

AVIS

de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments relatif à la demande d'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like dans certaines eaux minérales naturelles européennes embouteillées

Par courrier reçu le 29 avril 2002, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments (Afssa) a été saisie le 23 avril 2002 par la Direction générale de la santé d'une demande d'avis relatif à l'évaluation du risque sanitaire lié à la présence éventuelle de fragments de génome du virus Norwalk-like¹ (NVL) dans certaines eaux minérales naturelles européennes embouteillées.

Après consultation du groupe de travail « virus transmissibles à l'homme par voie orale » le 21 juin 2004 et des Comités d'experts spécialisés « Eaux » et « Microbiologie » le 6 juillet 2004, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments rend l'avis suivant :

I - Contexte de la saisine

La saisine fait suite aux travaux de Beuret et al. (Laboratoire cantonal de Soleure) publiés en 2000 dans *Journal of Food Protection*² et en 2002 dans *Applied and Environmental Microbiology*³ ;

Ces travaux font état de la présence de fragments de génome du virus Norwalk-like¹ (NVL) dans certaines eaux minérales naturelles embouteillées de marques européennes :

- La publication de 2000 fait état de la mise en évidence de la présence de fragments du génome de virus Norwalk-like dans 33 % des 63 bouteilles d'eau minérale examinées (29 marques différentes) ;
- La publication de 2002 fait état de la détection de fragments de génome de virus Norwalk-like¹ dans respectivement 30 %, 34 % et 36 % des bouteilles d'eau minérale de trois marques différentes. En outre, la persistance des génomes de virus est mise en évidence après un an de stockage des eaux. Le niveau de contamination de ces eaux minérales est estimé entre 10 à 100 fragments de génome par litre d'eau.

II - Limites des méthodes utilisées

Les techniques d'amplification génique sont de façon générale fondées sur les techniques moléculaires de RT-PCR⁴ et de PCR. En fonction des amorces utilisées, elles permettent la détection de tous les génotypes viraux dont la séquence nucléotidique est connue. Ces techniques sont rapides, spécifiques, très sensibles et peuvent être quantitatives.

¹ Actuellement appelés Norovirus

² Beuret Ch., Kohler D. and Lüthi T.M., Norwalk-Like Virus Sequences Detected by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction in Mineral Waters Imported into Bottled in Switzerland. *Journal of Food Protection*. 2000 ; 63(11) : 1576-82

³ Beuret Ch., Kohler D., Baumgartner A. and Lüthi T.M., Norwalk-Like Virus Sequences in Mineral Waters : One-Year Monitoring of Three Brands. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Apr; 68(4) : 1925-31

⁴ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction

Toutefois, ces techniques sont associées à des risques de faux-négatifs et de faux-positifs qui nécessitent des mesures de bonnes pratiques de laboratoire adaptées aux contraintes de la biologie moléculaire⁵.

S'agissant des faux-positifs qui concernent la problématique soulevée par la saisine, ceux-ci sont principalement rencontrés lors d'un traitement post PCR (Nested PCR...). Ces faux-positifs peuvent être dus :

- soit à des contaminations de laboratoire favorisées par la manipulation de produits post-PCR riches en séquences cibles ;
- soit à des amplifications non spécifiques qui dépendent des conditions de PCR et de la spécificité des amorces. A titre d'exemple, Lamothe et al.⁶ obtiennent 2,44 % de faux-positifs en analysant des eaux minérales (n=718) de différentes provenances par RT "seminested" PCR ciblant les Norovirus. Par ailleurs, une étude multicentrique réalisée au cours de l'année 2000, intégrant 7 laboratoires européens indépendants, dont le laboratoire cantonal de Soleure, confirme ce risque puisque 7 à 8 % de faux positifs sont observés (n=300)⁷.

S'il est difficile d'apprécier le risque de faux-positifs sur des résultats décrits dans une publication, il est néanmoins légitime de s'interroger sur l'interprétation qui peut être faite d'un pourcentage d'échantillons positifs toujours identique (30 %, 34 % et 36 %), malgré une origine très différente des eaux examinées par Beuret et al. La spécificité de la réaction pourrait être néanmoins argumentée si les résultats des séquençages excluaient totalement l'hypothèse d'une contamination croisée avec les témoins positifs ou avec des échantillons fortement contaminés. En effet, aucune indication n'est donnée quant à la caractérisation des virus qui seraient présents dans l'ensemble des échantillons étudiés au laboratoire.

Sur le fondement des éléments relatifs aux publications de Beuret et al. et aux travaux qui ont suivi démontrant la sensibilité des méthodes aux contaminations croisées, il n'est pas possible d'écarter l'hypothèse que les résultats obtenus puissent correspondre à des faux-positifs.

III - Enseignements tirés des autres études disponibles

D'autres études relatives à la détection de génomes dans des eaux minérales ont été menées.

- Lors de l'étude multicentrique précédemment citée, 300 bouteilles de contenance 1,5 L, ainsi que des échantillons de 100 L d'eaux minérales naturelles ont été testés simultanément. Cette étude n'a pas révélé la présence de fragments de génome de virus NVL dans 10 eaux minérales de marques différentes dont celles incriminées dans les travaux de Beuret et al.
- Dans l'étude réalisée par Lamothe et al. sus-mentionnée⁶, utilisant une méthodologie similaire à celle de Beuret et al. (hormis une différence dans le choix des amorces), 718 bouteilles et échantillons d'eaux minérales naturelles de 1 ou 1,5 litres (36 marques différentes), des échantillons de volume plus important (10 et 400 à 500 litres) et des écouvillons ont été analysés. Les résultats obtenus n'ont pas permis de démontrer la présence de génomes de NVL dans ces eaux minérales naturelles.

Ainsi, les résultats de deux études menées suite aux publications de l'équipe de Beuret et al. n'ont pas confirmé la présence de génomes de NVL dans les eaux minérales.

⁵ Des projets de normes européennes traitant des exigences relatives aux méthodes de biologie moléculaire dans le cadre de la microbiologie des aliments sont soumis à enquête (référence PR NF EN ISO 22174, PR NF EN ISO 20838, PR NF EN ISO 20837, PR NF EN ISO 20836 et PR NF EN ISO 20836). De plus, un groupe de travail européen est chargé d'établir une norme concernant spécifiquement les méthodes de détection des virus (CEN/TC 275- FOOD ANALYSIS - HORIZONTAL METHODS WG 6 – Microbial contamination TAG 4 – Detection of viruses in food).

⁶ Lamothe et al., 2003. Reverse Transcription-PCR Analysis of Bottled and Natural Mineral Waters for the Presence of Noroviruses

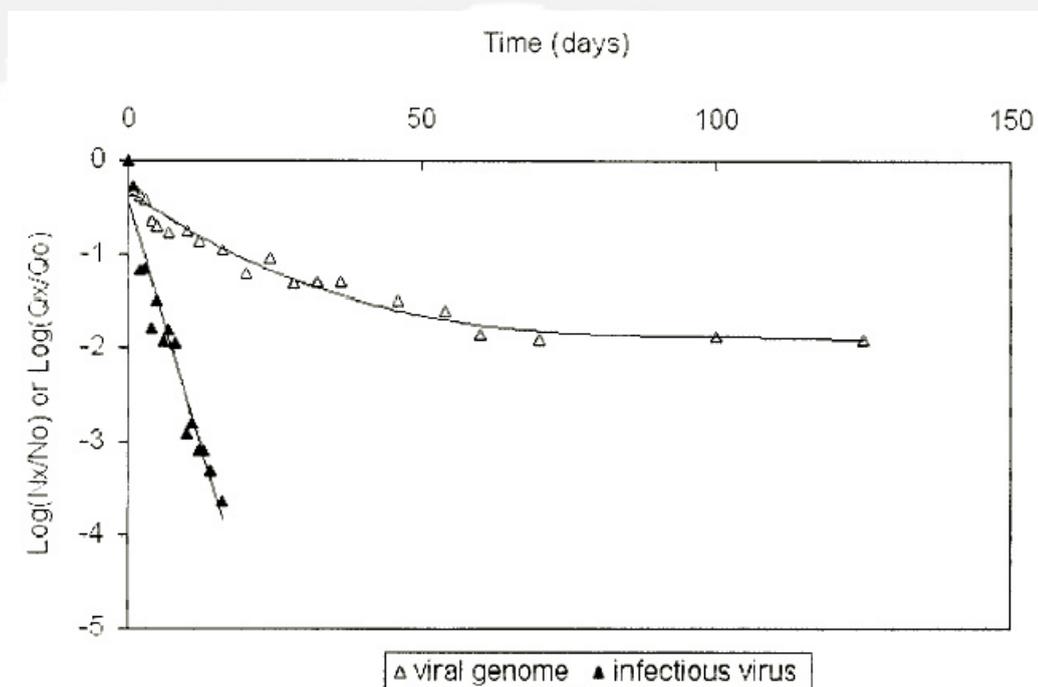
⁷ "Virus in mineral water" Final Report January 2002 (100 sheets)

IV - Signification de la présence de génome de virus dans les eaux minérales naturelles

De très nombreuses études bibliographiques ont montré qu'il était possible de détecter du génome sans pour autant isoler le virus infectieux correspondant⁸.

Si peu de données sont disponibles sur les mécanismes d'inactivation d'une particule virale (dégradation du génome et dégradation de la capside), la cinétique d'inactivation d'une particule virale infectieuse et la cinétique de dégradation d'un fragment de génome sont souvent différentes dans un même milieu, notamment dans l'eau minérale. Ainsi, Gassilloud et al.⁹ observent une persistance plus grande du génome viral quelle que soit la température (entre 4 °C et 35 °C) et quel que soit le virus (calicivirus félin f9, poliovirus 1). Ceci implique que plus l'origine de la contamination est éloignée dans le temps, plus la discordance entre présence de génome et présence de particule infectieuse est importante. Par exemple la figure 1 représente les cinétiques de disparition du poliovirus 1 infectieux d'une part et du génome viral d'autre part dans une eau minérale à 35 °C (Gassilloud et al., 2002).

Figure 1 : Devenir du poliovirus 1 en fonction du temps dans une eau minérale à 35 °C estimé selon deux référentiels : la perte d'infectiosité mesurée par culture cellulaire (triangle noir) et la dégradation des génomes mesurée par RT-PCR (triangle blanc) (Gassilloud et al., 2002)



Par ailleurs, les paramètres impliqués dans la perte d'infectiosité et la dégradation des génomes sont différents. Il semble probable que la température augmente simplement la cinétique de dégradation de la capside et que le génome n'est dégradé que dans un second temps (par exemple par des ribonucléases).

Ainsi, la présence de génome viral ne permet pas de témoigner systématiquement de la présence d'une particule virale complète et encore moins de son caractère infectieux.

⁸ Ma J.F., T.M. Straub, I.L. Pepper and C. Gerba 1994 Cell culture and PCR determination of Poliovirus inactivation by disinfectants Appl. Environ. Microbiol. 60 : 4203-4206 ; 1995 ; Sobsey M.D., D.A. Battigelli, A. Shin and S. Newland 1998 RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater Wat. Sc. Technol. 12 : 91-94 ; Griffin D. W., C. J. Gibson, E.K. Lipp, K. Riley, J.H. Paul and J. Rose 1999 Detection of viral pathogens by reverse transcriptase PCR and of microbial indicators by standard methods in the canals of the Florida Keys. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 4118-4125 ; Nuansuwan S. and D.O. Cliver 2003. Capsid functions of inactivated human picornaviruses and feline calicivirus. Appl. Environ. Microbiol. 69 : 350-357

⁹ Gassilloud B, Schwartzbrod L, Gantzer C. Presence of viral genomes in mineral water: a sufficient condition to assume infectious risk? Appl Environ Microbiol. 2003 Jul;69(7):3965-9

V - Appréciation quantitative du risque potentiel

Au vu des résultats d'analyses obtenus par Beuret et *al.*, et à partir des caractéristiques des virus et des facteurs d'exposition une appréciation quantitative du risque infectieux lié à la consommation de l'eau minérale contenant de 10 à 100 génomes viraux est en cours d'élaboration.

VI – Données épidémiologiques

Il n'existe pas à ce jour de données épidémiologiques disponibles permettant d'associer des cas de gastro-entérites liés aux NLV faisant suite à la consommation d'eaux minérales naturelles embouteillées.

Conclusions

Au vu de l'ensemble de ces éléments, l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments :

1. estime que :
 - sur le fondement des éléments présentés dans les publications de Beuret et *al.* et des résultats des études menées par la suite, qui n'ont pas confirmé la présence de génomes de NLV dans les eaux minérales, on ne peut écarter l'hypothèse que les résultats obtenus par Beuret et *al.* puissent correspondre à des faux-positifs,
 - la présence de génomes viraux ne permet pas de témoigner systématiquement de la présence de particules virales complètes et encore moins de leur caractère infectieux.
2. souligne en conséquence qu'en l'état actuel des connaissances scientifiques et en l'absence de méthodes standardisées et normalisées, les techniques de biologie moléculaire sont des outils de recherche (utilisés lors d'études scientifiques) ou d'investigation (en complément des investigations cliniques et épidémiologiques de toxi-infections alimentaires collectives et d'épidémies), mais que le contrôle en routine des eaux minérales naturelles par l'intermédiaire de ces méthodes de biologie moléculaire ne permet pas de caractériser de façon indiscutable un risque infectieux lié à ces eaux.
3. souligne par ailleurs qu'il n'existe pas à ce jour de données épidémiologiques disponibles permettant d'associer des cas de gastro-entérites liés aux NLV faisant suite à la consommation d'eaux minérales naturelles embouteillées.
4. indique que les travaux du groupe «Virus transmissibles à l'homme par voie orale» viendront compléter certains aspects, tels que l'appréciation quantitative du risque potentiel lié aux résultats de Beuret et *al.* et, plus généralement, les questions liées au contrôle sanitaire des eaux.

Martin HIRSCH