

Exposition environnementale à certains virus

Période : décembre 2010 à février 2011

Anne OPPLIGER et Frédéric G. MASCLAUX

Institut universitaire romand de Santé au Travail, Université de Lausanne et Genève – Lausanne

Mots clés : **Aérosol, Détection, Eau souterraine, Environnement, Grippe H1N1, Norovirus, qPCR, Virus**

Les virus sont présents dans la plupart des environnements. Grâce aux outils moléculaires, il est maintenant possible de les mettre en évidence facilement, ce qui était difficile auparavant car cela nécessitait une infrastructure relativement complexe (cultures cellulaires ou inoculation à des animaux). En 2002, à l'aide de la métagénomique, une approche expérimentale a permis de montrer la présence de > 5 000 virus différents dans 200 litres d'eau de mer (Breitbart *et al.*, 2002). Tous ces virus étaient essentiellement de nouvelles espèces. Ainsi, les études cherchant à détecter des virus pathogènes dans des échantillons environnementaux se sont multipliées afin de mieux comprendre leurs cycles vitaux, leurs voies de contamination et leur survie dans la nature.

L'homme et les animaux contractent des virus essentiellement par ingestion d'eau contaminée ou par voies manuportée et aéroportée. Certains de ces virus (i.e. virus de la grippe aviaire H5N1, SRAS) sont à l'origine de sérieux problèmes de santé publique de par leur dissémination rapide, leur caractère zoonotique et la difficulté à traiter les personnes atteintes.

Les trois articles présentés dans cette note montrent 1) les propriétés de survie étonnantes de l'adénovirus dans les eaux souterraines ; 2) la dynamique saisonnière du norovirus également dans les eaux souterraines et 3) le rôle de la toux dans la dissémination du virus de la grippe.

Présence, survie et persistance des adénovirus humains et des phages ARN F-spécifiques dans les eaux souterraines brutes

Ogorzaly L, Bertrand I, Paris M, Maul A, and Gantzer C. Occurrence, Survival, and Persistence of Human Adenoviruses and F-Specific RNA Phages in Raw Groundwater. *Appl Environ Microbiol.* 2010; 76: 8019–8025.

Analyse

Dans cette étude réalisée en France, les auteurs ont évalué la capacité de survie de virus dans des microcosmes d'eau souterraine. Les virus testés sont l'adénovirus humain de type 2 (HAdV2) et 2 bactériophages ARN F-spécifiques (MS2 et GA). La capacité de survie a été évaluée par des tests d'infection et des méthodes moléculaires telles que la PCR quantitative⁽¹⁾ (qPCR) sur une durée totale de 400 jours. Il a pu être montré que la température la plus basse (4 °C) permettait une meilleure survie des 3 virus qu'une température plus haute (20 °C). Chaque virus a son propre taux de survie. Le HAdV2 est capable de survivre pendant une longue durée dans cette eau souterraine. Au niveau de sa capacité infectieuse, une faible diminution est observée au cours du temps (0,0076 log₁₀/jour à 4 °C ; 0,0279 log₁₀/jour à 20 °C). Sur la durée totale de l'étude, aucune dégradation du génome de ce virus n'est détectée à 4 °C, alors qu'à 20 °C, la diminution est de 0,0036 log₁₀/jour. En ce qui concerne les bactériophages, leur taux de survie est très proche et moins élevé que celui du HAdV2 lorsque la capacité infectieuse est considérée. Après 50 jours à 20 °C, l'ARN du MS2 n'est plus détecté. L'ARN du GA persiste plus longtemps (réduction de 0,0278 log₁₀/jour

à 20 °C). Bien que la diminution de capacité infectieuse soit la même entre les 2 virus, leur ARN n'a pas la même stabilité dans le microcosme. Cette différence n'est pas expliquée mais pourrait résulter de caractéristiques propres à chaque ARN ou à un effet protecteur de la capsid. Les analyses sur site ont montré que le HAdV2 pouvait être détecté par qPCR alors que les indicateurs classiques de contamination fécale étaient négatifs pour 7 sites sur 60.

Commentaire

Cette étude fournit de nouvelles données pour l'interprétation des résultats de détection de micro-organismes dans les eaux souterraines. La contamination fécale de ces eaux est classiquement déterminée par des méthodes standards ISO (International Organization for Standardization). Or, dans la présente étude, les indicateurs de contamination fécale sont négatifs pour 7 sites sur 60, bien que le génome du HAdV2 soit détecté par qPCR. Cette détection met en évidence une possible contamination d'origine fécale, mais la présence de particules infectieuses de ce virus n'a pas été évaluée. En effet, comme le montre cette étude, le génome ADN du HAdV2 est très stable dans les eaux souterraines. La détection par qPCR conduit à une surévaluation du nombre de virus infectieux dans l'eau. Pour les génomes ARN des bactériophages, le même problème se pose mais avec une moindre importance car les ARN subissent une dégradation assez rapide. Les eaux souterraines constituent un environnement relativement pur dans lequel les ADN double brin peuvent subsister bien après que le virus ait perdu sa capacité

infectieuse. Cet article interpelle sur la recherche de compromis entre la surévaluation du risque de contamination fécale par qPCR et la sous-évaluation par les méthodes standards ISO.

Surveillance nationale des norovirus dans les eaux souterraines en Corée du Sud (2008)

Lee S-G, Jheong W-H, Suh C-II, Kim S-H, Lee J-B, Jeong Y-S, Ko GP, Jang K L, Lee G-C, and Paik S-Y. Nationwide Groundwater Surveillance of Noroviruses in South Korea, 2008. *Appl Environ Microbiol.* 2010 ; 77: 1466–1474.

Analyse

Cet article décrit une étude à grande échelle sur l'ensemble du territoire de la Corée du Sud faite en 2008 pour connaître le niveau de contamination en norovirus des eaux souterraines. La détection du norovirus est importante car il a été montré récemment que la grande majorité des gastroentérites aiguës non-bactérienne étaient dues à ce virus. Des prélèvements ont été réalisés à 300 points de distribution d'eau potable ou non potable, à des endroits très variés (école, parc, église...). Les auteurs ont utilisé des méthodes moléculaires (RT-PCR) pour détecter et génotyper les norovirus dans ces échantillons. Les virus ont été détectés dans 65 sites sur 300 en été (21,7 %) et dans 52 sites sur 300 en hiver (17,3 %). Ce résultat est intéressant car le norovirus est considéré comme un virus hivernal. Il est d'ailleurs retrouvé en plus grande quantité en hiver dans les eaux usées (par ex. Katayama *et al.* 2008). Les auteurs expliquent que la Corée du Sud subit des pluies torrentielles. Cet excès de précipitation pourrait entraîner l'infiltration d'eaux usées contenant des virus vers les eaux souterraines. La saison a un effet sur les taux de détection dans certaines régions et aussi sur les différents génotypes retrouvés. Pour certains sites, plusieurs génotypes ont été retrouvés en même temps. Ce mélange de génotypes peut favoriser les événements moléculaires (recombinaison, cassures antigéniques) permettant l'apparition de nouveaux types de norovirus. Cette étude a révélé un lien entre le taux de détection du virus et la taille de la population autour des sites. D'autres facteurs apparaissent comme critiques pour déterminer la présence du norovirus dans les eaux souterraines : la turbidité de l'eau, la température et la présence de coliphages malespécifiques.

Commentaire

L'intérêt de cette étude provient de la grande surface géographique étudiée et du nombre d'échantillons analysés. Cependant, il est regrettable que l'article ne présente pas un bilan de l'état de l'eau suivant si elle est consommée comme eau de boisson ou non. Ces résultats de détection du norovirus dans les eaux souterraines montrent la nécessité de réaliser des analyses d'eau régulièrement au cours de l'année. Cet article pose aussi la question des voies de dissémination du norovirus dans l'environnement. En effet, la charge virale des eaux souterraines pourrait être augmentée par les variations environnementales

comme le sont les épisodes pluvieux intenses dus aux changements climatiques.

Détection du virus de la grippe (influenza virus) dans les particules aéroportées issues d'accès de toux humaine

Lindsay WG, Blachere FM, Thewlis RE, Vishnu A, Davis KA, Cao G, Palmer JE, Clark KE, Fisher MA, Khakoo R, Beezhold DH. Measurements of airborne influenza virus in aerosol particles from human coughs. *Plosone.* 2010 : vol 5, issue 11, e15100, open access.

Analyse

Cette étude a été réalisée en 2009 aux États-Unis durant la période pandémique grippale du virus influenza de type A (sous-type H1N1). Son objectif était de clarifier l'importance de la transmission aéroportée du virus influenza par les accès de toux des personnes infectées. En effet, jusqu'ici la preuve de transmission aéroportée, par les sécrétions contenant ce virus, bien que fortement suspectée restait controversée. Les particules infectieuses contenues dans les sécrétions (expectorations, mucus nasal) peuvent se transmettre de personne à personne par différentes voies et le rôle relatif de la voie aéroportée n'est pas bien connu.

Afin d'évaluer la quantité et la taille des particules contenant du virus, produites lors d'accès de toux, les auteurs de cette étude ont recruté 58 volontaires présentant des symptômes de grippe, âgés de 18 à 33 ans (38 hommes et 20 femmes) dont aucun n'avait été vacciné contre le H1N1 de 2009. Des frottis de muqueuse nasale et du pharynx, analysés par une méthode de PCR quantitative (qPCR), ont détecté la présence de virus influenza chez 43 personnes (sur 56 testés). Puis, afin de vérifier la viabilité des virus, 30 tests de cytopathologie (viral plaque assay = VPA) ont été effectués et ont montré la présence d'un virus viable chez 11 personnes. Ensuite, 58 échantillons (dont 47 provenaient de personnes porteuses de virus, détecté soit par qPCR soit par VPA) d'aérosols générés durant des accès de toux forcés ont été récoltés à l'aide de deux appareils spéciaux (NIOSH two-stage aerosol sampler et SKC Biosampler). Ces appareils permettent la récolte d'aérosols dans un spiromètre⁽²⁾ à piston. Les échantillons ainsi obtenus ont été analysés par qPCR et ont révélé la présence de virus dans les aérosols de 38 des 47 personnes ayant des frottis positifs. Soixante-cinq pour cent des particules virales mises en évidence ont été trouvées dans les aérosols <4 micromètres de diamètre (23 % dans particules de 1 à 4 micromètres et 42 % dans particules <1 micromètre). D'autre part, en parallèle, 30 analyses VPA d'aérosols de toux ont été faites (dont 21 chez des personnes porteuses de virus). Ces analyses n'ont montré que 2 échantillons positifs (avec virus viable). En conclusion, le virus influenza a été mis en évidence dans les aérosols de toux de 81 % des patients dont les frottis de gorge ou de nez avaient décelé la présence du virus par méthode qPCR (virus viable et non viable). En revanche, la viabilité de ces virus détectés par qPCR n'a pu être mise en évidence que dans 2 cas sur 30 cas analysés (ou 11 viables dans les frottis). Ce qui confirme cependant la possibilité de transmission aéroportée du virus.

Les auteurs supposent que le nombre de virus viables est sous-estimé en raison de plusieurs facteurs : 1) les techniques de prélèvements utilisées peuvent endommager les virus 2) une des techniques de prélèvement n'est peut-être pas assez spécifique pour les particules de petite taille et 3) le test de dépistage utilisé (VPA) n'est pas assez sensible pour mettre en évidence de très petites quantités de virus. De plus, il est spécifié que les aérosols de grande taille tombent directement sur le sol ou les surfaces et ne sont pas pris en compte. Un autre résultat intéressant est que le nombre de particules virales obtenu (par qPCR) lors des accès de toux est très variable d'un patient à l'autre. Il s'avère que trois des patients sont des « super-disséminateurs » produisant des aérosols avec de grandes quantités de particules virales (de 80 à 140 par accès de toux) alors que les 29 autres patients génèrent des quantités beaucoup plus faibles (1 à 40 particules par accès de toux).

Commentaire

Cette étude a montré une bonne corrélation entre le nombre de particules virales détectées « *in situ* » dans le nez ou la gorge de patients malades et le nombre de particules virales détectées dans les aérosols issus d'accès de toux de ces patients. Cependant, les méthodes de prélèvements utilisées et l'analyse choisie pour détecter les particules viables ne semblent pas être optimales. Dès lors, la mise au point de techniques et d'analyses fiables est cruciale pour estimer le risque de propagation aéroportée du virus de la grippe. L'étude montre aussi que la taille des aérosols contenant les virus est un facteur important pour leur dissémination puisque 65 % d'entre eux, détectés, le sont dans des aérosols inhalables (<4 micromètres). Les auteurs ne signalent pas les autres facteurs susceptibles d'influencer la dissémination des virus. Il est fortement suspecté que la taille des virus elle-même influence leur pouvoir de dissémination (Gralton *et al.*, 2011). En effet, plus les particules sont petites et plus elles auront la capacité à rester en suspension dans l'air pendant une certaine période, augmentant ainsi la probabilité d'être inhalées par d'autres hôtes. Mais des études le démontrant manquent. Nous savons que d'autres facteurs comme le degré d'humidité de l'air, le site d'infection (nez, gorge, poumon), la concentration des micro-organismes dans le mucus, la nature du mucus et la virulence du micro-organisme jouent aussi un rôle important pour la survie des virus et leur passage d'un hôte à l'autre (voir revue Gralton *et al.*, 2011). Ainsi, l'observation de patients « super-disséminateurs » rapportée dans l'étude de Lindsley *et al.* (2010), peut dépendre en partie du stade de la maladie comme suggéré par les auteurs mais aussi de ces autres facteurs.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Ces études dédiées à la mise en évidence de certains virus dans l'environnement (eaux souterraines et aérosols générés par des accès de toux lors d'états grippaux), montrent les limites techniques et analytiques ainsi que les facteurs qui influencent la fiabilité des résultats. En effet, il s'avère que les analyses par qPCR surestiment sans doute le nombre de virus infectieux, en prenant en compte non seulement les virus « viables » mais aussi les virus non viables. Cet effet est renforcé lorsque le génome du virus peut se maintenir dans certains environnements relativement « propres » comme les eaux souterraines. De plus, la dynamique des virus, que ce soit dans les eaux ou dans un hôte vivant, est difficile à prévoir et peut varier grandement d'une saison à l'autre ou d'un hôte à l'autre. Ceci implique que les estimations d'exposition aux virus environnementaux sont difficilement généralisables et demandent un suivi métrologique spécifique.

Lexique

- (1) PCR quantitative (qPCR) : la PCR quantitative (ou PCR en temps réel, qPCR) est une méthode qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent. C'est une méthode avec une haute spécificité et une haute sensibilité. Elle permet de connaître précisément la quantité d'ADN d'intérêt dans de nombreuses applications (détection, expression de gène...).
- (2) Spiromètre : appareil médical servant à mesurer les différentes fonctions pulmonaires pour contrôler la fonction ventilatoire des poumons (mesure des volumes mobilisables et des débits).

Publications de référence

- Breitbart M, Salamon P, Andresen B *et al.*** Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *PNAS* 2002; 99: 14250-14255.
- Katayama H, Haramoto E, Oguma K *et al.*** One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res.* 2008; 42: 1441-1448.

Revue de la littérature

- Gralton J, Tovey E, McLaws ML *et al.*** The role of particle size in aerolised pathogen transmission: a review. *J Infect.* 2011; 62: 1-13.

Autres publications identifiées

Hwang GM, DiCarlo AA, Lin GC. An analysis on the detection of biological contaminants aboard aircraft. *Plosone*. 2011. 6 (1) e14520 open access.

L'objectif de cette étude était de tester l'efficacité d'un appareil biosenseur pour détecter les virus et bactéries aéroportés dans un avion lors d'un vol long courrier et avec différents scénarios d'exposition (éternuements, toux, respiration normale). Les résultats montrent que l'appareil en question n'est pas assez sensible pour détecter efficacement les micro-organismes aéroportés dans les avions.

Turgeon N, McNicoli F, Toulouse MJ et al. Neuraminidase activity as a potential enzymatic marker for rapid detection of airborne viruses. *Aerosol Sci Technol*. 2011; 45: 183-195.

L'objectif de cette étude était d'utiliser le dosage de l'activité d'une enzyme commune à plusieurs virus respiratoires (la neuraminidase) pour estimer la présence de virus aéroportés. Des essais faits en chambre contrôlée, et dans un élevage de porcs sont concluants.

Choi KM, Johnson ES. Industrial hygiene assessment of reticuloendotheliosis viruses exposure in the poultry industry. *Int Arch Occup Environ Health*. 2011; 84: 375-382.

L'objectif de cette étude était de mesurer indirectement l'exposition à un virus de poulet (non pathogène pour l'Homme) de travailleurs manipulant des volailles par test immunologique. Cette étude n'est pas très concluante car une augmentation des anticorps suite à une exposition virale n'est pas un indicateur de risque pour la santé.

Wu Y, Shen F, Yao M. Use of gelatin filter and bioSampler in detecting airborne H5N1 nucleotides, bacteria and allergens. *J Aerosol Sci*. 2010; 41: 869-879.

L'objectif de cette étude était de comparer deux techniques de prélèvements de micro-organismes et allergènes aéroportés (les filtres en gélatine et un barboteur « biosampler ») pour différents types de virus, de bactéries et d'allergènes dans différents environnements. Les résultats montrent que l'efficacité de l'une ou l'autre méthode dépend du type de micro-organisme et du type de milieu.

Mots clés utilisés pour la recherche bibliographique

Airborne virus, Environmental health, Occupational health, Viral exposure, Waterborne virus.