudaud, N., Gantzer, C., 2016.** Relevance of F-Specific RNA Bacteriophages in Assessing Human Norovirus Risk in Shellfish and Environmental Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 5709–5719.
- Hartard, C., Banas, S., Rivet, R., Boudaud, N., Gantzer, C., 2017.** Rapid and sensitive method to assess human viral pollution in shellfish using infectious F-specific RNA bacteriophages: Application to marketed products. *Food Microbiol.* 63, 248–254.
- Hartard, C., Leclerc, M., Rivet, R., Maul, A., Loutreul, J., Banas, S., Boudaud, N., Gantzer, C., 2018.** F-specific RNA bacteriophages, especially members of subgroup II, should be reconsidered as good indicators of viral pollution of oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e01866-17.
- Hartard, C., Rivet, R., Banas, S., Gantzer, C., 2015.** Occurrence of and Sequence Variation among F-Specific RNA Bacteriophage Subgroups in Feces and Wastewater of Urban and Animal Origins. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 6505–6515.
- Hodgson, K.R., Torok, V.A., Turnbull, A.R., 2017.** Bacteriophages as enteric viral indicators in bivalve mollusc management. *Food Microbiol.* 65, 284–293.
- International Organization for Standardization, 2017.** NF EN ISO 15216-1. Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR — Part 1: Method for quantification. Geneva, Switzerland.
- Jofre, J., Lucena, F., Blanch, A., Muniesa, M., 2016.** Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources. *Water* 8, 199.
- Le Mennec, C., Parnaudeau, S., Rumebe, M., Le Saux, J.-C., Piquet, J.-C., Le Guyader, S.F., 2017.** Follow-Up of Norovirus Contamination in an Oyster Production Area Linked to Repeated Outbreaks. *Food Environ. Virol.* 9, 54–61.
- Lowther, J.A., Avant, J.M., Gizynski, K., Rangdale, R.E., Lees, D.N., 2010.** Comparison between quantitative real-time reverse transcription PCR results for norovirus in oysters and self-reported gastroenteric illness in restaurant customers. *J. Food Prot.* 73, 305–311.
- McMinn, B.R., Ashbolt, N.J., Korajkic, A., 2017.** Bacteriophages as indicators of faecal pollution and enteric virus removal. *Lett. Appl. Microbiol.* 65, 11–26.
- Neish, A., 2013.** Investigative trials on the purification of oysters to identify ways of reducing norovirus, Cefas contract report C5224.
- Parlement Européen, 2005.** Règlement (CE) n° 2073/2005 de la Commission du 15 novembre 2005 concernant les critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. *J. Off. l'Union Eur.* L338, 1–34.
- Tian, P., Bates, A.H., Jensen, H.M., Mandrell, R.E., 2006.** Norovirus binds to blood group A-like antigens in oyster gastrointestinal cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 43, 645–651.