

La pollution virale des eaux usées, de surface et d'alimentation

Etude effectuée dans le département français de Meurthe-et-Moselle

J.-M. FOLIGUET,¹ L. SCHWARTZBROD² & O. G. GAUDIN³

Des recherches sur la pollution virale du milieu hydrique, destinées à étudier le cycle de contamination eaux usées → eaux superficielles → eaux d'alimentation, ont été effectuées dans une zone géographique bien déterminée du département français de Meurthe-et-Moselle.

Sur 697 prélèvements obtenus par la méthode des « gazes flottées », 130 se sont révélés positifs, soit 35,2 % en égouts, 9,1 % en rivières et 8 % dans les eaux destinées à la consommation humaine. Parmi les 150 souches d'entérovirus isolées, le sérotype coxsackievirus B5 est apparu comme le virus le plus important par sa fréquence, sa diffusion et sa permanence dans l'espace et le temps.

Cette étude a souligné le caractère mouvant de l'écologie des entérovirus dans le milieu hydrique, reflet plus fidèle que l'expression clinique de l'existence et de la circulation de la flore fécale humaine originelle, l'impérieuse nécessité de leur destruction dans les eaux usées avant leur rejet dans le milieu extérieur et le danger potentiel qu'ils constituent d'une façon permanente pour toute collectivité humaine dans l'eau qu'elle est appelée à consommer.

Des recherches systématiques sur la pollution virale de l'eau ont été entreprises d'octobre 1961 à octobre 1963 dans une zone géographique limitée du département de Meurthe-et-Moselle. Leur but essentiel était d'essayer de montrer tout d'abord dans quelle mesure les eaux usées, rejetées sans traitement dans le milieu naturel que constituent les eaux des rivières, entraînent leur contamination par les virus d'origine fécale; ensuite, de mettre l'accent sur le danger que peuvent présenter ces dernières dans la transmission directe ou indirecte de ces virus à la collectivité humaine par l'intermédiaire des eaux de consommation, même préalablement traitées.

Les investigations ont porté sur les eaux de la Meurthe et de la Moselle, ainsi que sur les eaux d'égout et d'alimentation de certaines grandes agglomérations: Nancy, Lunéville, Blainville, Bac-

carat et Toul, riveraines de l'une ou l'autre de ces deux rivières.

Certaines considérations ont présidé à ce choix géographique:

1. Toute la vie socio-économique du sud du département, et notamment les centres précités, est située sur ces deux cours d'eau;

2. Aucune des villes mentionnées ne possède de station de traitement de ses eaux usées: la Meurthe se trouve en permanence soumise à la pollution constante d'amont en aval des effluents d'égouts des villes de Baccarat, Lunéville, Blainville et Nancy. Les eaux-vannes de Toul se déversent dans la Moselle avant son confluent avec la Meurthe;

3. Nancy prélève ses eaux brutes dans la Moselle et les traite par l'ozone avant consommation; Lunéville les prend dans la Meurthe et les épure par le chlore;

4. Au cours de l'épidémie de poliomyélite de 1957, la majorité des cas s'est concentrée dans le bassin hydrographique de ces deux rivières, avec une nette prédominance dans les localités riveraines étudiées.

¹ Professeur agrégé d'Hygiène, Chef de la Section de virologie appliquée à l'hygiène et à l'épidémiologie, Institut régional d'Hygiène, Nancy, France.

² Chef de travaux de bactériologie, Faculté de Pharmacie, Université de Nancy.

³ Chef de laboratoire (Virologie) au Laboratoire national de la Santé publique, Lyon, 8^e, France.

L'évaluation de cette pollution virale a été menée sur le double plan quantitatif et qualitatif, dans l'espace et dans le temps, afin de préciser:

- a) l'existence de virus dans les divers milieux hydriques;
- b) l'importance et la permanence de cette présence;
- c) le dénombrement des types, leur fréquence et leur répartition;
- d) leur rapport avec certains secteurs névralgiques urbains;
- e) leurs variations saisonnières;

et d'en tirer quelques enseignements utiles à la santé publique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Prélèvements

Ils furent effectués par la méthode des « gazes flottées », dérivée de celle de Moore (1948), rapportée par Foliguet (1962) et par Coin (1963). Immédiatement après la collecte, chaque gaze était exprimée stérilement, donnant environ 150 à 200 ml de liquide. Après décantation, 50 ml étaient prélevés et agités avec 2,5 g de résine échangeuse d'ions basique (Dowex I, 10 X, 200-400 mesh), et 15 ml de Subtosan (Specia), solution de polyvinylpyrrolidone à 35 pour 1000, pendant 15 minutes. Après centrifugation à 6000 tr/min pendant 15 minutes à 0°C, le culot était repris par 5 ml de bouillon nutritif (Difco) à pH 8,5, soumis ensuite à une 2^e agitation et une centrifugation identiques. Aux 5 ml de surnageant constituant l'éluat final étaient ajoutés 5000 unités de pénicilline, 250 µg de streptomycine et 250 µg de néomycine par ml, le tout étant stocké au congélateur à -20°C. Avant chaque épreuve, l'éluat était à nouveau centrifugé à 3000 tr/min pendant 15 minutes à 0°C, puis introduit sous le volume de 0,1 ml dans les tubes de cultures cellulaires ou inoculé au souriceau (0,1 ml).

Cultures cellulaires

Chaque échantillon a été testé sur deux types de cultures cellulaires: rein de singe et cellules de souche KB. Certains ont été passés en cellules embryonnaires de lapin (rein et muscle).

Cellules de rein de singe. Ces cellules de babouin, de primo-explantation, étaient obtenues sur milieu à l'hydrolysate de caséine, type Lépine (1956), avec 3% de sérum de poulain, et maintenues dans le même milieu sans sérum.

Cellules KB. Ces cellules de souche, entretenues au laboratoire, étaient cultivées dans le même milieu de croissance que précédemment, mais avec 10% de sérum de poulain. Cette concentration était ramenée à 3% après ensemencement des cultures.

Souriceaux

Les animaux de souche Swiss, âgés de moins de 48 heures, étaient inoculés par portées de 6 à 8 par la seule voie intracérébrale. Après observation de dix jours, les souriceaux ne présentant aucune anomalie étaient broyés pour effectuer un 2^e passage. Les animaux malades étaient éviscérés et un broyat de matière cérébrale ou musculaire utilisé pour un passage ultérieur. Un examen anatomo-pathologique était concurremment pratiqué.

Isolements

Chaque tube incubé en position stationnaire à 37°C était contrôlé quotidiennement pendant dix jours et éliminé après trois passages successifs négatifs. Tout effet cytopathogène était confirmé par une subculture supplémentaire et le surnageant stocké à -20°C.

Identification

Pour le classement des entérovirus isolés en cultures, les souches étaient d'abord engagées en tubes dans des épreuves de neutralisation avec les antisérums antipoliomyélitiques. Les virus non polio-

TABLEAU 1
RÉPARTITION DES ENTÉROVIRUS ISOLÉS DANS LE MILIEU HYDRIQUE

Prélèvements		Nombre de souches isolées	Souches isolées											
Nombre	Positifs		Poliovirus		Coxsackievirus A		Coxsackievirus B		Echovirus		Réovirus		Virus non classés	
			Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
697	130	150	21	14	11	7,3	60	40	27	18	5	3,3	26	17,3

TABLEAU 2
DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES PRÉLÈVEMENTS POSITIFS EN FONCTION DU SECTEUR HYDRIQUE EXPLORÉ

Lieu de prélèvement	1961-1962			1962-1963			1961-1963		
	Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs		Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs		Nombre de prélèvements	Prélèvements positifs	
		Nombre	%		Nombre	%		Nombre	%
A. Isolements en égouts									
Nancy	110	51	46,3	—	—	—	110	51	46,3
Lunéville	29	13	44,8	—	—	—	29	13	44,8
Toul	27	10	37,0	57	9	15,8	84	19	22,6
Baccarat	24	7	29,1	—	—	—	24	7	29,1
Blainville	14	2	14,3	—	—	—	14	2	14,3
Total	204	83	40,6	57	9	15,8	261	92	35,2
B. Isolements en rivières									
Meurthe à Baccarat	22	4	18,1	—	—	—	22	4	18,1
Lunéville	22	3	13,6	87	4	4,5	109	7	6,4
Blainville	19	1	5,3	—	—	—	19	1	5,3
Nancy	25	11	44,4	79	0	0,0	104	11	10,5
Moselle à Toul	20	2	10,0	—	—	—	20	2	10,0
Total	108	21	19,4	166	4	2,4	274	25	9,1
C. Isolements en eaux destinées à l'alimentation									
Nancy									
Eau brute	9	1	11,1	—	—	—	9	1	11,1
Postfloculation	10	2	20,0	—	—	—	10	2	20,0
Postfiltration	10	1	10,0	—	—	—	10	1	10,0
Postozonisation	5	0	0,0	—	—	—	5	0	0,0
Total	34	4	11,8	—	—	—	34	4	11,8
Lunéville									
Eau brute	8	1	12,5	22	0	0,0	30	1	3,3
Postfloculation	9	1	11,1	12	1	8,3	21	2	9,5
Postfiltration	9	1	11,1	12	0	0,0	21	1	4,7
Postchloration	9	0	0,0	12	0	0,0	21	0	0,0
Total	35	3	8,5	58	1	1,7	93	4	4,3
Autre origine	10	2	20,0	25	3	12,0	35	5	14,2
Total	79	9	11,3	83	4	4,8	162	13	8,0

myélitiques étaient classés par neutralisation sur plaques en présence de pools de divers sérums neutralisants, puis de sérums monovalents anti-coxsackievirus et anti-échovirus. Ceux isolés sur sourceaux ont été identifiés *pro parte* sur l'animal en présence d'antisérums de référence.

RÉSULTATS

Résultats quantitatifs et qualitatifs

Sur 697 prélèvements effectués, 130 s'avèrent positifs (tableau 1). Le tableau 2 résume leur répartition géographique selon le secteur hydrique exploré

pendant la double période 1961-1962 et 1962-1963. Les 130 échantillons positifs permirent l'isolement de 150 entérovirus dont 124 purent être classés (tableaux 1 et 3). La prédominance des coxsackievirus (47,3%) par rapport aux échovirus (18%) et aux virus poliomyélitiques (14%) est à souligner d'emblée. Par ailleurs, les coxsackievirus B apparaissent bien plus fréquents que les coxsackievirus A (40% contre 7,3%) avec une prépondérance marquée des sérotypes B5 (60% des coxsackievirus B), B3 (13,3%) et B1 (1,6%). Dans les échovirus, les types 1 et 7 sont trouvés avec une fréquence identique alors que dans les virus poliomyélitiques le type 1 prédomine (57,1%).

Un certain nombre de ces entérovirus (17,3%) n'a pu être classé. Pour 14 d'entre eux, il s'agit de souches perdues au cours des différents passages ou stockages, dont celles cultivées sur cellules embryonnaires de lapin qui n'ont pu être subcultivées sur les autres systèmes cellulaires utilisés.

Aucun autre virus pouvant être éventuellement rencontré dans les matières fécales (adénovirus, virus de herpès, etc...) n'a été isolé dans les eaux étudiées.

Aspect virologique des isolements

Ces recherches virologiques dans le milieu hydrique ont mis en évidence deux faits qu'il convient de développer: les infections mixtes des échantillons et la sensibilité des systèmes d'isolement employés.

Infections mixtes. Sur 130 échantillons, 18 (soit 17 fois en égouts et 1 fois en rivières) montrèrent une infection multiple. Elle fut triple dans 2 cas, l'un avec les poliovirus 1 et 3 et le coxsackievirus B, l'autre avec les coxsackievirus A et B5 et l'échovirus 1; double dans 16 cas, avec dans 3 cas le coxsackievirus B5 et l'échovirus 1, dans 2 cas le poliovirus 1 et le coxsackievirus B5, les autres associant indifféremment deux types de l'un ou l'autre groupe d'entérovirus.

Sensibilité des systèmes d'isolement. L'étude comparative de la fréquence des entérovirus isolés par rapport aux systèmes cellulaires employés et à la maladie expérimentale obtenue chez le souriceau nouveau-né a donné les résultats suivants (tableau 3).

Les cellules de rein de singe se sont montrées plus sensibles aux poliovirus (80,9%) que les cellules de souche KB (19%). A l'inverse, ces dernières se sont révélées d'une sensibilité supérieure vis-à-vis des coxsackievirus B (54,9% des souches) par rapport aux cellules de rein de singe (7%). Cette double

constatation est en contradiction avec toutes les conclusions admises jusqu'à présent, en particulier celles de Kelly, Winsser & Winkelstein (1957). La totalité des échovirus et des réovirus a été isolée en cellules de rein de singe, alors que tous les coxsackievirus A ne se sont manifestés que sur souriceaux. Deux souches ont donné simultanément un effet cytopathogène sur cellules embryonnaires de lapin.

Sur les 60 souches de coxsackievirus B, 25 (41,6%) ont été identifiées sur souriceaux, à l'exception des types B3 alors que les types B5 ont donné 34 fois des résultats positifs en cellules contre 9 seulement sur l'animal. Par ailleurs plusieurs souches d'origine cellulaire réinoculées au souriceau sont restées sans effet et un certain nombre de celles isolées sur souriceaux n'a pu être adapté aux cultures cellulaires (15%).

Enfin 17% seulement des souches ont montré un effet cytopathogène sur cellules de rein de singe au 1^{er} passage contre 93% au deuxième. Sur les cellules KB, trois passages successifs ont donné respectivement: 30%, 55% et 15% de positivité.

Entérovirus et environnement hydrique

Le tableau 3 indique comment se répartissent les différents types d'entérovirus selon les catégories d'eau examinées. Les virus poliomyélitiques représentent 16,3% des entérovirus isolés dans les eaux d'égouts, avec parité des types 1 et 3, et 11,5% de ceux rencontrés en rivières.

La distribution des coxsackievirus s'établit comme suit: dans les égouts, 44,5% avec 22,7% du type B5; dans les rivières, 46,1% dont 15,3% du type B5; en eaux d'alimentation, 71,4% dont 50% du type B5.

Pour les échovirus, la répartition est de 21,8% pour les égouts avec double prédominance des types 1 et 7 (8,1%); de 11,5% pour les rivières où l'on retrouve les deux types précités. Mais aucun échovirus n'a été trouvé en eau d'alimentation.

Le pourcentage des entérovirus non classés est plus important en rivières (30,7%) et en eaux d'alimentation (21,4%) qu'en égouts (13,6%). Il convient de souligner certaines difficultés rencontrées au cours des typages qui peuvent laisser supposer l'existence de sérotypes difficilement classables.

L'étude du cycle successif de pollution virale eaux d'égouts → eaux de rivières → eaux destinées à la consommation fait apparaître comme caractéristiques essentielles:

a) l'importance et le polymorphisme de la flore entérovirale en égouts, confirmation d'un fait déjà antérieurement amplement démontré;

TABLEAU 3
TYPES DE VIRUS ISOLÉS SUR CELLULES ET SUR SOURICEAUX SELON LE MILIEU HYDRIQUE

Type		Virus isolés					Isolements obtenus en					
		Nombre	Sur cellules			Sur sou- riceaux	Egouts		Rivières		Eau d'ali- mentation	
			RS ^a	KB	EL ^b		Nombre	%	Nombre	%	Nombre	%
Poliavirus	1	12	11	1	0	0	9		3		—	
	2	1	1	0	0	0	1		—		—	
	3	8	5	3	0	0	8		—		—	
	Total	21	17	4	0	0	18	16,3	3	11,5	—	
Coxsackievirus A		11	0	0	2 ^c	11	6		5		—	
Coxsackievirus B1		1	0	1	0	1	1		—		—	
	B3	8	1	7	0	0	7		—		1	
	B5	36	3	31	0	9	25	22,7	4	15,3	7	50,0
	B non typés	15	0	0	3 ^c	15	10		3		2	
	Total	71	4	39	5 ^c	36	49	44,5	12	46,1	10	71,4
Echovirus	1	10	10	0	0	0	9	8,1	1		—	
	3	1	1	0	0	0	1		—		—	
	4	1	1	0	0	0	1		—		—	
	6	1	1	0	0	0	1		—		—	
	7	11	11	0	0	0	9	8,1	2		—	
	12	1	1	0	0	0	1		—		—	
Echovirus non typés		2	2	0	1	0	2		—		—	
	Total	27	27	0	1	0	24	21,8	3	11,5	—	
Réovirus		5	5	0	0	0	4	3,6	—		1	7,1
Virus non classés		26	9	5	14	0	15	13,6	8	30,7	3	21,4
	Total	150	62	48	20	36	110		26		14	

^a RS = cellules de reins de singe.

^b EL = cellules embryonnaires de lapin.

^c Effet cytopathogène simultané en cellules embryonnaires de lapin.

b) la perte progressive, pour un nombre de prélèvements sensiblement identique, de la diversification des types rencontrés en rivières, encore plus accentuée dans les eaux d'alimentation. Mais il ne s'agit là, certes, que d'une image très inexacte de ce qui existe réellement, étant donné le faible volume d'eau exploré par des méthodes très rudimentaires, la dilution et la dispersion des particules et, en définitive, le rapport de 1 à 4 entre le nombre de souches isolées en rivières et en égouts est nettement

supérieur au coefficient de dilution des derniers par les premières;

c) la permanence et la persistance d'un type parmi tous les autres, le coxsackievirus B5, dont le pourcentage de positivité s'accroît d'une façon sensible selon les diverses catégories d'eaux.

Entérovirus et points névralgiques urbains

Il semble de quelque intérêt de montrer comment la pollution virale du milieu hydrique peut, au regard

TABLEAU 4
ISOLEMENT D'ENTÉROVIRUS ^a DANS LES EAUX D'ÉGOUTS DE DIVERS SECTEURS URBAINS
ET INFLUENCE SAISONNIÈRE

	Oct.	Nov.	Déc.	Janv.	Fév.	Mars	Avril	Mai	Juin	Juill.	Août	Sept.	Total
Nombre de prélèvements	14	12	10	—	8	10	9	10	9	10	8	10	110
Prélèvements positifs	8	9	1	—	3	2	2	1	8	5	7	5	51
	57,1	75	10	—	37,5	20	22,1	10	88,8	50	87,5	50	46,3
3 ^e collecteur	NC, B	B1		—					E6		B3		5
Administrations		E		—	B5				P1		B5	E1	5
Marché	A, B	B, P1, P3		—					B5, E1	B5, NC		E7	10
Grand ensemble N° 2 (5500 hab. environ)				—		NC			B5, E1	B5	B5	E7	6
Hôpital militaire	NC	NC		—									2
Casernes	NC	NC		—	E7			E3	B3, B5		B5		7
2 ^e collecteur et grand ensemble N° 1 (11 000 hab. environ)	A, B5	A, B	P1	—			R		E1, B5	R	B5	E12	11
Vieille ville	A, B, P1	E7		—			R	B		NC	E7, P3		9
1 ^{er} collecteur		E7		—	B				B5		B5	E1	5
Centre hospitalo-universitaire	B			—					B5	E4			3
Total des souches isolées													63

^a A = coxsackievirus A; B = coxsackievirus B; E = échovirus; P = poliovirus; R = réovirus; NC = virus non classé.

de certains points sensibles ou névralgiques d'une agglomération (secteurs socio-économiques, eaux de la rivière réceptrice, station de traitement des eaux de consommation), être considérée comme le reflet de l'hygiène collective ou comme un facteur influençant défavorablement la santé publique.

Secteurs socio-économiques urbains et eaux d'égouts. Le tableau 4 représente la répartition géographique des 63 souches isolées de 110 prélèvements effectués en différents points du réseau d'égouts, de type unitaire, de la ville de Nancy, durant la période allant d'octobre 1961 à septembre 1962. Ces points de prélèvements ont été choisis comme représentatifs de divers secteurs socio-économiques desservis par le réseau. La densité de population, les conditions hygiéniques et sociales y sont extrêmement variables, mais ils englobent pratiquement la totalité de la capitale lorraine.

Tout le réseau aboutit sans traitement préalable dans les eaux riveraines de la Meurthe par trois collecteurs qui réunissent entre autres: le premier,

les eaux usées des casernes, de l'hôpital militaire, du grand ensemble N° 2 (5500 habitants environ), du quartier du marché et de celui des administrations; le deuxième, les effluents du Centre hospitalo-universitaire avec le service des contagieux et un cimetière; le troisième, les eaux-vannes de la vieille ville et d'un grand ensemble moderne (N° 1) de plus de 11 000 habitants.

Pour la totalité des secteurs, la diffusion des différents groupes et types d'entérovirus, dans l'espace et dans le temps, est évidente. Si certains types ne sont rencontrés que dans une partie du réseau, comme le réovirus isolé dans la vieille ville et au 2^e collecteur, les plus fortes proportions de souches isolées correspondent approximativement soit aux plus grandes concentrations de populations (grand ensemble N° 1, marché, casernes), soit aux quartiers à hygiène plus précaire (vieille ville). Les trois collecteurs enfin ne révèlent pas d'une façon évidente la somme et la variété des virus trouvés dans le même temps aux différents points d'échantillonnage.

A chacun des secteurs socio-économiques correspondent quelques caractéristiques :

a) la fluctuation importante des groupes et des types avec permanence de certains pour les uns, disparition ou variabilité plus marquée pour d'autres : pour le marché, par exemple, présence des poliovirus 1 et 3 d'abord, puis sur un fond constant de coxsackievirus B5, apparition des échovirus 1 et 7 ; pour le grand ensemble N° 1, le poliovirus 1 et le coxsackievirus A disparaissent pour ultérieurement faire place à un réovirus, au coxsackievirus B5 et aux échovirus 1 et 12 ;

b) l'absence de poliovirus aux différents prélèvements correspondant aux effluents du centre hospitalo-universitaire où étaient cependant traités durant le temps de l'enquête de nombreux cas de poliomyélite.

Ainsi donc l'étude des eaux d'égouts desservant des secteurs socio-économiques bien déterminés de la cité nancéienne conduit à souligner le caractère extrêmement mouvant de l'écologie de leur flore entérovirale à la fois dans le temps et dans l'espace, où persistent cependant d'une façon remarquable certains sérotypes, en l'espèce le coxsackievirus B5. Des échantillonnages plus rapprochés et plus nombreux auraient certes permis d'avoir une idée encore plus précise de l'influence des concentrations intra-urbaines sur cette fluctuation.

Secteurs névralgiques urbains et eaux de rivière. Le point sensible est représenté ici par la Meurthe dans

laquelle se déversent sans aucun traitement d'épuration les eaux usées des trois collecteurs d'égouts de la ville riveraine de Nancy, auxquelles s'ajoutent celles de la ville voisine de Maxéville.

La figure 1 indique la répartition des virus isolés sur une distance de 2000 m dans cette rivière à partir du plus gros des collecteurs, en quatre points différents situés à 1000 m et à 1100 m à 0,50 m de profondeur, à 1500 m à 1 m de la surface, enfin à 2000 m au fond du cours d'eau. Sur 25 prélèvements de mai à décembre, 12 souches d'entérovirus ont été isolés à tous les niveaux explorés du plan d'eau, soit 2 poliovirus de type 1, 4 coxsackievirus A, 4 coxsackievirus B, dont 3 de type B5, et 2 virus non classés.

Bien que l'on ne puisse établir une corrélation certaine entre ces types de virus et ceux émis par les différents collecteurs et rejetés dans la Meurthe, il n'en apparaît pas moins, avec une évidence certaine et dans les conditions de l'expérience, que sur 2000 mètres la pollution de la rivière réceptrice est fort importante et constante, sans que sur cette distance on puisse faire état d'une capacité auto-épuratrice efficace quelconque.

Points névralgiques au cours du traitement des eaux destinées à l'alimentation. Les recherches ont intéressé ici les usines de traitement des eaux de Nancy et de Lunéville, mais aussi des eaux d'alimentation d'origines différentes, soit eaux de sources, soit eaux superficielles traitées par le chlore ou par l'ozone. Leur échantillonnage a été effectué, pour

FIG. 1
SECTEURS NÉVRALGIQUES URBAINS ET EAUX DE RIVIÈRE

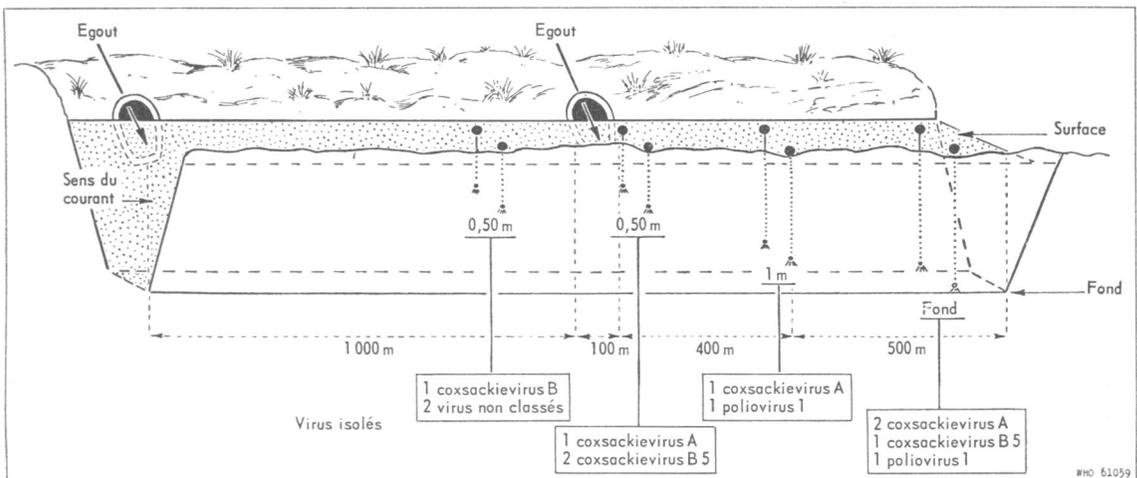


TABLEAU 5. ISOLEMENT D'ENTÉROVIRUS ^a DANS LES EAUX D'ALIMENTATION

Prélèvements		Eau brute		Après coagulation et floculation		Après préfiltration		Après filtration		Après stérilisation	
Lieu	Nombre	Origine de l'eau	Virus isolés Nombre	Nature du coagulant	Virus isolés Nombre	Type de préfiltres	Virus isolés Nombre	Type de filtres	Virus isolés Nombre	Mode de stérilisation	Virus isolés Nombre
			Type		Type		Type		Type		Type
Nancy	34	Moselle	1 NC	Sulfate d'aluminium	2 B B5	Dégrossisseurs	— ^b	Lents	1 B5	Ozone	0
Lunéville	93	Meurthe	1 B5 ^c	Néant	0	Dégrossisseurs	1 B5 ^c	Lents	2 NC B5 ^c	Chlore	0
Autre origine	25	Rivières	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b	— ^b			Ozone	2 NC B5
	10	Sources	2 ^e B3 B5							Chlore	1 R ^d

Eau distribuée sans traitement

^a B = coxsackievirus B; R = réovirus; NC = virus non classé.^b Recherche non effectuée.^c Isolé en mai 1962.^d Eau stérilisée par hypochlorite; chlore résiduel inférieur à 0,1 partie par million; recherche de coliformes et streptocoques fécaux négative.^e Chambre de captage du réseau.

les premières aux griffons ou dans les chambres de captage, pour les secondes dans le circuit de distribution. Il convient encore de préciser sur le plan hydrologique:

a) que Nancy tire ses eaux brutes de la Moselle à 11 km de sa station d'épuration. Après coagulation et floculation par le sulfate d'aluminium, préfiltration et filtration sur filtres lents, l'eau est soumise à une stérilisation par l'ozone;

b) que Lunéville prélève ses eaux brutes dans la Meurthe. Elles subissent ensuite une filtration lente (filtres dégrossisseurs, préfiltres et filtres finisseurs), sans coagulation chimique, avant d'être chlorées.

Le tableau 5 montre dans quelles conditions et à quels stades du traitement, aussi bien à Nancy qu'à Lunéville, il a été possible de mettre en évidence des entérovirus. Dans la première localité, 4 isollements positifs sur 34 prélèvements, dont 3 coxsackievirus B avec 2 de type B5; dans la deuxième, 4 entérovirus sur 93 échantillons, dont 3 coxsackievirus B5.

Mais le résultat le plus important apparaît réalisé par les souches isolées après ozonisation (un entérovirus non classé et un coxsackievirus B5) et après chloration (un réovirus) dans les 25 prélèvements provenant des stations d'épuration différentes, et les 2 coxsackievirus B3 et B5 récoltés dans la chambre de captage d'une eau de source réputée comme « bactériologiquement potable » et distribuée ainsi à la population.

Entérovirus et saisons

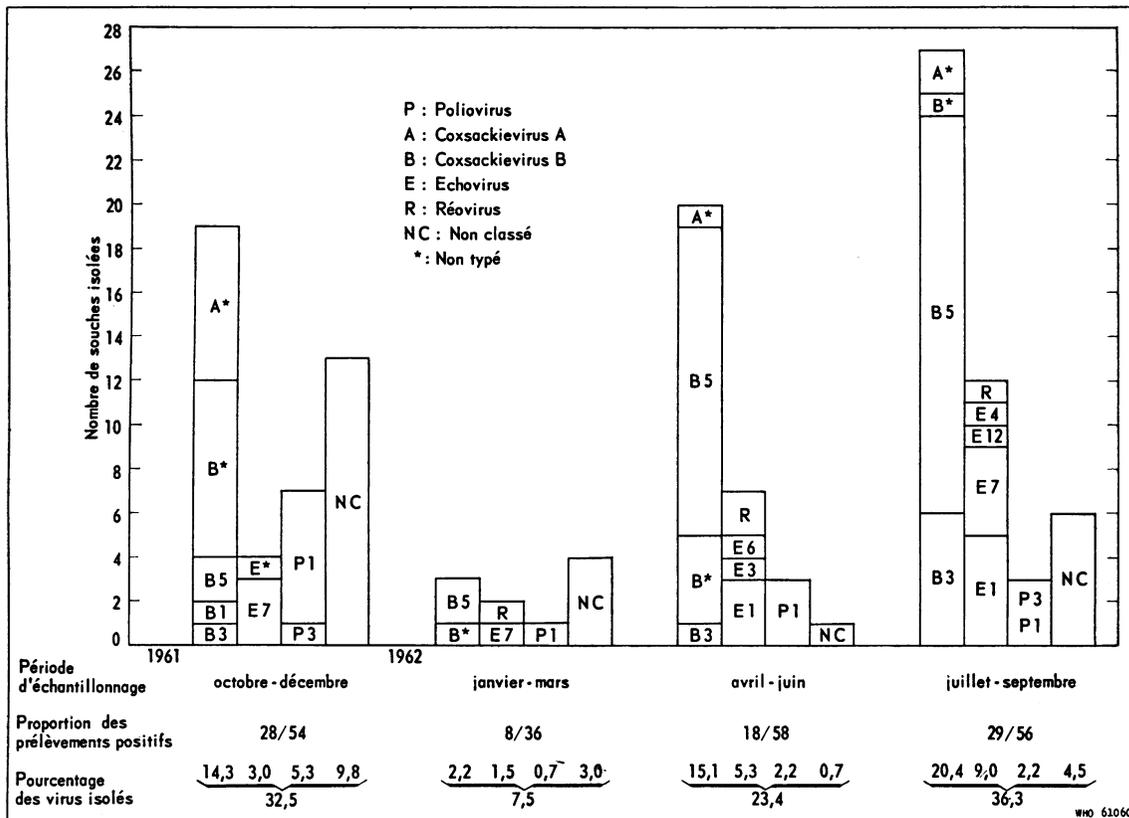
La figure 2 représente la répartition globale des différents groupes et types isolés pendant la 1^{re} année de l'enquête, d'octobre 1961 à septembre 1962, groupés par trimestres:

a) d'octobre à décembre (32,5%), prédominance très nette des coxsackievirus (14,3%), en majorité du groupe B. S'il existe une assez forte proportion d'entérovirus non classés (9,8%) du moins peut-on souligner le nombre restreint de poliovirus;

b) de janvier à mars (7,5%), réduction d'ensemble des groupes sans prévalence de l'un d'entre eux, avec persistance de fond de certains sérotypes (coxsackievirus B5, échovirus 7, poliovirus 1);

c) d'avril à juin (23,4%), augmentation sensible du nombre des coxsackievirus qui dépasse le niveau du 1^{er} trimestre (15,1%), avec B5 prédominant; accroissement parallèle, mais discret des groupes échovirus et réovirus;

FIG. 2
ENTÉROVIRUS ET SAISONS



WHO 61060

d) de juillet à septembre (36,3%), accentuation de la poussée du trimestre précédent: 20,4% de coxsackievirus avec forte prédominance des types B5 et B3, et des échovirus (9%) avec pluralité des types. Les poliovirus montrent une discrétion constante.

L'examen d'un secteur plus restreint, tel que celui des égouts de Nancy (tableau 4), montre la même fluctuation saisonnière, quantitative et qualitative. Certains virus disparaissent au cours des mois d'hiver et de printemps, puis à partir de juin réapparaît une flore importante et polymorphe, où tour à tour prédominent certains groupes ou certains types. S'il n'est pas possible d'affirmer qu'un groupe donné est remplacé par un autre, du moins peut-on remarquer que durant le mois de septembre, dans les conditions de l'expérience, il n'a été isolé que des échovirus dans les différents secteurs de la ville.

Cette variation saisonnière des types au cours

d'une même année, déjà décrite par d'autres (Melnick et al., 1954), existe aussi d'une année à l'autre. L'exemple qui a été observé dans les égouts de la ville de Toul est assez suggestif à cet égard (fig. 3) où l'on constate d'avril à septembre 1962 une prédominance quasi totale des coxsackievirus B (B3 et B5), puis dès la fin de l'été, existant simultanément mais discrètement avec le groupe précédent, l'apparition d'une flore de type échovirus qui va subsister seule d'octobre 1962 à mars 1963, pour disparaître définitivement et laisser la place aux poliovirus avec majorité de types 3 d'avril à septembre 1963.

Il est à noter dans les deux cas de Nancy et de Toul le fait assez significatif, déjà signalé par Gelfand (1961), de l'apparition plus tardive, hivernale, des échovirus parmi les différentes populations d'entérovirus.

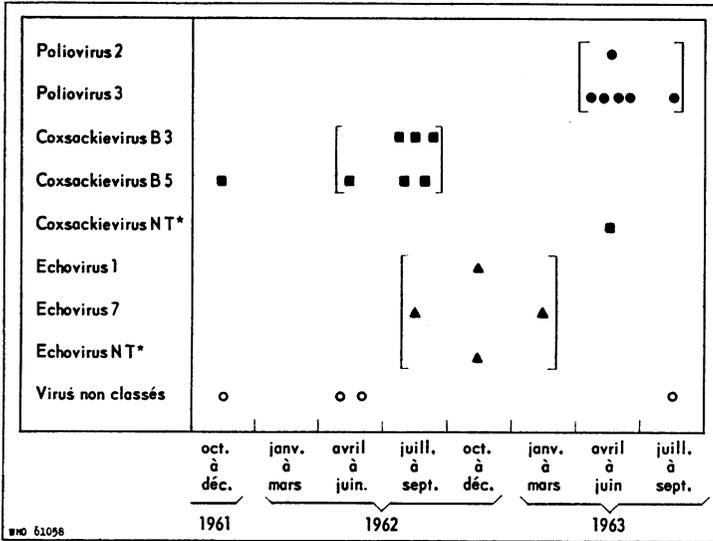


FIG. 3
VARIATIONS SAISONNIÈRES
DES ENTÉROVIRUS
(ÉGOUTS DE LA VILLE DE TOUL)

* NT = non typés.

COMMENTAIRES

L'étude virale du milieu hydrique dans son ensemble permet la confirmation de données déjà connues et énoncées par d'autres auteurs au sujet des entérovirus, mais aussi de faire quelques commentaires intéressants certaines nécessités techniques dans ce genre de recherche et les impératifs nouveaux qu'elle pose en matière de santé publique.

Données déjà connues sur les entérovirus

Ce sont leur ubiquité et leur constance dans le milieu extérieur, la variation de leur nombre, des différents groupes et types dans l'espace et dans le temps, leur fluctuation saisonnière, enfin le divorce entre leur fréquence et leur expression clinique. Un travail récent de Lamb, Chin & Scarce (1964) conclut dans le même sens.

Leur ubiquité et leur constance font qu'on les rencontre partout dans le milieu hydrique. Ils sont présents à des taux relativement élevés (35,2%) dans les égouts. Encore convient-il de souligner le rapport qui existe entre ce taux de pollution et la densité de la population desservie. Ainsi, de Blainville à Nancy, la charge en entérovirus dans les eaux usées augmente régulièrement dans le même sens que le nombre d'habitants et en fonction des groupes socio-économiques des localités considérées (tableau 6). Les rivières où se déversent ces égouts sans traitement épurateur préalable offrent une contamination non moins évidente qui, sans être aussi notable, parce que plus diluée, apparaît tout

TABLEAU 6

PRÉLÈVEMENTS POSITIFS ET NOMBRE D'HABITANTS

Ville	Nombre d'habitants	Prélèvements positifs (%)
Blainville	4 321	14,3
Baccarat	6 164	29,1
Lunéville	24 463	44,8
Nancy	133 532	46,3

aussi importante (9,1%). Encore faut-il tenir compte dans cette appréciation du fait que l'exploration n'a touché qu'une infime partie des cours d'eau intéressés, et que le mode de prélèvement des « gazes flottées » reste fort imprécis malgré l'amélioration qu'il a apportée dans ce domaine. L'eau destinée à l'alimentation de l'homme, qu'elle soit de surface ou d'origine profonde, est, elle aussi, incontestablement souillée. Bien que cette contamination soit plus intermittente et infiniment moindre, il faut souligner qu'elle existe à des degrés divers à tous les stades du traitement d'épuration, et que dans 14,2% des cas des entérovirus ont été isolés dans le réseau de distribution d'adductions publiques.

La variation à la fois quantitative, qualitative et saisonnière se retrouve quel que soit le milieu intéressé. Les pourcentages de positivité sont très nettement plus élevés en période estivo-automnale, avec cependant un certain décalage dans les rivières

vers le début de l'hiver. Peut-être faut-il y voir le délai nécessaire aux entérovirus pour diffuser dans les eaux superficielles. Il semble opportun par ailleurs de mentionner la discordance constatée, d'une part entre la Meurthe et la Moselle, dont les régimes sont très dissemblables, d'autre part d'une année à l'autre pour la seule Meurthe, mais entre deux secteurs différents de son cours :

a) à Lunéville, 13,6% de prélèvements positifs la 1^{re} année de mai à septembre contre 4,5% la 2^e année d'octobre à février exclusivement;

b) à Nancy, où les résultats positifs ont été respectivement de 44,4% contre 0%. L'application du test du χ^2 à cette dernière variation a permis de confirmer qu'elle n'était pas due au hasard. S'il est difficile d'expliquer une telle opposition d'une année à l'autre dans une rivière pourtant réputée pour sa pollution de toute nature, du moins peut-on suggérer l'intervention possible des effluents de salines situées à une quinzaine de kilomètres en amont, précisément entre Lunéville et Nancy.

Une autre constatation s'impose: le divorce entre la fréquence des entérovirus en circulation et leur faible expression clinique chez l'homme, c'est-à-dire entre « entéroviroses-infections » et « entéroviroses-maladies ». Il n'existe en effet aucune concordance entre nos résultats et ceux obtenus au cours d'investigations virologiques cliniques par d'autres auteurs pendant la même période sur le plan régional, soit en Lorraine (de Lavergne et al., 1962), soit en Alsace (Surjus et al., 1963). La responsabilité clinique des coxsackievirus, en particulier du type B5, y est infiniment moins accusée et la priorité étiologique revient aux virus poliomyélitiques. Lapinleimu & Penttinen (1963) constatent des faits analogues: dans leur étude, un échovirus de type 11 est retrouvé avec régularité pendant plusieurs mois, alors qu'aucun échovirus de ce type n'est isolé chez les sujets hospitalisés. De même, dans le cas particulier de la ville de Toul, alors que des poliovirus du type 3 étaient isolés dans les eaux d'égouts, durant la même période aucun cas clinique pouvant y être rattaché ne fut signalé dans la population. Ce fait suggère de toute évidence qu'en l'absence de cas typiques, des porteurs, des infections latentes ou inapparentes, ou des formes frustes circulent dans une collectivité en excréant des virus que les eaux d'égouts révèlent en amplifiant. Dès lors leur recherche et leur numération éventuelle dans les eaux usées apparaît comme une méthode pratique susceptible de donner une image relativement

exacte de la flore fécale et virale d'une population sus-jacente. Cette notion a du reste été avancée par Bloom et al. (1959) et reprise récemment par Clarke & Kabler (1964). Elle paraît d'autant plus valable que bon nombre d'infections à coxsackievirus restent à la fois mineures et non identifiables cliniquement, passant facilement inaperçues, et que le pouvoir pathogène de beaucoup d'échovirus n'est pas encore parfaitement connu, les types 1 et 7, les plus fréquemment rencontrés dans notre étude, étant parmi les moins pathogènes.

Nécessités techniques

La fréquence des infections mixtes surtout en eaux d'égouts peut créer des complications diagnostiques, en particulier lorsqu'un poliovirus se trouve associé à un autre virus à effet cytopathogène plus lent. Le dernier mot revient à la sérologie qui par des réactions de neutralisation successives permet les différentes identifications, et la méthode des plaques présente alors un grand intérêt. Néanmoins, dans notre expérimentation, il s'est produit fréquemment (13 fois sur 18) qu'à partir d'un même échantillon à infection mixte, un virus d'un type donné ait été isolé sur un système cellulaire et un virus d'un autre type sur un système cellulaire différent, bien que l'un et l'autre de ces systèmes se soient révélés sensibles aux deux virus isolés. La contradiction qui existe dans les isolements plus fréquents des coxsackievirus B5 en cellules que sur souriceaux n'est sans doute qu'apparente et peut s'expliquer aussi bien par le nombre trop faible d'animaux inoculés que par l'utilisation de la seule voie intracérébrale d'inoculation. Ces faits, comme la sensibilité différente des cellules aux isolements, confirment néanmoins l'absolue nécessité dans ce type de recherches d'associer au minimum à l'inoculation au souriceau nouveau-né, et par une triple voie, l'ensemencement de plusieurs types cellulaires, de souche et de primo-explantation, selon diverses modalités et en effectuant trois passages au moins, si l'on veut obtenir une image réelle de la population virale des échantillons examinés.

Encore n'évoquons-nous pas les autres virus que le milieu hydrique est susceptible de véhiculer et que nos moyens d'investigations n'ont pas permis de révéler. L'influence en pathologie et en épidémiologie humaines de certains virus animaux ou végétaux, par le canal de l'eau, demanderait à être étudiée et précisée. Autant d'objectifs pour de futures recherches.

Impératifs en matière de santé publique

Cette réalité de la pollution virale des eaux, rajeunie par des méthodes modernes d'isolement et de culture, conditionne une révision de certaines conceptions largement dépassées par les faits, et conduit à énoncer certains impératifs majeurs qui semblent s'imposer en matière de santé publique, au regard des nuisances potentielles des eaux usées, de surface ou destinées à la consommation.

« Dans les problèmes d'assainissement ou d'établissement de normes pour les eaux destinées à l'approvisionnement du public, il apparaît difficilement possible de persévérer à raisonner, si ce n'est par commodité technique ou par habitude, en bactériologiste. A une époque où la pollution chimique est à l'ordre du jour, il faut harmoniser cette conception avec celle de la pollution « biochimique et biomoléculaire » due aux virus et concevoir les problèmes en virologiste.

Les eaux d'égout restant le véhicule majeur, obligé et permanent des virus d'origine humaine, l'hygiéniste est en droit de se demander s'il peut être encore longtemps tolérable que les effluents de toute agglomération de quelque importance continuent à être rejetés sans aucun traitement épurateur dans le milieu naturel. Un notable effort devrait être accompli par les pouvoirs publics non seulement pour supprimer ces insuffisances dans l'assainissement du milieu mais encore, et à cette occasion, pour réajuster une législation trop imprécise et inadaptée. L'établissement de tout projet d'installation de traitement d'eaux usées devrait désormais comporter des caractéristiques virologiques tant dans les conditions que dans les procédés d'épuration. La réduction du nombre des particules virales dans l'effluent, sinon leur neutralisation totale, devrait être le critère d'efficacité à atteindre, que toute analyse de surveillance et de contrôle devrait s'efforcer de mettre en évidence, plutôt que d'être limitée à des « déterminations bactériologiques simples », de réalisation plus facile certes, mais ne donnant qu'une image très grossière de la réelle qualité des nuisances virales.

Cette manière de voir doit s'appliquer aux eaux superficielles, réceptable de choix des eaux usées, et aux eaux souterraines. L'ouverture de lieux de bai-

gnade, l'adoption de points de puisage ou de captage d'une eau destinée à l'alimentation, l'application du traitement le plus approprié pour en assurer la potabilité nécessitent l'introduction de normes et de méthodes d'analyse virologiques. En effet, au regard de la résistance caractéristique des entérovirus, il paraît évident que tout procédé entraînant leur destruction sera efficace contre les bactéries d'origine fécale, alors que l'inverse n'est plus conforme à la réalité d'aujourd'hui.

Dans cette optique virologique de la pollution des eaux, les recherches à entreprendre (ou à poursuivre) peuvent avoir un triple but :

1. La détermination d'un « virus-test », indicateur de pollution, dont l'absence, après traitement ou non, dans une eau destinée à l'alimentation humaine, permettra d'y affirmer celle de tous les autres. Il importe de mentionner ici qu'une étude des bactériophages (du colibacille, de *Shigella*, du bacille typhique), menée dans les différents milieux hydriques parallèlement à celle des entérovirus, objet de ce travail, n'a pas permis d'établir une relation valable entre ces deux catégories de virus fécaux. En particulier l'inexistence de phages dans une eau correctement traitée n'autorise en aucun cas à affirmer l'absence parallèle d'entérovirus. Dès lors la destruction des bactériophages ne semble pas devoir être considérée comme un test nécessaire et suffisant dans l'appréciation de la « qualité bactériologique » d'une eau de boisson.

2. L'établissement de la meilleure méthode susceptible de mettre en évidence la plus petite quantité de particules virales dans le plus grand volume d'eau à examiner.

3. La réduction des discordances d'efficacité qui existent encore entre les résultats expérimentaux au laboratoire et ceux obtenus à l'échelle industrielle dans les diverses modalités préconisées pour l'épuration virale des eaux.

L'atteinte de ce triple objectif procurera sans conteste à l'hygiéniste comme à l'épidémiologiste une assurance de sécurité et un label de garantie pour le traiteur d'eaux.

SUMMARY

The investigation described here was carried out to provide information about the extent to which sewage discharged without treatment into rivers leads to conta-

mination of water supplies with faecal viruses. The region investigated was the south of the French department of Meurthe-et-Moselle, where a number of towns discharge

untreated sewage into the rivers Meurthe and Moselle; in the poliomyelitis epidemic of 1957, most of the cases had been concentrated in the basin of these two rivers.

A total of 697 samples of sewage, river water and water in the course of purification for drinking purposes were tested for their viral content in the period from October 1961 to October 1963; 130 of these samples gave a positive reaction, with double infection in 16 cases, and triple infection in 2 cases; a total of 150 strains of enterovirus were isolated. By far the most common group was coxsackievirus (47.3%); others identified were echovirus (18%), poliovirus (14%) and reovirus (3.3%); 17.3% could not be classified. The coxsackie group was divided into 7.3% coxsackie A and 40% coxsackie B; 60% of the latter were of serotype B5. These figures were subject to considerable annual, seasonal and local variation, some of which was not easy to explain. Moreover, the culture medium used for the detection of the virus (monkey kidney cell culture, cell culture of strain KB, or newborn mice) has a considerable influence on the results. The

authors therefore recommend the use of several cell systems, combined with inoculation in test animals, with several passages, when testing for viruses.

As might be expected, the pollution rate is highest in sewage, where 35.2% of the samples gave a positive reaction. The proportion of positive samples in river water (9.1%), although lower, shows that dilution and natural processes are by no means sufficient to remove the pollution. Finally, viruses were found, with a frequency of 8%, in all stages of the purification of drinking water, in the water in the mains, and in spring water supposed to be "bacteriologically potable".

There was no correlation between the proportion of samples giving a positive reaction and the incidence of diseases caused by the viruses in question. The authors conclude that tests like those described in this paper give a better picture of the enteroviral flora of the water than clinical ones, and suggest the development and general use of a "virus test" as the most sensitive means of determining the degree of pollution of water.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bloom, H. H., Mack, W. N., Krueger, B. J. & Mallmann, W. L. (1959) *J. infect. Dis.*, **105**, 61-68
- Clarke, N. A. & Kabler, P. W. (1964) *Health Laboratory Service*, **1**, 44-50
- Coin, L. (1963) *La Technique de l'Eau*, **17**, 27-32
- Foliguet, J.-M. (1962) *Rev. Cps Santé Armées*, **3**, 523-531
- Gelfand, H. M. (1961) *Progr. med. Virol.*, **3**, 193-244
- Kelly, S., Winsser, J. & Winkelstein, W. (1957) *Amer. J. publ. Hlth*, **47**, 72-77
- Lamb, G. A., Chin, T. D. Y. & Scarce, L. E. (1964) *Amer. J. Hyg.*, **80**, 320-327
- Lapinleimu, K. & Penttinen, K. (1963) *Arch. ges. Virusforsch.*, **13**, 72-75
- Lavergne, E. de, Gilgenkrantz, S., Worms, A. M. & Le Moyne, M.-Th. (1962) *Ann. méd. Nancy*, **1**, 423-435
- Lépine, P., Slizewicz, P., Daniel, P. & Paccaud, M. (1956) *Ann. Inst. Pasteur*, **90**, 654-656
- Melnick, J. L., Emmons, J., Coffey, J. H. & Schoof, H. (1954) *Amer. J. Hyg.*, **59**, 164-184
- Moore, B. (1948) *Mth. Bull. Minist. Hlth Lab. Serv.*, **7**, 241-248
- Surjus, A., Lausecker, Ch., Reeb, E. & Lavillaureix, J. (1963) *Path. et Biol.*, **11**, 149-161