

Le directeur général

Maisons-Alfort, le 19 février 2021

AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

relatif au projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de COVID-19

L'Anses met en œuvre une expertise scientifique indépendante et pluraliste.

L'Anses contribue principalement à assurer la sécurité sanitaire dans les domaines de l'environnement, du travail et de l'alimentation et à évaluer les risques sanitaires qu'ils peuvent comporter.

Elle contribue également à assurer d'une part la protection de la santé et du bien-être des animaux et de la santé des végétaux et d'autre part à l'évaluation des propriétés nutritionnelles des aliments.

Elle fournit aux autorités compétentes toutes les informations sur ces risques ainsi que l'expertise et l'appui scientifique technique nécessaires à l'élaboration des dispositions législatives et réglementaires et à la mise en œuvre des mesures de gestion du risque (article L.1313-1 du code de la santé publique).

Ses avis sont publiés sur son site internet.

L'Anses a été saisie le 19 octobre 2020 par le Ministère de la transition écologique (Direction générale de l'aménagement du logement et de la nature) pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'avis sur le projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de COVID-19 » (ANNEXE 2).

Le présent avis fait état des connaissances disponibles au 31 décembre 2020.

1. CONTEXTE ET OBJET DE LA SAISINE

Depuis le début de l'épidémie de la COVID-19, plusieurs études ont mis en évidence la présence de génome (ARN viral) du SARS-CoV-2 dans les eaux usées (EU). Cela a conduit les Ministères de l'agriculture et de l'alimentation et de la transition écologique à interroger l'Anses sur les risques de propagation du virus *via* l'épandage des boues urbaines produites par les stations de traitement des eaux usées (STEU) sur les sols agricoles et les éventuelles mesures à prendre pour limiter ce risque.

Au cours des mois de mars et avril 2020, l'Anses a été saisie en urgence, en lien avec la possible présence du virus SARS-CoV-2 (agent de la maladie COVID-19) dans les EU, pour réaliser des appuis scientifiques et techniques portant d'une part, sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues urbaines produites par les STEU (Anses 2020a, 2020b) et, d'autre part, sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues produites par les stations de traitement des eaux industrielles (Anses 2020c).

Le 23 avril 2020, l'Anses s'est autosaisie pour réaliser l'état des connaissances scientifiques relatives au virus SARS-CoV-2, dans les domaines de compétences de la Direction de l'évaluation des risques (DER) (Anses 2020g). Cette note présente l'état des connaissances disponibles au 21 avril 2020 sur la présence, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans les milieux aquatiques (EU, eaux de surface, eaux souterraines, eaux saumâtres, eaux de mer), en lien avec l'excrétion fécale humaine.

Suite à l'avis du 27 mars 2020, un arrêté interministériel précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des EU urbaines pendant la période de COVID-19 a été pris le 30 avril 2020.

Cependant, l'hygiénisation des boues, recommandée par l'Agence et reprise dans l'arrêté du 30 avril 2020 comme préalable à l'épandage, n'est pas une pratique systématique au sein des collectivités. Sa mise en œuvre par ces collectivités demande une certaine organisation et induit un coût difficilement supportable s'il n'est pas anticipé.

Dans ce contexte, deux projets de protocole visant à étudier le taux d'abattement de bactériophages dans les boues **dans l'attente d'une méthode normalisée du suivi du SARS-CoV-2 ont été adressés à l'Anses par le ministère de la transition écologique le 15 mai 2020 (saisine 2020-SA-0068)**. La note de l'Anses relative à cette saisine avait pour objet de porter à connaissance des commentaires et recommandations sur ces deux protocoles (étude du taux d'abattement de bactériophages dans les boues) visant à valider les indicateurs d'efficacité des traitements d'inactivation virale (Anses 2020e). Sur la base des commentaires et recommandations émis dans cette note d'appui technique, le rapport d'étude présentant les résultats de la mise en œuvre de ces deux protocoles est adressé à l'Anses dans le cadre de la présente saisine (cf. ANNEXE 3). De plus, dans cette même note, l'Agence préconisait, en juin 2020, « *en première intention de procéder pour les boues non hygiénisées, à la recherche de génome viral du SARS-CoV-2 directement dans ces boues* » en précisant que « *l'absence de génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues analysées, dans les conditions de contrôle qualité adaptées, est synonyme d'absence de SARS-CoV-2 infectieux* ». Les modalités opérationnelles à respecter et à suivre pour la réalisation de ces analyses RT-PCR mériteraient d'être confirmées, et le cas échéant complétées, afin que les résultats obtenus soient suffisamment robustes, pour autoriser, en toute sécurité, l'épandage des boues sans hygiénisation préalable.

Par ailleurs, considérant que les dates d'entrée en zone d'exposition à risques pour la COVID-19 ont été définies pour chaque département sur la base du taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 publié chaque semaine par Santé Publique France (SPF), la question de l'utilisation de cet indicateur pour évaluer la situation épidémique d'un département et déterminer si l'épandage des boues est possible ou non se pose, tout comme celle de l'applicabilité de cet indicateur.

L'ensemble de ces éléments a conduit la Direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale de l'alimentation, à élaborer un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 (ANNEXE 4) afin de faire évoluer le cadre réglementaire relatif à l'épandage des boues urbaines pendant la crise sanitaire.

Dans ce contexte, l'Anses est sollicitée pour donner son avis sur le projet d'arrêté transmis, et particulièrement sur les éléments suivants :

■ **Question 1**

La pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 d'un département pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une STEU de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants envisagé.

■ **Question 2**

De préciser les modalités d'échantillonnage et d'analyse du génome du SARS-CoV-2 prévues au 3° de l'article 1 du projet d'arrêté proposé.

■ **Question 3**

La possibilité, sur la base du rapport présentant les résultats de l'abattement des bactériophages dans les boues de STEU, d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) dès lors qu'elles ont fait l'objet d'un des traitements suivants, dans les conditions qui ont permis de montrer un taux d'abattement suffisant des bactériophages, à savoir :

- les boues ayant fait l'objet d'un chaulage avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30 % équivalent CaO/MS, puis d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois ;
- les boues ayant fait l'objet d'un séchage solaire avec plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80 %.

La possibilité d'épandre des lots de boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) à l'issue d'une analyse par lot confirmant un taux abatement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log, dès lors qu'ils ont fait l'objet d'un des traitements suivants :

- un séchage sur lit, puis un stockage d'une durée minimale de 1,5 mois ;
- une digestion anaérobie mésophile, puis un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

■ **Question 4**

De formuler des recommandations concernant l'utilisation de la RT-PCR :

- la ou les fréquences minimales d'analyse du génome du SARS-CoV-2 qu'il conviendrait de faire figurer dans le futur arrêté ;
- la méthode de préparation des échantillons, la prise d'essai, la méthode d'extraction du virus de la matrice boue ainsi que la méthode d'extraction des acides nucléiques qu'il conviendrait de préciser dans le protocole d'échantillonnage et d'analyse du génome du SARS-CoV-2 ;
- la matrice pour laquelle l'accréditation sur la méthode RT-PCR est requise.

Le présent avis vient en réponse aux questions 1 et 3. Les questions 2 et 4 ont fait l'objet d'un rapport d'appui scientifique et technique des laboratoires dédiés du Pôle Recherche et Référence de l'Anses (Laboratoire d'Hydrologie de Nancy) (Anses 2021) (cf. Annexe 5).

Cet avis complète les produits d'expertise de l'Anses précédemment émis (Anses 2020c, 2020b, 2020g, 2020e, 2020f).

2. ORGANISATION DE L'EXPERTISE

L'expertise a été réalisée dans le respect de la norme NF X 50-110 « Qualité en expertise - Prescriptions générales de compétence pour une expertise (Mai 2003) ».

L'expertise a été coordonnée par la Direction d'évaluation des produits réglementés (DEPR) en collaboration avec la Direction de l'évaluation des risques de l'Anses (DER).

L'expertise relève du domaine de compétences des comités d'experts spécialisés (CES) « Matières fertilisantes et supports de culture (MFSC) » (CES pilote) et du CES « Eaux ». L'Anses a confié l'expertise de la question 3 à plusieurs experts rapporteurs. Ces experts rapporteurs et l'Anses se sont réunis par visioconférence le 9 décembre 2020 et le 18 janvier 2021 et ont échangé par voie électronique. Sur la base de ces échanges, un projet d'avis a été rédigé. Les travaux ont été présentés aux CES « Eaux » et CES MFSC tant sur les aspects méthodologiques que scientifiques, respectivement les 2 et 4 février 2021. Ils ont été adoptés par le CES « MFSC » réuni le 4 février 2021.

L'expertise s'est appuyée sur :

- la littérature scientifique (accessible dans les conditions d'une expertise en urgence et dans l'état des connaissances au 31 décembre 2020, sans viser une recherche bibliographique exhaustive) ;
- le rapport d'étude transmis avec la saisine de suivi d'abatement des bactériophages dans les boues de STEU, du laboratoire national de métrologie et d'essais (LNE) réalisé en collaboration avec l'Université de Lorraine/CNRS, la FNCCR¹ et la FP2E² (LNE 2020) (cf. Annexe 3) ;
- Les éléments complémentaires demandés au Ministère de la transition écologique à savoir : la description de la file eau des stations ayant participées à l'étude, la conformité en équipement et en performance des stations sur l'année 2019, la quantité de matière sèche de boues produites par les stations sur l'année 2019, la commune d'implantation de la station et son code INSEE.

L'Anses a analysé les liens d'intérêts déclarés par les experts avant leur nomination et tout au long des travaux, afin d'éviter les risques de conflits d'intérêts au regard des points traités dans le cadre de l'expertise.

Les déclarations d'intérêts des experts sont publiées sur le site internet de l'Anses (<https://dpi.sante.gouv.fr>).

3. ANALYSE ET CONCLUSIONS

QUESTION 1 :

3.1. Taux d'incidence hebdomadaire de l'épidémie de COVID-19 et épandage

En ce qui concerne la pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 d'un département publié chaque semaine par Santé publique France pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une STEU de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants, l'Anses considère que l'utilisation de cet indicateur pour estimer l'absence de virus dans les boues des STEU présentes sur ce département, pendant la période de production des boues, présente trop d'incertitudes.

Le taux d'incidence correspond au nombre de tests positifs pour 100 000 habitants sur 7 jours glissants. Il existe plusieurs sources d'incertitude, notamment une incertitude temporelle :

¹ Fédération nationale des collectivités concédantes et régies.

² Fédération Professionnelle des Entreprises de l'Eau.

d'une part le SARS-Cov-2 peut être détecté très précocement dans les eaux usées générant des boues bien avant les indicateurs épidémiologiques et d'autre part le taux d'incidence hebdomadaire étant une moyenne, il ne représente que partiellement l'évolution possible rapide de l'épidémie.

Il existe également une incertitude de nature spatiale, relative aux difficultés dans certaines situations, à établir une correspondance entre l'incidence hebdomadaire d'un département, qui représente une valeur moyenne sur le département, et des contaminations potentiellement différentes entre des stations de traitement des eaux situées en différents lieux dans ce département.

QUESTION 3 :

3.2. Actualisation des connaissances en lien avec la question 3

Les analyses bibliographiques faites dans le cadre des précédents avis de l'Anses (Anses 2020c, 2020b, 2020g, 2020e, 2020f) ont été actualisées pour les deux thématiques suivantes :

- devenir du SARS-CoV-2 depuis la contamination des EU jusqu'au traitement des boues, en accordant une attention particulière au suivi de son caractère éventuellement infectieux dans le réseau d'assainissement des EU (boues des STEU en particulier) ;
- effet des différentes techniques d'hygiénisation des boues sur la présence du virus et son caractère infectieux.

La recherche bibliographique couvre la période du 1^{er} juillet au 31 décembre 2020.

Si de nombreuses revues bibliographiques ont été publiées dans ce domaine, peu d'études nouvelles ont été conduites sur le devenir du SARS-CoV-2 dans les stations d'épuration des EU depuis début juillet 2020. La plupart ont pour finalité la surveillance épidémiologique du SARS-CoV-2 et/ou l'optimisation des solutions de traitements des EU. Trois seulement fournissent des estimations de la présence du virus dans les boues (Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad et Buitrón 2020; P. M. D'Aoust *et al.* 2020; Kocamemi *et al.* 2020) sans toutefois s'intéresser à l'efficacité des procédés d'hygiénisation. Toutes ces études s'appuient sur des données de quantification de la présence de génome du virus (RT-qPCR ou RT-ddPCR). Au vu de la revue de la littérature scientifique, il semble qu'uniquement Westhaus *et al.* (2021) aient estimé la survie des particules infectieuses de SARS-CoV-2 (persistance du caractère infectieux) dans les filières de traitement des EU.

► Devenir du SARS-CoV-2 dans les STEU

Compte tenu de la diversité possible des filières de traitement des EU, le nombre restreint des études scientifiques ne permet pas de dégager des conclusions univoques.

L'efficacité partielle de plusieurs étapes de traitement vis-à-vis de l'élimination de la présence du génome de SARS-CoV-2 dans les EU a été rapportée par plusieurs auteurs :

- traitement secondaire : absence de détection dans les EU après traitement par boues activées (Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad et Buitrón 2020; Sherchan *et al.* 2020) d'EU contaminées par le virus (1,62 à 5,17 ×10³ copies de génome/L) ; réduction de plus d'un log des concentrations en génome de SARS-CoV-2 détectées dans les EU

brutes ($1,8$ à $3,5 \times 10^3$ copies de génome/L), après traitement anaérobie puis aération en comparaison des eaux brutes (Kumar *et al.* 2021) ;

- traitement tertiaire : absence de détection après traitement par biofiltre / boues activées puis chloration (Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad et Buitrón 2020); Westhaus *et al.* (2021) annonce également une réduction en concentration de génome après ozonation mais sans l'étayer par des données ;
- Bardi et Oliaee (2021) montrent par ailleurs l'élimination en conditions de laboratoire (digesteur) de génomes présents dans des urines collectées en hôpital (52×10^6 copies de génome/L) et inoculés dans des boues prélevées en STEU soumises à une digestion en condition anaérobie mésophile (présence du virus indétectable après 45 heures).

Si les conclusions de l'ensemble de ces études s'avèrent finalement proches de celles précédemment publiées (Randazzo *et al.* 2020; S. G. Rimoldi, Stefani, Gigantiello, Polesello, Comandatore, Mileto, Maresca, Longobardi, Mancon, Romeri, Pagani, Moja, *et al.* 2020; Wurtzer, Marechal, *et al.* 2020), d'autres auteurs ont rapporté des observations divergentes, voire contradictoires :

- Haramoto *et al.* (2020) notent la présence du génome de SARS-CoV-2 dans les EU ayant subi un traitement secondaire ($2,4 \times 10^3$ copies de génome/L) alors que le génome n'est pas détecté dans les EU brutes. Les auteurs attribuent ces résultats inattendus à des différences de préparation entre des échantillons d'EU brutes et d'EU traitées. Ils pourraient aussi s'expliquer par le rôle protecteur joué par les matières en suspension dans les EU pour les virus, évoqué par plusieurs auteurs (Kweiyor Tetteh *et al.* 2020; Tran *et al.* 2021).
- Zhang *et al.* (2020) font un constat similaire en mesurant des concentrations de l'ordre de 10^3 - 10^4 copies de génome/L dans une fosse septique, d'un hôpital temporaire du Wuhan et à sa sortie, bien qu'aucune détection du virus n'ait été faite dans les EU alimentant la fosse.
- Les travaux de Westhaus *et al.* (2021) vont dans le même sens : faisant état d'une efficacité médiocre d'élimination du virus par un traitement conventionnel par boues activées, ils soulignent l'importance de considérer les particules en suspension dans l'analyse des EU brutes. Ils montrent qu'avant traitement des EU, le virus est effectivement principalement associé à la phase solide (25 copies de génome/mL contre 1,8 copie de génome/mL en phase liquide) tandis qu'il se distribue plus équitablement entre les deux fractions dans les EU traitées (13 copies de génome/mL pour la phase solide et 8,8 copies de génome/mL pour la phase liquide). Bien connue dans le cas des virus enveloppés, cette association résulte probablement de l'adsorption de l'enveloppe virale de nature hydrophobe du SARS-CoV-2 sur les particules chargées négativement (matières organiques en particulier) des EU, (Kumar *et al.* 2020; Tran *et al.* 2021).

► **La présence du génome viral de SARS-CoV-2 dans les eaux usées et les boues**

Les résultats relatifs à la présence du génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues présentent, quant à eux, un tableau plus homogène. Confirmant les travaux de Balboa *et al.* (2020) et de J. Peccia, Zulli, Brackney, Grubaugh, Kaplan, Casanovas-Massana, Ko, Malik, Wang, Wang, Warren, Weinberger et Omer (2020), les trois nouvelles études identifiées à ce sujet font état de détections fréquentes de génome dans les boues :

- 79,2 % à 92,7 % des échantillons (n=24) de boues primaires prélevées dans deux STEU canadiennes et avec des concentrations $1,7 \times 10^3$ à $3,8 \times 10^5$ copies de génome/L³ (P. M. D'Aoust *et al.* 2020) ;
- 45 % des échantillons de boues activées (n=22) prélevées dans deux STEU de Mexico (Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad et Buitrón 2020) ;
- à des concentrations significatives ($1,17 - 4,02 \times 10^4$ copies de génome/L dans les boues primaires ou secondaires (boues activées) d'une STEU d'Istanbul (Kocamemi *et al.* 2020) ;

Ainsi, loin d'être contradictoire, l'ensemble de ces résultats illustre le probable transfert du génome viral de SARS-CoV-2 des EU vers les boues au cours du traitement des EU (Carrillo-Reyes, Barragán-Trinidad et Buitrón 2020; Kumar *et al.* 2020; Kweinor Tetteh *et al.* 2020; Tran *et al.* 2021). La répartition du virus entre les phases solide et liquide et les différences de choix méthodologiques entre études en matière d'échantillonnage et de préparation des échantillons pourraient expliquer, au moins en partie, les apparentes divergences évoquées précédemment au sujet de l'efficacité des procédés de traitement mis en œuvre. Ce phénomène de transfert nous indique que la mesure de l'efficacité des solutions de traitements des EU (appréciée à l'aune des quantités de génome viral présent dans les effluents liquides) n'est d'aucune aide pour apprécier le devenir du génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues. Il ne nous dit rien non plus sur le risque sanitaire associé à ces boues puisque l'ensemble des informations présentées ci-dessus ne porte que sur la présence de matériel génétique sans précision sur le caractère infectieux du virus. Comme cela a été montré pour d'autres virus enveloppés (Kumar *et al.* 2020; Y. Ye *et al.* 2016a), cette possible adsorption du SARS-CoV-2 sur les constituants solides des boues pourrait permettre une meilleure protection des particules virales en les soustrayant de l'effet des produits détergents et antiseptiques présents dans l'eau (Kweinor Tetteh *et al.* 2020), expliquant ainsi les résultats de Zhang *et al.* (2020) évoqués plus haut.

► **Persistance du caractère infectieux du SARS-CoV-2 depuis l'excrétion fécale jusqu'aux boues produites par les STEU**

De nombreuses études font état de la présence dans les selles du génome du SARS-CoV-2 sans toutefois mettre systématiquement en évidence la présence de particules infectieuses (Wölfel *et al.* 2020; F. Xiao, Sun, *et al.* 2020; Zang *et al.* 2020; Zheng *et al.* 2020). Dans leur revue bibliographique, Cevik *et al.* (2021) soulignent que, malgré des durées d'excrétion en ARN potentiellement relativement longues (17,2 jours en moyenne avec un maximum à 35 jours), aucune étude n'a détecté dans les selles la présence de particules infectieuses plus de 9 jours après le début des symptômes, même si d'importantes charges virales (10^6 à 10^8 copies de génome/g) étaient observées. Ils en concluent que les quantifications de la présence du génome (ARN) du SARS-CoV-2 dans les selles ne devraient pas être utilisées pour évaluer les risques infectieux liés aux boues.

L'unique article retrouvé quant à l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans les EU ne montre pas de présence de particules virales infectieuses dans les EU malgré la présence d'ARN viral (Westhaus *et al.* (2021)). Ce constat est en accord avec les observations faites par S. G. Rimoldi, Stefani, Gigantiello, Polesello, Comandatore, Mileto, Maresca, Longobardi, Mancon,

³ Il n'est pas clairement indiqué dans la publication à quel volume se rapporte l'unité de ces résultats. La description « Matériels et Méthodes » laisse penser qu'il s'agit du volume de boue prélevée dans les installations.

Romeri, Pagani, Moja, *et al.* (2020) sur le caractère infectieux du SARS-CoV-2 dans des EU de STEU de la région de Milan. Compte tenu de la complexité méthodologique nécessaire à l'extraction des virus des boues, leur mise en culture et la caractérisation de leur virulence, ces résultats ne permettent toutefois pas de conclure ni à l'absence ni à la présence de risque infectieux associé aux boues.

Les études *in vitro* mettent en évidence une persistance des particules virales infectieuses inoculées dans des EU, de l'ordre de quelques jours (présence détectable jusqu'à 7 jours à partir d'une concentration initiale de 10^5 TCID₅₀⁴ / mL à 20 °C dans l'étude de Bivins *et al.* (2020); diminution après 24 h d'incubation d'un log des TCID₅₀/mL à 4°C et d'un à trois log à 20 °C dans l'étude de Wurtzer, Waldman, *et al.* (2020)). Ces derniers distinguent trois types de mesures pour quantifier le virus présent dans les EU : une quantification totale de l'ARN (RT-qPCR classique), une quantification de l'ARN dit « protégé » et une quantification des particules infectieuses. Ils montrent ainsi que, dans des prélèvements effectués en avril 2020 dans les EU de l'agglomération parisienne, la majorité des quantités de génomes mesurées par RT-qPCR n'est plus sous forme intègre (80 % en moyenne), mais que cette proportion diminue avec la charge virale. Ils montrent par ailleurs que l'ARN total ou protégé se révèle relativement stable sur une durée de 7 jours à 4 °C. Ces résultats confirment ceux de Bivins *et al.* (2020) soulignant la plus grande stabilité de l'ARN total par rapport à la fraction infectieuse. Les quantifications du virus par RT-qPCR constituent ainsi un bon outil de suivi de la présence du virus dans les EU et les boues mais elles donnent en même temps une surestimation probable de l'importance du matériel infectieux dans ces matrices.

► Efficacité des procédés d'hygiénisation des boues

Aucune étude n'a été conduite sur l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues vis-à-vis du SARS-CoV-2. Toutefois, quelques enseignements peuvent être tirés des études de laboratoire sur les boues et /ou les EU :

- Bardi et Oliaee (2021) montrent l'efficacité d'un procédé de traitement par digestion en condition anaérobie mésophile qui permet, en moins de 2 jours, une non détection de l'ARN du virus dans des boues prélevées en STEU ;
- Ahmed, Bertsch, Bibby, *et al.* (2020), Bivins *et al.* (2020) et Wurtzer, Waldman, *et al.* (2020) soulignent l'influence significative de la température sur la perte d'intégrité de l'ARN et/ou du caractère infectieux du SARS-CoV-2 dans les boues et/ou EU.

3.3. Analyse du rapport d'étude transmis avec la saisine relative à l'abattement des bactériophages dans les boues de STEU en lien avec la question 3

Le rapport soumis en appui de cette saisine LNE (2020), présente deux études :

- La première étude vise à définir les cinétiques d'inactivation de deux types de bactériophages, les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques, dans des boues activées en aération prolongée (liquides) issues de la STEU de Reims, en conditions de laboratoire contrôlées. Le suivi est mené à deux températures : 5 °C et 22 °C pendant 96 jours, le suivi à 35°C (température observée notamment en méthanisation mésophile n'ayant pu être réalisé en raison de contraintes techniques). Cette étude vise selon le rapport à définir des conditions de stockage qui pourraient permettre d'obtenir 4 unités logarithmiques d'abattement (soit 99,99 % d'abattement).

⁴ Nombre de virus infectant 50% des cellules en culture par mL

- La deuxième étude présentée a été réalisée en conditions réelles (*in situ*) afin d'évaluer le taux d'abattement des deux mêmes types de bactériophages (coliphages somatiques et bactériophages ARN F-spécifiques) après stockage des boues brutes pour une sélection de STEU utilisant des procédés de traitement des boues différents (stockage non aéré de boues liquides, chaulage (filtre presse ou post-chaulage), filtres plantés de roseaux, séchage sous serre, lits de séchage, digestion anaérobie mésophile).

► **Rappel préliminaire (Avis saisine 2020-SA-0069)**

Il convient de souligner que l'avis de l'Anses (2020f) du 19 juin 2020 portant sur le projet de protocoles d'études intervient postérieurement à l'initiation et au lancement des études.

Dans cet avis, l'Anses :

- confirmait que, « pour les boues n'ayant pas subi de traitements hygiénisants (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998), les protocoles décrits présentent un intérêt pour valider des indicateurs d'efficacité de traitement d'inactivation virale au titre de l'acquisition des connaissances. » ;
- soulignait que « le lien spécifique entre la cinétique d'abattement des phages ARN F-spécifiques et des phages somatiques utilisés comme indicateurs et la disparition des coronavirus SARS-CoV-2, reste à démontrer et qu'en l'absence de comparaison avec SARS-CoV-2, les conclusions resteront difficiles à généraliser » ;
- précisait également que « d'autres approches, plus directes, comme la démonstration de l'absence du génome viral du SARS-CoV-2 dans les boues non hygiénisées pourraient permettre de s'assurer de l'absence de SARS-CoV-2 infectieux dans ces dernières »

3.3.1. Validation du protocole d'analyses des bactériophages (coliphages somatiques et bactériophages ARN F-spécifiques)

Il y a classiquement trois groupes de bactériophages proposés comme indicateurs et utilisés comme modèles de virus pathogènes dans les études d'inactivation : coliphages somatiques, bactériophages ARN F-spécifiques et bactériophages de *Bacteroides fragilis*. Deux groupes ont été retenus dans l'étude menée par le LNE (2020).

L'analyse suit les normes NF EN ISO 10 705-1⁵ et NF EN ISO 10705-2⁶. Toutefois le paragraphe « Matériels et Méthodes » aurait mérité plus de précisions.

Les experts estiment que l'étude cinétique aurait gagné en pertinence si, en complément de la STEU de Reims (station d'une grande capacité, boues activées faible charge), des petites stations (< 200 EH) avaient été intégrées dans cette première étude. En effet, ces petites STEU se heurtent à la même problématique mais avec peu de moyens d'y remédier. Toutefois, ce choix logistique (notamment le volume des échantillons et la proximité avec le laboratoire d'analyse) est compréhensible au vu des délais de réalisation.

Le protocole d'élution aurait mérité d'être plus détaillé, notamment par rapport à la composition du tampon utilisé. Les calculs des rendements de récupération des bactériophages dans les boues et les incertitudes de mesures ne sont pas explicités, mais globalement les auteurs

⁵ AFNOR. 2001. NF EN ISO 10705-1. Octobre 2001 T90-440-1 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 1 : dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.

⁶ AFNOR. 2001. NF EN ISO 10705-2 Octobre 2001. T90-440-2. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2 : dénombrement des coliphages somatiques

semblent suivre les procédures de validation de la norme ISO 10705-3⁷. Il est à noter l'utilisation de duplicats. Les résultats des contrôles positifs et négatifs ne sont pas fournis.

Les deux conditions de température testées semblent raisonnables vis-à-vis de la connaissance des petites STEU et assez proches des conditions testées dans la littérature. En effet, des études d'inactivation du SARS-CoV-2 à 4 et 23°C dans les EU sont rapportées (Bhowmick *et al.* 2020). Par contre, il est dommage de ne pas avoir testée la température de mise en œuvre décrite au paragraphe 4.3.3 du rapport du LNE (2020) (qui serait généralement de « 35 °C »).

Le protocole n'est pas totalement clair quant aux réplifications, mais il ressort à la lecture du rapport qu'il s'agit de pseudo-réplication (avec à chaque pas de temps 1 flacon, 3 prises d'essai par flacon et 3 réplicats techniques, sauf à J0 avec 3 flacons soit 9 prises d'essai). Même s'il ne permet pas *a priori* la réalisation d'analyses statistiques, il est conforme aux lignes directrices établies par AQUAREF (laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques) pour conduire et valider des études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau (Lardy-Fontan et Lalere 2017). Un calcul des T₉₀ aurait été pertinent et aurait permis une meilleure comparaison aux résultats de la littérature.

3.3.2. Validation de l'utilisation des bactériophages ARN-F et des coliphages somatiques comme indicateurs indirects d'efficacité d'abattement du SARS-CoV-2 dans les boues

3.3.2.1. Cinétiques d'élimination des bactériophages (1^{ère} étude)

► Cinétiques d'inactivation des bactériophages

La première partie du rapport vise à définir les cinétiques d'inactivation de deux types de bactériophages nus (coliphages somatiques et bactériophages ARN F-spécifiques) dans les boues liquides non traitées en conditions de laboratoire contrôlées. Le suivi est mené à deux températures : 5 °C et 22 °C pendant 96 jours.

Les résultats de l'étude menée par LNE (2020), montrent que les deux types de bactériophages ont une persistance différente vis-à-vis de la température. Les coliphages somatiques semblent résister plus longtemps au stockage à 22 °C (aucune inactivation totale observée pour les coliphages somatiques sur la durée de l'étude de 96 jours) que les bactériophages ARN F-spécifiques pour lesquels une inactivation totale (inférieure à la limite de quantification LQ) est observée au bout de 42 jours. Les observations à 5 °C ne montrent pas de décroissance notable dans les 96 jours quel que soit le type de bactériophages. Ceci est en accord avec la littérature : les micro-organismes ont des taux de décroissance plus élevés au-dessus de 20 °C et plus faibles à des températures < 15°C (Bertrand *et al.* 2012; Korajkic *et al.* 2019; Muirhead *et al.* 2020). De plus, les coliphages somatiques sont en général plus résistants aux traitements thermiques que les bactériophages ARN F-spécifiques (Mocé-Llivina *et al.* 2003) et persistent plus longtemps à faible température (Lee et Sobsey 2011; Sokolova *et al.* 2012).

► Bactériophages et SARS-CoV-2

⁷ AFNOR. 2003. ISO 10705-3:2003 Octobre 2003. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau.

À ce jour, aucune donnée expérimentale ne permet de démontrer que le comportement des bactériophages lors du stockage ou lors des traitements hygiénisants des boues est représentatif du comportement du SARS-CoV-2.

Il n'a pas été retrouvé dans la littérature d'études comparant directement la persistance du SARS-CoV-2 ou d'autres coronavirus dans les boues de STEU à celle des coliphages somatiques et/ou des bactériophages ARN F-spécifiques

Ainsi, l'approche retenue a été :

- de comparer les données de l'étude cinétique du LNE (2020) pour les bactériophages étudiés (coliphages somatiques et bactériophages ARN-F spécifiques) aux données disponibles dans la littérature pour le SARS-CoV-2, mais également pour d'autres virus ou phages pouvant être considérés comme modèles du SARS-CoV-2 (tout en prenant en compte leurs similitudes et leurs différences par rapport au SARS-CoV-2) : virus nus et enveloppés (dont virus pathogènes entériques et coronavirus) et autres bactériophages (phage T3 (*Podovirus*, coliphage somatique), phage $\Phi 6$ (*Cystovirus*, phage enveloppé)) et coronavirus animaux MHV, TGEV et FIVP ;
- dans les matrices eaux (EU, les eaux destinées à la consommation humaine (EDCH), les eaux récréatives et les eaux de surface) et non dans les boues ; toutefois, il faut noter qu'une comparaison basée sur le stockage et le traitement des EU ou des EDCH n'est pas nécessairement représentative du stockage et du traitement des boues qui constituent une matrice plus complexe.

Depuis le début de cette crise sanitaire, des études ont été menées sur la persistance du SARS-CoV-2 dans les EU, les eaux de surface et les EDCH en utilisant des outils de culture cellulaire et de biologie moléculaire (Ahmed, Bertsch, Bibby, *et al.* 2020; Bivins *et al.* 2020)

Dans les paragraphes suivants, les valeurs de contamination observées dans les différentes publications sont données à titre indicatif, comme ordre de grandeur de quantification des virus habituellement retrouvés dans les EU ; elles sont bien évidemment dépendantes des conditions locales (environnement, traitement, etc.).

Une méta-analyse a montré que les taux de décroissance des coronavirus humains (SARS-CoV-1 et HCoV) et animaux (virus de l'hépatite murine (MHV), virus de la gastro-entérite transmissible (TGEV), virus de la péritonite infectieuse féline (FIPV) dans les eaux (solution aqueuse tampon, eau distillée, EDCH, EU, eaux de surface) sont du même ordre de grandeur que ceux du bactériophage $\Phi 6$ et de virus non enveloppés (entérovirus, rotavirus, norovirus, virus hépatite A, adénovirus, astrovirus, coliphages F-spécifiques et somatiques) (Silverman et Boehm 2020). Bivins *et al.* (2020) rapportent un T_{90} (temps nécessaire pour atteindre un 1 log d'abattement) moyen de 2,1 jours pour les particules infectieuses de SARS-CoV-2 en faible concentration initiale (10^3 /mL) dans des EU placées à température ambiante et en moyenne 1,6 jour pour une forte concentration initiale (10^5 /mL). Ils ont également estimé un T_{90} moyen de l'ARN du SARS-CoV-2 compris entre 28 et 8 jours dans des EU pour des températures allant de 4 à 37 °C. Le coronavirus SARS-CoV-1 suivi par culture peut persister 14 jours dans les EU à 4 °C et 2 jours à 20 °C et son génome (ARN) peut être détecté encore pendant 8 jours alors que le virus est inactivé (Wang *et al.* 2005).

Un travail d'analyse bibliographique pour comparer SARS-CoV-2, des virus nus et enveloppés dont des phages est disponible dans les précédents avis de l'Anses (Anses 2020c, 2020g). Des revues de la littérature sont disponibles sur la comparaison de la persistance respective des virus nus et enveloppés dans différents milieux incluant les EU et les eaux de surface

(Boehm *et al.* 2019; Wigginton, Ye et Ellenberg 2015; Y. Ye *et al.* 2016a). Elles montrent que les virus entériques sont plus résistants au stockage en dessous de 50 °C que les coronavirus (Anses 2020c). Au vu de ces travaux bibliographiques et particulièrement de la figure 3 de l'avis Anses (2020 c) comparant l'inactivation de virus nus, de virus enveloppés et des coliphages somatiques en fonction de la température, les experts estiment que les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques persistent sur une durée comparable aux virus entériques et le plus souvent sur une durée plus longue que celles rapportées pour les coronavirus (virus enveloppés).

Ye *et al.* (2016) montrent que des phages nus (MS2 et T3) présentent une meilleure survie dans les EU que des bactériophages enveloppés (MHV et Φ6). Silverman et Boehm (2020) indiquent que le taux de décroissance du bactériophage Φ6 est très proche de celui des coronavirus dans les eaux, mais n'ont pu conclure sur la pertinence de considérer Φ6 comme indicateur de traitement des eaux (traitements considérés : chloration et rayonnement UV). Il n'est donc pas un meilleur indicateur d'efficacité de traitement que les coliphages somatiques ou les bactériophages à ARN F-spécifiques, dans ce cas précis.

Les bactériophages peuvent être détectés dans l'eau par des méthodes normalisées, relativement rapides et peu coûteuses (NF EN ISO 10 705-1 et NF EN ISO 10705-2). Leur utilisation comme indicateurs de la présence de virus entériques pathogènes humains dans les eaux (eaux de surface, eaux souterraines, eaux de mer et eaux usées) a donné lieu à une synthèse bibliographique (Jofre 2016). Il y apparaît que les corrélations possibles entre la présence et les abondances des deux types de bactériophages et de virus entériques humains dans l'eau donnent des résultats contrastés. Toutefois, Jofre (2016) estime que les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques sont de meilleurs indicateurs de la contamination virale d'origine fécale que les bactéries indicatrices fécales actuelles (i.e. entérocoques intestinaux et *Escherichia coli*) dans les eaux de l'environnement (eau de surface, eaux souterraines, eaux de mer) et les eaux usées. En revanche, Carducci, Arrighi et Ruschi (1995) indiquent que les coliphages somatiques ne sont pas nécessairement un bon indicateur des entérovirus dans les EU. Les preuves épidémiologiques montrent une corrélation entre les concentrations de bactériophages dans les eaux récréatives (eaux douces et eaux de mer) et l'excès de maladies pouvait être d'origine hydrique (gastro entériques, fièvre, nausées) (US-EPA. 2015).

Les données obtenues lors des études de cinétique menées par le LNE (2020) montrent une persistance plus forte des bactériophages étudiés comparée à celle observée dans les eaux rapportées pour les virus et phages listés ci-dessus et notamment SARS-CoV-1 et SARS-CoV-2.

La question sous-jacente à ces études est de savoir si le comportement des coliphages somatiques et/ou les bactériophages ARN F-spécifiques peut être représentatif de l'inactivation du SARS-CoV-2 suite à un traitement et/ou un stockage des boues.

► **Conclusions au regard de cette première étude et de la bibliographie disponible**

L'état actuel des connaissances n'apporte pas d'éléments faisant la démonstration du lien spécifique entre la cinétique d'abatement, dans les boues, des bactériophages (bactériophages ARN F spécifiques et coliphages somatiques) et la disparition du SARS-CoV-2.

L'état actuel des connaissances ne permet pas d'assurer que du SARS CoV2 infectieux puisse être retrouvé dans les selles dans les EU ou les boues traitées.

Néanmoins, les phages pourraient être considérés comme représentatifs d'un certain nombre de virus nus (notamment des entérovirus). Le SARS-CoV-2 est supposé être inactivé beaucoup plus rapidement que les virus entériques humains non enveloppés avec une transmission d'origine hydrique connue (WHO 2020a, 2020b). Les bactériophages peuvent donc être considérés comme des indicateurs indirects qui pourraient permettre d'estimer l'efficacité des traitements/stockage vis-à-vis de l'inactivation du SARS-CoV-2.

Ainsi, dans l'attente d'études capables d'apporter des éléments permettant de faire la démonstration du lien spécifique entre cinétique d'abattement des bactériophages et cinétique d'abattement du SARS-CoV-2 dans les boues, la mesure de l'abattement en bactériophages comme indicateurs indirects permettant d'estimer l'efficacité des filières de traitement/stockage vis-à-vis des virus, et notamment du SARS-CoV-2, constitue le déploiement d'une approche théorique de l'abattement considérée comme acceptable.

► Seuil d'abattement

Un abattement supérieur ou égal à 4 log en coliphages somatiques est proposé dans le projet d'arrêté, avant épandage des boues traitées (avec un séchage puis un stockage d'une durée minimale de 1,5 mois ou traitées avec une digestion anaérobie mésophile, puis un stockage d'une durée minimale de 4 mois). L'efficacité d'un traitement des eaux peut se mesurer par le taux d'abattement qu'il permet d'atteindre et une réduction de 4 log du titre viral est communément admise pour qualifier un traitement des eaux d'efficace (Afssa 2007; Santé_Canada. 2019). On définit ainsi une faible réduction quand le taux de réduction est inférieur à 2 log, une réduction moyenne entre 2 et 4 log, une réduction bonne à excellente quand le taux de réduction est supérieur à 4 log. Les processus d'inactivation virale sont le plus souvent validés lorsqu'un abattement logarithmique de 4 est atteint d'après le livre édité par l'Ademe en 1994 (Elissalde *et al.* 1994). Ce seuil de 4 log est un seuil réglementaire français (Arrêté du 2 août 2010⁸) pour l'abattement en bactériophages ARN F-spécifiques, en entérocoques intestinaux et en spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices avant réutilisation des eaux usées, mais seulement pour celles d'un niveau de qualité sanitaire A (seul niveau de qualité permettant une réutilisation des EU pour l'irrigation des cultures maraîchères, fruitières et légumières non transformées par un traitement thermique industriel adapté et pour l'irrigation des espaces verts et forêts ouverts au public (notamment golfs).

Il pourrait être ainsi considéré que les traitements/stockages permettant de conduire à un abattement supérieur ou égal à 4 log en bactériophages (coliphages somatiques et/ou bactériophages ARN F-spécifiques) dans les boues pourraient permettre de s'assurer qu'un abattement en SARS-CoV-2 suffisant (supérieur par rapport aux bactériophages) est également obtenu. Toutefois, aucune des conditions testées en laboratoire dans cette première étude cinétique du LNE (2020), ne permet d'obtenir un abattement de 4 log (soit 99,99 %).

⁸ Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. NOR : SASP1013629A. JORF n°0201 du 31 août 2010

3.3.3. Suivi du stockage des boues *in situ* (2^{ème} étude)

La deuxième étude présentée a été réalisée en conditions réelles (*in situ*). Elle propose de mesurer les teneurs en bactériophages (coliphages somatiques et bactériophages ARN F-spécifiques) entre des échantillons en amont et en aval d'un traitement/stockage et d'estimer ainsi un taux d'abattement. Cette étude a été menée sur une sélection de STEU utilisant des procédés de traitements de boues différents. Cette partie de l'étude a été sous-traitée au laboratoire Eurofins Expertise Microbiologie France concernant les analyses des bactériophages ARN F-spécifiques, des coliphages somatiques et de la matière sèche.

3.3.3.1. Choix et représentativité des stations d'épuration d'eaux usées

Seules des STEU situées en métropole ont été prises en considération dans le rapport du LNE (2020);

Par ailleurs, comme le montre la figure 1, les échantillons de STEU utilisés dans cette étude ne sont pas représentatifs du parc français en termes de capacité nominale de traitement. Les STEU de capacité nominale supérieure à 2 000 EH sont surreprésentées et les très petites STEU (< 200 EH) sont absentes de l'étude ce qui est regrettable car ces dernières sont également concernées par les objectifs du projet d'arrêté.

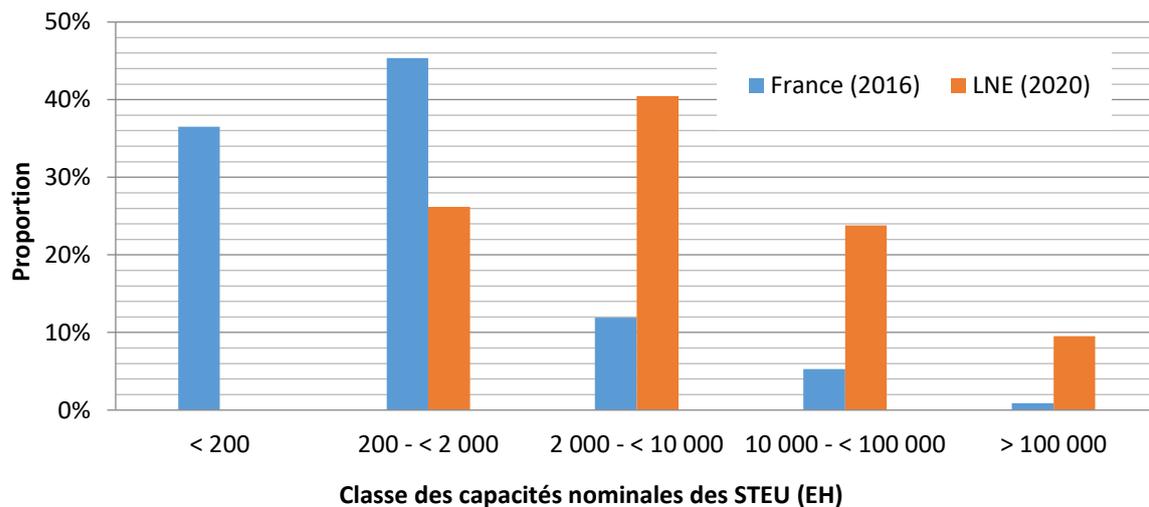


Figure 1. Répartition des STEU selon leur capacité nominale en France en 2016 (source site internet du Ministère chargé de l'écologie - base de données Roseau d'après site internet⁹) et dans l'échantillon de l'étude de LNE (2020)

Les prélèvements ont été réalisés par les exploitants des STEU, comme cela est prévu dans la réglementation (Arrêté du 8 janvier 1998). Néanmoins, même si la méthode employée semble permettre d'obtenir des échantillons représentatifs, il aurait été judicieux que les prélèvements soient réalisés selon les dispositions prévues par la norme

⁹ Page internet « L'environnement en France – Rapport sur l'état de l'environnement. L'assainissement collectif des eaux usées » (fiches thématiques mises à jour le 24 mai 2019. Consultée le 9 janvier 2021. <https://ree.developpement-durable.gouv.fr/themes/economie-verte/activites-de-l-economie-verte/traitement-des-eaux-usees/article/l-assainissement-collectif-des-eaux-usees>

NF EN ISO 5667-13¹⁰. Ceci est notamment important pour les lits plantés de roseaux (rhizocompostage). Pour cette filière de traitement/stockage, dont l'âge des boues doit être d'environ 4 ans avant extraction pour atteindre une bonne siccité et une bonne minéralisation (EPNAC 2011), la prise d'échantillon doit se faire par carottage avec un nombre de carottes proportionnel au volume de boues à vidanger. Ainsi, par exemple, les prélèvements sur un site n'ont pas respecté ces dispositions les temps de séjour n'étaient que de quelques mois (alimentation débutée en janvier 2020 et dernière alimentation faite le 12 juin, avec un prélèvement le 16 juin 2020). En toute rigueur, les résultats concernant cet échantillon ne devraient pas être pris en considération.

Le transport des échantillons a été assuré par le laboratoire Eurofins (conditionnement et température contrôlée pendant le transport). À la réception au laboratoire, un contrôle de la qualité des conditions de transport des échantillons a été réalisé.

Le nombre de filières de traitement/stockage des boues échantillonnées est compris entre 1 et 10 (cf. tableau 1).

Tableau 1. Filières de stockage et de traitement des boues suivis dans l'étude du LNE (2020) et nombre de STEU correspondant. Extrait de LNE (2020)

| Type de traitement et de stockage | Nombre de STEU |
|--|----------------|
| Stockage non aéré de boues liquides | 10 |
| Centrifugation et stockage en benne | 1 |
| Boues chaulées | |
| - Filtre presse | 5 |
| - Post chaulage | 4 |
| Lit de séchage | 3 |
| Filtre planté de roseaux (FPR) | |
| - Rhizofiltration | 3 |
| - Rhizocompostage | 6 |
| Serre solaire | 4 |
| Serre avec plancher chauffant | 3 |
| Digestion anaérobie mésophile | 3 |

De manière générale, les procédés de traitement et/ou stockage appliqués aux boues sont décrits, toutefois pas toujours de manière homogène (ex : pour la méthanisation le temps de séjour dans le digesteur n'est pas précisé de la même manière sur les 3 sites). Les critères de sélection des sites inclus dans l'étude sont précisés : il a été choisi d'être représentatif des diverses situations géographiques (localisation et nombre d'habitants) et des procédés de traitement existant sur le sol métropolitain. Mais les critères d'inclusion ne prennent pas en compte un nombre minimal souhaitable pour permettre une approche statistiquement acceptable (ex : un seul site pour la centrifugation et le stockage en benne). Ce point n'est que peu discuté dans le rapport. La recherche de représentativité n'est pas aisée et ce point ne remet pas en cause la validité des choix faits.

Enfin, les sites sont intégrés de manière volontaire dans l'échantillonnage des STEU et il n'est pas précisé si les renseignements fournis sur le fonctionnement de la file « Boues » sur la

¹⁰ AFNOR. 2011. NF EN ISO 5667-13 Juillet 2011. T90-511-13. Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 13 : lignes directrices pour l'échantillonnage de boues.

STEU étaient issus d'un questionnaire identique envoyé à toutes les STEU par les organisateurs de l'étude ; tel que prévu dans la version initiale du protocole d'étude du LNE utilisée pour l'expertise de l'Anses (2020e).

Afin de s'assurer de la rigueur et de la représentativité des résultats de l'étude, l'Anses a demandé des données complémentaires qui ont été fournies par le ministère en janvier 2021. Ces données concernent les différentes STEU (pour l'année 2019 : production de boues, conformités en équipement et en performance, commune d'implantation de la STEU et filière « Eau » de la STEU). A partir de ces données, il apparaît notamment que la production de boues de plusieurs STEU (STEU 1– 500 EH ; STEU 2– 4 000 EH ; STEU 3 – 5000 ; STEU 4 - 5 500 EH et STEU 5 – 41 000 EH) est relativement faible, soit 12 % de l'échantillon de STEU. En effet, de manière générale (DEB 2009), un EH produit annuellement entre 15 et 20 kg de matières sèches, soit 0,015 à 0,020 TMS/an/EH ; au vu des données fournies par le ministère, les STEU citées ci-dessus ont des productions comprises entre 0,001 et 0,005 TMS/an/EH. Vu les quantités de boues produites par les STEU sélectionnées dans l'étude, la représentativité au niveau national n'est pas assurée.

Ces différents éléments de méthode mettent globalement en avant la difficulté de la réalisation d'une telle étude dans un temps contraint autant pour le choix des STEU que pour la bonne application des méthodes de prélèvement des boues qui restent une matrice complexe.

Malgré l'impossibilité de fournir des conclusions statistiquement validées à partir des données disponibles, les résultats obtenus, adossés à ceux recensés dans la bibliographie, permettent d'établir plusieurs recommandations sur les différentes filières de traitements/stockages des boues suivies.

De manière générale et quel que soit le traitement appliqué aux boues de STEU, les abattements obtenus pour les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques sont très comparables. Il est ainsi considéré suffisant de n'utiliser *a minima* que les coliphages somatiques comme indicateurs indirects de l'efficacité de traitement des boues de STEU vis-à-vis du SARS-CoV-2, considérant une concentration plus importante dans les boues non traitées et une persistance légèrement supérieure vis-à-vis de l'inactivation thermique comparé aux bactériophages ARN F-spécifiques.

3.3.3.2. Taux d'abattement en bactériophages et efficacité relative

A noter que cette étude *in situ* les taux d'abattement mesurés pour les bactériophages ne sont pas de réels **taux d'abattement**, les analyses n'ayant pas été réalisées sur un même lot suivi dans le temps (analyse des boues non traitées (C₀) puis analyse de ces mêmes boues après traitement/stockage (C)).

Les mesures ont été réalisées sur deux lots différents. Un lot fraîchement produit avant traitement (C₀) et un autre lot ayant été traité/stocké (C). La comparaison ainsi effectuée dans le rapport ne peut donc être considérée comme un taux d'abattement au sens strict du terme mais plutôt comme une **efficacité relative** du traitement/stockage.

Ainsi, avec des systèmes à l'équilibre, des temps de séjour au moins égal au temps de réaction et des entrées relativement constantes, ce calcul d'efficacité relative permettant d'avoir des valeurs et de comparer des lots entre eux est utilisable pour estimer l'abattement. La valeur obtenue ne saurait valider l'efficacité réelle d'un procédé à l'encontre des coliphages mais pourrait, le temps de la pandémie, permettre une gestion des boues.

Il est ainsi considéré que ces deux méthodes de mesures (taux d'abattement et efficacité relative) peuvent permettre d'estimer le seuil d'abattement en bactériophages.

Toutefois, il est à noter que la mesure de l'efficacité relative n'est pas celle actuellement décrite dans le projet d'arrêté qui indique que pour chaque lot de boues épandu, le taux d'abattement en coliphages somatiques est calculé en comparant sur ce même lot la concentration en coliphages somatiques mesurée dans les boues brutes non traitées (C0) et celle mesurée dans les boues traitées après stockage (C). La mesure de l'efficacité relative mériterait d'être également prévue dans le projet d'arrêté.

3.3.3.3. Seuil d'abattement

Un abattement de 4 log (soit 99,99 %) en coliphages somatiques, est le seuil retenu dans le rapport du LNE (2020) pour valider l'efficacité du traitement/stockage considéré. Cet abattement considéré plutôt comme une efficacité relative est obtenu en comparant la concentration en coliphages somatiques dans des boues non traitées et dans des boues après traitement/stockage.

Dans le cas où la concentration initiale en coliphages somatiques dans les boues est inférieure à 10^4 UFP¹¹/g de matière brute :

- la vérification de l'absence de coliphages somatiques avant épandage (dans les limites de détection de la méthode) pourrait servir à valider la possibilité d'épandre la boue traitée/stockée ou ;
- une augmentation de la prise d'essai lors de l'étalement sur boîte ou lors de la dilution des boues pourrait permettre de mesurer l'efficacité relative.

La mesure des abattements doit être gérée pour chaque lot de boues. La notion de « lots de boues » mériterait d'être définie dans le projet d'arrêté. Les experts ont utilisé la définition suivante de la commission permanente des épandages (CPE) du bassin d'Artois Picardie (CPE-Artois-Picardie 2017) : « *Un lot représente une quantité de matières produites sur une période identifiée dans des conditions analogues. Il est caractérisé par une analyse représentative de la période de production. Son cheminement de la production à l'épandage sur une ou plusieurs parcelles agricoles est identifié. Un lot se définit de préférence par une analyse des paramètres agronomiques et des éléments traces métalliques. On veillera à ce que cette (ces) analyse(s) soi(en)t représentative(s) du lot produit sur une période donnée. Dans le cas des boues liquides, un lot sera nécessairement restreint à la capacité du stockage. Si le nombre de vidanges du silo excède le nombre d'analyses demandé réglementairement, des analyses complémentaires seront nécessaires à une bonne gestion par lot.* ».

3.3.3.4. Boues « chaulées » suivi d'un stockage

Avis sur la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) ayant fait l'objet d'un chaulage avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30 % équivalent CaO/MS puis d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois.

Dans cette étude, deux types de traitement ont été appliqués aux boues : un post-chaulage et un conditionnement à la chaux préalable à la déshydratation par filtre presse.

¹¹ Unité Formant Plage

En ce qui concerne le post-chaulage, le descriptif théorique donné dans le rapport du LNE (2020) est le suivant: « *le chaulage est basé sur le malaxage de la boue avec de la chaux vive (chaux issue directement de la calcination du calcaire), stockée dans un silo dont la capacité est généralement supérieure à 20 m³. Il se produit une réaction chimique exothermique (dégageant de la chaleur) permettant l'obtention d'un produit hygiénisé (pH > 12) et solide (siccité supérieure à 30 %)* ». Ce descriptif de traitement correspond bien à un traitement hygiénisant (pH > 12 et siccité > 30 %) (ADEME 1994). Dans 3 des 4 sites retenus pour ce traitement, les boues ont été traitées avec de la chaux vive (taux d'incorporation de 13 à 30 %). Dans le dernier site, les boues ont été traitées avec du lait de chaux (taux incorporation non précisé). Le stockage de ces boues traitées est de 3 mois environ. Le suivi du pH sur les sites n'est jamais précisé dans le document du LNE (2020).

En ce qui concerne les traitements préalables à une déshydratation par filtre-presse, la description faite dans le rapport du LNE (2020) précise que les boues sont préalablement égouttées avec ajout de différents réactifs (polymère, chlorure ferrique et lait de chaux), avant d'être pressées entre des plateaux dotés de toiles filtrantes, à une pression voisine de 15 bars. Toujours selon ce rapport, la boue ainsi produite est solide, stabilisée et riche en chaux. La siccité moyenne attendue est supérieure à 30 %. Sur les 5 sites retenus pour ce traitement, la description du type de chaux utilisé n'est pas toujours détaillée (lait de chaux (2 sites ; taux incorporation 37 à 45 %), chaux incorporée à 30 % (sans précision sur la nature de la chaux) pour 1 site, conditionnement minéral pour 1 site et aucune précision pour le dernier site). Les boues ainsi traitées sont stockées environ 3 mois à l'exception d'une boue stockée seulement 35 jours.

Seule la siccité des boues est mesurée et suivie. Les boues ainsi chaulées (post-chaulage ou conditionnement préalable à la déshydratation par filtre-presse), présentent des siccités globalement supérieures à 30 %.

Seuls 4 des 9 sites étudiés montrent un traitement des boues conforme à la proposition du projet d'arrêté soit un traitement à la chaux supérieure ou égale à 30 % équivalent CaO/MS, suivi d'une durée de stockage de 3 mois. Les quantités de chaux apportées sont parfois moindres et les durées de stockage ne sont pas toujours à 3 mois minimum. La description des procédés ainsi mis en œuvre est disparate et incomplète.

L'analyse des données soumises dans le rapport du LNE (2020) montre un abattement supérieur à 4 log pour les coliphages somatiques et supérieur à 3 log pour les bactériophages ARN F-spécifiques pour les deux traitements à la chaux considérés (post-chaulage et conditionnement préalable à un passage en filtre presse) pour l'ensemble des boues étudiées (bien que seulement 4 des 9 sites répondent aux exigences définies dans le projet d'arrêté : taux minimum d'incorporation de chaux et durée minimale de stockage).

A noter qu'environ 1 log d'écart dans les concentrations initiales en coliphages somatiques (6,5 - 7,5 log UFP/g MS) et les bactériophages ARN F-spécifiques (4-6 log UFP/g MS) avant traitement est observé. L'analyse détaillée des données du rapport du LNE (2020) montre qu'il y a une efficacité relative moyenne d'abattement, similaire pour les deux types de bactériophages.

En conséquence, considérant les abattements observés, les boues, ayant fait l'objet d'un post-chaulage ou d'une incorporation de chaux préalablement à une déshydratation par filtre-presse avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30 % équivalent CaO/MS suivi d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois, pourraient être épandues. La représentativité des

STEU choisies, le nombre d'échantillons de boues analysées et la description des procédés sont considérés insuffisants pour établir une recommandation formelle et générale par rapport au traitement/stockage proposé. Ainsi, dans le cadre de l'annexe 2 du projet d'arrêté, pour chaque lot de boues, il conviendra de s'assurer qu'un abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log est bien obtenu avant tout épandage de ces lots de boues.

Un suivi des conditions d'exploitation est recommandé (suivi du taux d'incorporation en chaux dans les boues, de la siccité des boues et de la durée de stockage avant épandage).

A noter que tous les traitements à la chaux ne peuvent être considérés comme hygiénisants. L'hygiénisation suite à un chaulage est effectivement dépendante du type de chaux utilisée (vive ou éteinte), du pH atteint (pH > 12), de la durée de maintien de ce pH et également de la montée en température observée après chaulage. Ainsi, les données présentées dans le rapport du LNE (2020) ne permettent pas de s'assurer du caractère hygiénisant, mais seulement d'apprécier les abattements en bactériophages pour les traitements considérés.

3.3.3.5. Séchage solaire sous serre (simple ou avec plancher chauffant)

Avis sur la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) et ayant fait l'objet d'un séchage solaire avec plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80 %.

Dans ce procédé, l'énergie solaire captée au niveau de serres est utilisée pour évaporer l'eau des boues placées en couche mince sur le sol (séchage solaire simple) ou sur un plancher chauffant alimenté par une pompe à chaleur. La serre est équipée de ventilateurs/extracteurs permettant un renouvellement de l'air et l'évacuation de l'humidité. Selon le rapport du LNE (2020), la siccité des boues ainsi stockées dépasse les 70 %.

En ce qui concerne le séchage en serre solaire « simple », 4 sites ont été étudiés. Selon les sites, les boues sont restées sous serre 2 semaines, 3 mois, 36 semaines et 12 mois.

En ce qui concerne le séchage en serre solaire avec plancher chauffant, 3 sites ont été étudiés. Le temps pendant lequel les boues sont restées sous serre n'est pas clairement précisé (5 semaines, précisé pour seulement 1 des 3 sites).

La description des procédés mis en œuvre est toutefois considérée très incomplète, il n'est par exemple pas précisé si les boues sont retournées au cours de ces séchages, combien de fois et à quelle fréquence.

Ces boues sont caractérisées par des taux de matière sèche élevés (entre 70 et 95 %). La siccité la plus importante est observée après stockage en serres avec plancher chauffant.

L'analyse des données soumises dans le rapport du LNE (2020) montre un abattement supérieur à 4,9 log pour les coliphages somatiques et supérieur à 4 log pour les bactériophages ARN F-spécifiques pour les deux traitements considérés (serre solaire simple ou avec plancher chauffant) et l'ensemble des boues étudiées.

En conséquence, considérant les abattements observés, les boues ayant fait l'objet d'un séchage solaire simple ou avec plancher chauffant et permettant d'atteindre une siccité minimale de 80 % pourraient être épandues. La représentativité des STEU choisies, le nombre d'échantillons de boues analysées et la description des procédés sont considérés insuffisants pour établir une recommandation formelle et générale par rapport au traitement/stockage proposé. Ainsi, dans le cadre de l'annexe 2 du projet d'arrêté, pour chaque lot de boues, il

conviendra de s'assurer qu'un abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log est bien obtenu avant tout épandage de ces lots de boues. Un suivi des conditions d'exploitation est recommandé (suivi de la siccité des boues).

3.3.3.6. Séchage sur lit suivi d'un stockage

Avis sur la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) et ayant montré à l'issue d'une analyse par lot, un taux d'abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log et ayant fait l'objet d'un séchage sur lit puis d'un stockage d'une durée minimale de 45 jours.

Les boues produites sont placées dans des ouvrages constitués de bacs en béton dont le plancher est rendu étanche. Dans la partie inférieure, le massif filtrant, non colmatant, est composé de couches superposées de galets, graviers et sable grossier. La durée moyenne de séchage est estimée à 3 semaines (fonction des conditions climatiques). La siccité moyenne attendue est supérieure à 30 %.

Sur les 3 sites présentés dans le rapport du LNE (2020) la durée de stockage pour deux sites est de 45 jours. Pour un site, il semble qu'aucun stockage n'ait été réalisé (date de production = date de prélèvement pour analyses).

L'analyse des données soumises dans le rapport du LNE (2020) montre un abattement supérieur à 5 log pour les coliphages somatiques et supérieur à 3 log pour les bactériophages ARN F-spécifiques pour l'ensemble des boues étudiées. Le très faible nombre d'échantillons de boues analysées, l'écart très important observé concernant les teneurs en matières sèches (20 et 90 %) entre les deux boues après stockage démontrant une absence probable de maîtrise du procédé, ainsi que le niveau de maîtrise jugé faible du traitement par lit de séchage ne permettent pas de se prononcer formellement par rapport à ce type de procédé.

La définition précise d'un lot est par ailleurs capitale pour ce type de traitement.

3.3.3.7. Digestion anaérobie mésophile suivi d'un stockage

Avis sur la possibilité d'épandage de boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) ayant montré à l'issue d'une analyse par lot un taux d'abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log et ayant fait l'objet d'une digestion anaérobie mésophile puis d'un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

Les boues sont placées préalablement dans un digesteur en conditions anaérobies à une température d'environ 35 °C. A l'issue de sa digestion, la boue est stockée.

Trois sites ont été étudiés. Les boues ainsi produites ont ensuite été stockées entre 3 semaines et 4 mois selon les sites. Pour un site, la boue est chaulée avant la méthanisation (ce site ne peut donc être pris en compte). La description des procédés de méthanisation est assez sommaire (le temps de séjour par exemple n'est pas toujours précisé).

L'analyse des données soumises dans le rapport du LNE (2020) montre un abattement supérieur à 4 log pour les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques et l'ensemble des boues étudiées.

En conséquence, considérant les abattements observés, les boues, ayant fait l'objet d'une digestion mésophile anaérobie suivi d'un stockage minimal de 4 mois, pourraient être épandues. La représentativité des STEU choisies et le nombre d'échantillons de boues

analysées sont considérés insuffisants pour établir une recommandation formelle et générale par rapport au traitement/stockage proposé. Ainsi, dans le cadre de l'annexe 2 du projet d'arrêté, pour chaque lot de boues, il conviendra de s'assurer qu'un abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log est bien obtenu avant tout épandage de ces lots de boues.

Bibby et Peccia (2013) ont montré que l'abattement du coronavirus humain HKU1 est élevé dans les digesteurs anaérobies. L'Italian national institute of health (INIH) suggère d'attendre 15-21 jours à 30-35°C de digestion anaérobie avant utilisation des boues en agriculture (INIH 2020). Le coronavirus murin (MHV) et le phage $\Phi 6$ persistent entre 10-20 jours après une digestion anaérobie des boues à 35 - 45 °C (Balboa *et al.* 2020).

3.3.3.8. Stockage non aéré de boues liquides, centrifugation suivi d'un stockage en benne ou filtres plantés de roseaux

Les analyses réalisées sur les boues ayant subi ces traitements/stockages ne permettent pas un abattement considéré comme suffisant en bactériophages (< 2 log que ce soit pour les coliphages somatiques ou les bactériophages ARN F-spécifiques). Ces boues ne peuvent donc entrer dans le cadre du projet d'arrêté.

A noter toutefois que le protocole de suivi des phages n'est pas adapté aux filtres plantés de roseaux. Le temps de stockage étant de l'ordre de l'année voire de plusieurs années, le protocole de suivi n'est pas adapté et il n'est donc pas possible de conclure pour cette filière de traitement/stockage au regard de l'abattement en bactériophages. Par ailleurs, les experts considèrent que la probabilité que les virus (y compris le SARS-CoV-2) puissent survivent dans ces conditions est considérée extrêmement faible. Les experts considèrent que ces boues pourraient donc être épandues sans conditions préalables de suivi des bactériophages.

3.4. Conclusions par rapport à la question 3

► Boues traitées à la chaux suivi d'un stockage de 3 mois minimum, boues obtenues par séchage solaire sous serre et boues obtenues par digestion mésophile suivi d'un stockage de 4 mois minimum

Bien que les données du LNE (2020) montrent un abattement en coliphages somatiques supérieur à 4 log, les données soumises ne permettent pas d'établir de recommandations formelles et générales par rapport aux boues obtenues suite à ces traitements/stockages.

En effet, il n'est pas possible de s'assurer de la représentativité de ces boues et des données soumises, considérant :

- le faible nombre de STEU étudiées au regard de la diversité des conditions de traitement et de stockage pouvant être retrouvées dans les différentes STEU en France ;
- le faible nombre de boues analysées ;
- la description sommaire des procédés mis en œuvre pour obtenir ces boues.

Ainsi, dans le cadre de l'annexe 2 du projet d'arrêté, pour chaque lot de boues produites il conviendra de s'assurer qu'un abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log soit bien obtenu avant tout épandage de ces lots de boues. Le taux d'abattement est mesuré conformément à la méthodologie décrite en annexe 3 du projet d'arrêté ou à une méthodologie équivalente.

Les experts soulignent la nécessité d'une « bancarisation » des données¹² techniques et analytiques afin de permettre une éventuelle exploitation ou ré-exploitations *a posteriori* des résultats.

► **Boues obtenues par séchage sur lit suivi d'un stockage de 45 jours**

Le faible nombre de données disponibles et la disparité du peu de données mesurées sur les boues (teneur en matières sèches notamment) ne permettent pas de s'assurer de la maîtrise des procédés et ne permettent donc pas de se prononcer formellement par rapport à ce type de procédé.

► **Boues obtenues suite à un stockage non aéré de boues liquides, centrifugation suivi d'un stockage en benne ou par filtres plantés de roseaux.**

Les analyses réalisées sur les boues ayant subi ces traitements/stockages ne montrent pas un abattement considéré comme suffisant en bactériophages (< 2 log que ce soit pour les coliphages somatiques ou les bactériophages ARN F-spécifiques). Ces boues ne peuvent donc entrer dans le cadre du projet d'arrêté.

A noter toutefois que le protocole de suivi des phages n'est pas adapté aux filtres plantés de roseaux. Le temps de stockage étant de l'ordre de l'année voire de plusieurs années, le protocole de suivi n'est pas adapté et il n'est donc pas possible de conclure pour cette filière de traitement/stockage au regard de l'abattement en bactériophages. Par ailleurs, les experts considèrent que la probabilité que les virus (y compris le SARS-CoV-2) puissent survivent dans ces conditions est considérée extrêmement faible. Les experts considèrent que ces boues pourraient donc être épandues sans conditions préalables de suivi des bactériophages.

► **Synthèse des filières de traitements/stockage retenues**

Une synthèse des filières de traitements/stockage pouvant être retenues sur la base du rapport du LNE (2020) est présentée en tableau 2.

¹² Processus permettant de conserver les données dans le cadre organisé d'une base de données d'où il est aisé de les extraire au moyen de requêtes.

Tableau 2 : Synthèse des filières de traitements/stockage pouvant être retenues sur la base du rapport du LNE (2020) de suivi des bactériophages.

| Filières | Conditions minimales de stockage | Possibilité d'épandage et conditions |
|--|----------------------------------|--|
| Boues chaulées | 3 mois | Epandage possible de ces boues si et seulement si confirmation d'un taux abattement en coliphages somatiques de 4 log pour chaque lot |
| Serre solaire ou avec plancher chauffant | Teneur de matières sèche > 80 % | |
| Lit de séchage | 1,5 mois | |
| Digestion anaérobie mésophile | 4 mois | |
| Stockage non aéré de boues liquides | Aucune | Pas de possibilité d'épandage |
| Centrifugation et stockage en benne | Aucune | |
| Filtres plantés de roseaux | Aucune | Pas de possibilité d'épandage sur la base du rapport du LNE (2020). Toutefois, les experts considèrent que ces boues pourraient être épandues sans conditions préalables de suivi des bactériophages. |

4. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS DE L'AGENCE

L'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail a été saisie le 19 octobre 2020 par le Ministère de la transition écologique (Direction de l'aménagement du logement et de la nature) pour la réalisation de l'expertise suivante : « demande d'avis sur le projet d'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de COVID-19 ».

Il était plus précisément demandé à l'Agence dans le cadre de cet avis :

- d'évaluer la pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 d'un département pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une station de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants envisagé (**question 1**) ;
- d'évaluer la possibilité, sur la base du rapport du LNE (2020) présentant les résultats de l'abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées, d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) dès lors qu'elles ont fait l'objet d'un traitement et/ou d'un stockage permettant de montrer un taux d'abattement suffisant des bactériophages (**question 3**).

Une actualisation des connaissances a également été réalisée dans le cadre de cette saisine.

Les questions 2 et 4 ont fait l'objet d'un rapport d'expertise scientifique et technique par les laboratoires dédiés du Pôle Recherche et Référence de l'Anses (Laboratoire d'hydrologie de Nancy) (Anses 2021). (cf Annexe 5)

Taux d'incidence hebdomadaire de l'épidémie de COVID-19 et épandage

En ce qui concerne la pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 d'un département pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une STEU de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants, l'Anses considère que l'utilisation de cet indicateur pour estimer l'absence de virus dans les boues des STEU présentes sur ce département, pendant la période de production des boues, présente trop d'incertitudes.

Le taux d'incidence correspond au nombre de tests positifs pour 100 000 habitants sur 7 jours glissants. Il existe plusieurs sources d'incertitude, notamment une incertitude temporelle : d'une part le SARS-Cov-2 peut être détecté très précocement dans les eaux usées générant des boues bien avant les indicateurs épidémiologiques et d'autre part le taux d'incidence hebdomadaire étant une moyenne, il ne représente que partiellement l'évolution possible rapide de l'épidémie.

Il existe également une incertitude de nature spatiale, relative aux difficultés dans certaines situations, à établir une correspondance entre l'incidence hebdomadaire d'un département, qui représente une valeur moyenne sur le département, et des contaminations potentiellement différentes entre des stations de traitement des eaux situées en différents lieux dans ce département.

Actualisation des connaissances concernant le virus SARS-CoV-2 dans les boues

- L'analyse de la bibliographie, arrêtée au 31 décembre 2020, confirme une nouvelle fois la présence de génome du SARS-CoV-2 dans des EU brutes, dans les EU traitées ou dans les boues des STEU, sans toutefois préciser ni la persistance, ni l'intégrité du virus dans les boues traitées, ni le risque infectieux associé. Elle indique que, malgré une potentielle persistance relative (quelques jours) dans les EU comme dans les selles, le virus semble perdre dans les EU une partie de son intégrité et de son caractère infectieux.
- Aucune donnée retrouvée au 31 décembre 2020 ne permet d'actualiser la liste des procédés qui pourraient conduire à un abattement du SARS-CoV-2 (durée de stockage ou température).

L'Agence souligne à nouveau le nombre limité d'études et données disponibles concernant le virus SARS-CoV-2 dans les boues issues des STEU. L'acquisition de données expérimentales et/ou d'informations complémentaires sur la quantification, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans les différents milieux (notamment eaux usées brutes et boues), ainsi que chez l'Homme (tropisme digestif, excrétion de virus infectieux dans les selles) pourrait permettre de lever un grand nombre d'incertitudes.

Analyse globale du rapport d'étude du (LNE 2020) relatif à l'étude de l'abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées

L'Anses rappelle la recommandation de sa précédente note d'AST (Anses 2020d) de réaliser l'étude de cinétique également à la température de 35°C (température observée en méthanisation mésophile notamment).

Les STEU retenues dans cette étude ne sont pas totalement représentatifs du parc français en termes de capacité nominale de traitement. Les STEU de capacité nominale supérieure à 2 000 EH sont surreprésentées et les très petites STEU (< 200 EH) sont absentes de l'étude. Par ailleurs les quantités de boues produites par les STEU sélectionnées dans l'étude, ne couvrent pas l'hétérogénéité des pratiques nationales.

Si certains résultats sont mobilisables pour suivre l'efficacité des différents traitements/procédés de stockage, la généralisation des résultats d'analyse observés pour un traitement/stockage donné à l'ensemble de ces mêmes traitements/stockages en France présente une certaine incertitude. En effet, le nombre d'échantillons de boues analysés reste faible, les traitements appliqués aux boues ou encore les conditions de stockage ne sont souvent que partiellement décrits et ne permettent que d'observer des tendances pour les traitements ou conditions de stockage étudiés par rapport aux abattements constatés.

Intérêt du suivi des bactériophages comme indicateur de SARS-Cov-2

Les deux groupes de bactériophages étudiés dans le rapport du LNE (2020) (coliphages somatiques et bactériophages ARN F-spécifiques) peuvent dans l'état actuel des connaissances être considérés comme des indicateurs d'efficacité de traitement. Les arguments présentés par l'Anses (2020f) et dans l'état actuel des connaissances scientifiques publiées conduisent à considérer que les bactériophages sont plus résistants que les virus enveloppés dont font partie les coronavirus, incluant le SARS-CoV-2 et à formuler l'hypothèse

suivante : utiliser la cinétique d'élimination des bactériophages comme indicateur du SARS COV-2 est acceptable.

L'Anses souligne toutefois que le raisonnement considéré précédemment est un raisonnement théorique s'appuyant sur les connaissances actuelles. Le lien spécifique entre la cinétique d'abattement des phages ARN F-spécifiques et des phages somatiques utilisés comme indicateurs et la disparition des coronavirus SARS-CoV-2 restant encore à démontrer expérimentalement.

Par ailleurs, les conclusions de l'avis en réponses aux questions 2 et 4 de cette saisine soulignent que la quantification dans les boues du génome de SARS-CoV-2, méthode recommandée par l'Anses (2020d) en première intention pour les boues non hygiénisées présente des incertitudes fortes (Anses 2021) (Annexe 5) :

« Aucune structure normative, académique ou de référence n'est actuellement en mesure de proposer une méthode de référence. Par conséquent, les laboratoires qui ont analysé des échantillons de boues pour rechercher du génome de SARS-CoV-2, se sont basés sur leur propre expérience et leur propre développement, ce qui explique le constat d'hétérogénéité qui se dégage des retours du questionnaire adressé aux laboratoires et des auditions. La diversité constatée dans les pratiques analytiques des laboratoires à toutes les étapes des modes opératoires, pourrait conduire à des performances significativement différentes. Une évaluation des performances des laboratoires serait donc particulièrement utile mais actuellement, un seul laboratoire dispose d'une accréditation dans le domaine de la microbiologie des boues, et elle ne concerne que la recherche des entérovirus cultivables et de leur génome par RT-PCR. Qu'il s'agisse des MF/SC ou des boues, en dehors du laboratoire mentionné ci-dessus, l'état actuel des accréditations ne permet donc pas d'identifier de structures disposant de compétences analytiques par biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) pour les paramètres microbiologiques sur ces matrices. Tenant compte de cette configuration, il serait difficile et long d'aboutir à l'accréditation de laboratoires pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. ».

Recommandations de l'Agence par rapport à l'annexe 2 du projet d'arrêté

L'Anses rappelle que l'article 1 du projet d'arrêté prévoit qu'une « méthodologie équivalente » puisse être utilisée pour détecter le génome du virus SARS-Cov-2 dans les boues en sus de la méthodologie décrite en annexe 2 du projet d'arrêté.

Concernant le protocole de l'annexe 2 du projet d'arrêté, l'Anses estime qu'il est préférable d'utiliser les coliphages somatiques comme indicateurs indirects de l'efficacité de traitement des boues de STEU vis-à-vis du SARS-CoV-2, considérant une concentration plus importante dans les boues non traitées et une persistance légèrement supérieure vis-à-vis de l'inactivation thermique comparé aux bactériophages ARN F-spécifiques. Les abattements obtenus pour les coliphages somatiques et les bactériophages ARN F-spécifiques étant très comparables.

Un abattement de 4 log (soit 99,99 %) est le seuil retenu pour valider l'efficacité d'un traitement.

Ainsi, sur cette base et considérant les résultats présentés dans le rapport du LNE (2020), l'Anses estime **que les boues non hygiénisées** (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) peuvent être épandues à l'issue d'une analyse par lot confirmant un taux d'abattement en

coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log, dès lors qu'elles ont fait l'objet d'un des traitements suivants :

- boues ayant fait l'objet d'un traitement à la chaux avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30 % équivalent CaO/MS suivi d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois ;
- boues ayant fait l'objet d'un séchage solaire sous serre avec ou sans plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80 % ;
- boues ayant fait l'objet d'une digestion anaérobie mésophile suivie d'un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

Toutefois, **pour chaque lot de boues produites**, il conviendra de s'assurer qu'un abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log est bien obtenu avant tout épandage.

Dans le cas où la concentration initiale en coliphages somatiques dans les boues est inférieur à 10^4 UFP/ g de matière brute la vérification de l'absence de coliphages somatiques avant épandage (dans les limites de détection de la méthode) pourrait servir à valider la possibilité d'épandre la boue traitée/stockée ou alors une augmentation de la prise d'essai lors de l'étalement sur boîte ou lors du traitement de l'échantillons pourrait permettre de mesurer l'efficacité relative.

Le taux d'abattement doit être mesuré conformément à la méthodologie décrite en annexe 3 du projet d'arrêté ou à une méthodologie équivalente.

Il conviendra de « bancariser » les données (i.e enregistrements des données au niveau national) pour permettre une éventuelle utilisation des résultats.

Par ailleurs il est recommandé de suivre :

- Pour les boues chaulées : les conditions d'exploitation (suivi du taux d'incorporation en chaux dans les boues, de la siccité des boues et de la durée de stockage avant épandage).
- Pour les séchages solaires sous serre : les conditions d'exploitation (suivi de la siccité des boues).
- Pour les digestions anaérobies mésophiles : les conditions d'exploitation (temps de rétention hydraulique minimum, température, durée de stockage).

En ce qui concerne les autres boues et filières de traitements étudiés dans ce rapport :

■ **Boues obtenues par séchage sur lit suivi d'un stockage de 45 jours**

Le faible nombre de données disponibles sur les boues (teneur en matière sèche notamment) et leur disparité ne permettent pas de s'assurer de la maîtrise des procédés et ne permet donc pas de se prononcer formellement par rapport à ce type de procédé.

■ **Boues obtenues suite à un stockage non aéré de boues liquides, à une centrifugation suivi d'un stockage en benne ou à un traitement par filtres plantés de roseaux**

Les analyses réalisées sur les boues ayant subi ces traitements/stockages ne montrent pas un abattement considéré comme suffisant en bactériophages (< 2 log que ce soit pour les coliphages somatiques ou les bactériophages ARN F-spécifiques). Ces boues ne peuvent donc entrer dans le cadre du projet d'arrêté et doivent donc obligatoirement répondre aux exigences de l'arrêté du 30 avril 2020 avant de pouvoir être épandues.

A noter par ailleurs que le protocole de suivi des phages n'est pas adapté aux filtres plantés de roseaux. Le temps de stockage étant de l'ordre de l'année voire de plusieurs années, le

protocole de suivi n'est pas adapté et il n'est donc pas possible de conclure pour cette filière de traitement/stockage. Cependant, la probabilité que les virus survivent dans ces conditions est considérée par les experts comme extrêmement faible.

Autres recommandations

La notion de « lots de boues » doit d'être précisée dans le projet d'arrêté. Une définition basée sur celle de la commission permanente des épandages (CPE) du bassin d'Artois Picardie (CPE-Artois-Picardie 2017) est proposée dans le présent avis :

« Un lot représente une quantité de matières produites sur une période identifiée dans des conditions analogues. Il est caractérisé par une analyse représentative de la période de production. Son cheminement de la production à l'épandage sur une ou plusieurs parcelles agricoles est identifié. Un lot se définit de préférence par une analyse des paramètres agronomiques et des éléments traces métalliques. On veillera à ce que cette (ces) analyse(s) soi(en)t représentative(s) du lot produit sur une période donnée. Dans le cas des boues liquides, un lot sera nécessairement restreint à la capacité du stockage. Si le nombre de vidanges du silo excède le nombre d'analyses demandé réglementairement, des analyses complémentaires seront nécessaires à une bonne gestion par lot. »

La mesure de l'efficacité relative mériterait d'être introduite et définie dans le projet d'arrêté au même titre que le taux d'abattement.

Par ailleurs, l'Anses restera attentive aux études et informations à venir susceptibles de faire évoluer cette évaluation.

Dr Roger Genet

MOTS-CLES

SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, assainissement, hygiénisation, station d'épuration, eaux usées, STEU, boues, transmission, épandage, protocole, bactériophage.

SARS-CoV-2, COVID-19, coronavirus, sewage, wastewater, sewage treatment plant, sewage sludge, experimental protocol, land application, bacteriophage.

BIBLIOGRAPHIE

► Rapports et articles scientifiques :

- ADEME. 1994. *Les germes pathogènes dans les boues résiduaires urbaines (réalisé en collaboration avec l'ENVN et l'ENSP de Rennes et co-financé par le FNDAE)*. 92 p. Réf. n° 1798, ISBN : 2-86817-099-4.
- Afssa. 2007. *Virus transmissibles à l'homme par voie orale (Rapport)*.
- Ahmed, Warish, Paul M Bertsch, Nicola Angel, Kyle Bibby, Aaron Bivins, Leanne Dierens, Janette Edson, John Ehret, Pradip Gyawali, Kerry A Hamilton, Ian Hosegood, Philip Hugenholtz, Guangming Jiang, Masaaki Kitajima, Homa T Sichani, Jiahua Shi, Katja M Shimko, Stuart L Simpson, Wendy J M Smith, Erin M Symonds, Kevin V Thomas, Rory Verhagen, Julian Zaugg et Jochen F Mueller. 2020. "Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers." *Journal of Travel Medicine* 27 (5). <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>.
- Ahmed, Warish, Paul M. Bertsch, Kyle Bibby, Eiji Haramoto, Joanne Hewitt, Flavia Huygens, Pradip Gyawali, Asja Korajkic, Shane Riddell, Samendra P. Sherchan, Stuart L. Simpson, Kwanrawee Sirikanchana, Erin M. Symonds, Rory Verhagen, Seshadri S. Vasana, Masaaki Kitajima et Aaron Bivins. 2020. "Decay of SARS-CoV-2 and surrogate murine hepatitis virus RNA in untreated wastewater to inform application in wastewater-based epidemiology." *Environmental Research* 191: 110092. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110092>.
- Anses. 2015. *Guide de validation des méthodes d'analyses*. Anses (Maisons-Alfort). https://www.anses.fr/fr/system/files/ANSES_GuideValidation.pdf.
- Anses. 2020a. *Avis relatif à une demande urgente sur certains risques liés au COVID-19 - saisine 2020-SA-0037*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/SABA2020SA0037-1.pdf>.
- Anses. 27 mars 2020 2020b. *Avis de l'Anses relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration industrielles durant l'épidémie de COVID-19*. Saisine n° 2020-SA-0056. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2020SA0056.pdf>.
- Anses. 2020c. *Avis relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de COVID-19 - Saisine 2020-SA-0043*. <https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2020SA0043.pdf>.
- Anses. 2020d. *Etat des lieux des capacités analytiques des laboratoires (mesures directes et indirectes) concernant le SARS-CoV-2, dans les matrices résiduaires*. Anses (Maisons-Alfort).
- Anses. 2020e. *Note d'appui scientifique et technique relative à deux projets de protocoles de suivi d'abattement des phages dans les boues*. Saisines n° 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MFSC2020SA0069.pdf>.

- Anses. 27 mars 2020 2020f. *Note d'appui scientifique et technique relative à l'actualisation des connaissances concernant, la présence de SARS-CoV-2 dans les eaux usées/boues, l'efficacité des procédés d'hygiénisation des boues en ce qui concerne l'abattement du SARS -CoV-2, les procédés qui pourraient conduire à un abattement des teneurs en SARS-CoV-2 pour les boues non hygiénisées et l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans différentes matrices». Saisine n° 2020-SA-0069.*
<https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2020SA0043.pdf>.
- Anses. 27 mars 2020 2020g. *Note d'appui scientifique et technique relative à l'état des connaissances disponibles sur la présence, l'infectiosité et la persistance du virus SARS-CoV-2 dans le milieu aquatique ». Saisine n° 2020-SA-0059.*
<https://www.anses.fr/fr/system/files/EAUX2020SA0043.pdf>.
- Anses. 2021. *Rapport d'appui scientifique et technique du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy (LHN) "Demande d'avis sur le projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de Covid-19 - Partie Analyse du SARS-CoV-2 dans les boues avant épandage". Parution à venir.*
- Balboa, Sabela, Miguel Mauricio-Iglesias, Santiago Rodriguez, Lucía Martínez-Lamas, Francisco J. Vasallo, Benito Regueiro et Juan M. Lema. 2020. "The fate of SARS-CoV-2 in WWTPs points out the sludge line as a suitable spot for monitoring." *medRxiv*. 2020.05.25.20112706.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1101/2020.05.25.20112706>.
- Bardi, M. J. et M. A. Oliáee. 2021. "Impacts of different operational temperatures and organic loads in anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge on the fate of SARS-CoV-2. ." *Process Safety and Environmental Protection* 146: 464–472.
<https://doi.org/10.1016/j.psep.2020.11.035>.
- Barril, Patricia Angélica, Luis Alfredo Pianciola, Melina Mazzeo, María Julia Ousset, María Virginia Jaureguiberry, Mauricio Alessandrello, Gloria Sánchez et Juan Martín Oteiza. 2021. "Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters." *Science of The Total Environment* 756: 144105.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105>.
- Belguith, Khaoula, Abdennaceur Hassen et Mahjoub Aouni. 2006. "Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge." *Bioresource Technology* 97 (3): 414-419.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.022>.
- Bertrand, I., J. F. Schijven, G. Sánchez, P. Wyn-Jones, J. Ottoson, T. Morin, M. Muscillo, M. Verani, A. Nasser, A. M. de Roda Husman, M. Myrmel, J. Sellwood, N. Cook et C. Gantzer. 2012. "The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: A review." *Journal of Applied Microbiology* 112 (6): 1059-1074.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05267.x>.
- Bhowmick, G. D., D. Dhar, D. Nath, M. M. Ghangrekar, R. Banerjee, S. Das et J. Chatterjee. 2020. "Coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak: some serious consequences with urban and rural water cycle." *npj Clean Water* 3 (1).
<https://doi.org/10.1038/s41545-020-0079-1>.
- Bibby, Kyle et Jordan Peccia. 2013. "Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis." *Environmental Science & Technology* 47 (4): 1945-1951. <https://doi.org/10.1021/es305181x>.
- Bivins, A., J. Greaves, R. Fischer, K. C. Yinda, W. Ahmed, M. Kitajima, V. J. Munster et K. Bibby. 2020. "Persistence of SARS-CoV-2 in Water and Wastewater. Environmental Science & Technology Letters 7, 937–942. ." *Environmental Science & Technology Letters* 7, 937–942. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00730>.
- Boehm, A. B., A. I. Silverman, A. Schriewer et K. Goodwin. 2019. "Systematic review and meta-analysis of decay rates of waterborne mammalian viruses and coliphages in

- surface waters." *Water Research* 164: 114898.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.114898>.
- Cadiergues, Bérangère. 2000. "Boues d'épuration et micro-organismes pathogènes : influence de différents traitements et du stockage." Université Henri Poincaré - Nancy 1. <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01746906>.
- Carducci, A., S. Arrighi et A. Ruschi. 1995. "Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant." *Lett Appl Microbiol* 21 (3): 207-9. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765x.1995.tb01042.x>.
- Carrillo-Reyes, Julián, Martín Barragán-Trinidad et Germán Buitrón. 2020. "Surveillance of SARS-CoV-2 in sewage and wastewater treatment plants in Mexico." *Journal of Water Process Engineering*: 101815.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jwpe.2020.101815>.
- Cevik, M., M. Tate, O. Lloyd, A. E. Maraolo, J. Schafers et A. Ho. 2021. "SARS-CoV-2, SARS-CoV, and MERS-CoV viral load dynamics, duration of viral shedding, and infectiousness: a systematic review and meta-analysis." *Lancet Microbe* 2 (1): e13-e22. [https://doi.org/10.1016/s2666-5247\(20\)30172-5](https://doi.org/10.1016/s2666-5247(20)30172-5).
- Corman, Victor M, Olfert Landt, Marco Kaiser, Richard Molenkamp, Adam Meijer, Daniel KW Chu, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Julia Schneider, Marie Luisa Schmidt, Daphne GJC Mulders, Bart L Haagmans, Bas van der Veer, Sharon van den Brink, Lisa Wijsman, Gabriel Goderski, Jean-Louis Romette, Joanna Ellis, Maria Zambon, Malik Peiris, Herman Goossens, Chantal Reusken, Marion PG Koopmans et Christian Drosten. 2020. "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." *Eurosurveillance* 25 (3): 2000045.
<https://doi.org/doi:https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- CPE-Artois-Picardie. 2017. *Recyclage agricole des effluents organiques : Suivi annuel des épandages des effluents urbains et industriels - Guide méthodologique - 3ème édition*. https://hautsdefrance.chambres-agriculture.fr/fileadmin/user_upload/Hauts-de-France/029_Inst-Hauts-de-France/Environnement-et-territoires/Eau_sol/Agronomie_et_sols/guide_suivi_urbain_industriel2017.pdf.
- D'Aoust, P. M., E. Mercier, D. Montpetit, J. J. Jia, I. Alexandrov, N. Neault, A. T. Baig, J. Mayne, X. Zhang, T. Alain, M. A. Langlois, M. R. Servos, M. MacKenzie, D. Figeys, A. E. MacKenzie, T. E. Graber et R. Delatolla. 2020. "Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence." *Water Research* 188: 116560. .
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116560>.
- D'Aoust, Patrick M., Elisabeth Mercier, Danika Montpetit, Jian-Jun Jia, Ilya Alexandrov, Nafisa Neault, Aiman Tariq Baig, Janice Mayne, Xu Zhang, Tommy Alain, Marc-André Langlois, Mark R. Servos, Malcolm MacKenzie, Daniel Figeys, Alex E. MacKenzie, Tyson E. Graber et Robert Delatolla. 2021. "Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence." *Water Research* 188: 116560.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116560>.
- DEB. 2009. *Bilan de 10 années d'application de la réglementation relative à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées, rapport n°1771, CGAAER, 33 p.*
- Dingle, Tanis C, Ruth Hall Sedlak, Linda Cook et Keith R Jerome. 2013. "Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances." *Clinical Chemistry* 59 (11): 1670-1672.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211045>.
- Elissalde, N.; J. P. Ganière, M. L'hostis, M Legeas, R. Demillac, J. Carré, J. Wiart et I. Feix. 1994. "Les germes pathogènes dans les boues résiduelles des stations d'épuration urbaines. Ademe, ENSP, Ministère de l'agricultureENV Nantes. Livre édité par Ademe, 1994."

- Elsamadony, Mohamed, Manabu Fujii, Takayuki Miura et Toru Watanabe. 2021. "Possible transmission of viruses from contaminated human feces and sewage: Implications for SARS-CoV-2." *Science of The Total Environment* 755: 142575.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142575>.
- EPNAC. 2011. *Protocole de prélèvement pour l'échantillonnage des boues dans les lits de séchage plantés de roseaux en vue de leur qualification agricole. Rapport Cemagref-Onema produit par l'atelier thématique « Curage – Epandage pour les filtres plantés de roseaux et les lits de séchage plantés de roseaux » du groupe de travail national sur l'Evaluation des Procédés Nouveaux d'Assainissement des petites et moyennes Collectivités (EPNAC), 28 p.*
- Foladori, Paola, Francesca Cutrupi, Nicola Segata, Serena Manara, Federica Pinto, Francesca Malpei, Laura Bruni et Giuseppina La Rosa. 2020. "SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review." *Science of The Total Environment* 743: 140444.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>.
- Gonzalez, Raul, Kyle Curtis, Aaron Bivins, Kyle Bibby, Mark H. Weir, Kathleen Yetka, Hannah Thompson, David Keeling, Jamie Mitchell et Dana Gonzalez. 2020. "COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology." *Water Research* 186: 116296.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.
- Graham, Katherine E., Stephanie K. Loeb, Marlene K. Wolfe, David Catoe, Nasa Sinnott-Armstrong, Sooyeol Kim, Kevan M. Yamahara, Lauren M. Sassoubre, Lorelay M. Mendoza Grijalva, Laura Roldan-Hernandez, Kathryn Langenfeld, Krista R. Wigginton et Alexandria B. Boehm. 2021. "SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids Is Associated with COVID-19 Cases in a Large Urban Sewershed." *Environmental Science & Technology* 55 (1): 488-498.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06191>.
- Gundy, Patricia M., Charles P. Gerba et Ian L. Pepper. 2008. "Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater." *Food and Environmental Virology* 1 (1): 10.
<https://doi.org/10.1007/s12560-008-9001-6>.
- Haramoto, E., B. Malla, O. Thakali et M. Kitajima. 2020. "First environmental surveillance for the presence of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and river water in Japan." *Science of the Total Environment* 737. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140405>.
- INIH. 2020. *Interim Indications on the Management of Sewage Sludge for the Prevention of the Spread of the SARS-CoV-2 Virus (In Italian). Italian National Institute of Health (INIH). Rome, Italy.*
- Jofre, J. ; Lucena, F. ; Blanch, A.R.; Muniesa, M. . 2016. "'Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources" *Water* 8, no. 5: 199. ." <https://doi.org/https://doi:10.3390/w8050199>.
- Kaplan, Edward H., Dennis Wang, Mike Wang, Amyn A. Malik, Alessandro Zulli et Jordan Peccia. 2020. "Aligning SARS-CoV-2 indicators via an epidemic model: application to hospital admissions and RNA detection in sewage sludge." *Health Care Management Science* in press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/s10729-020-09525-1>.
- Kocamemi, Bilge Alpaslan, Halil Kurt, Ahmet Sait, Fahriye Sarac, Ahmet Mete Saatci et Bekir Pakdemirli. 2020. "SARS-CoV-2 Detection in Istanbul Wastewater Treatment Plant Sludges." *medRxiv*: 2020.05.12.20099358.
<https://doi.org/10.1101/2020.05.12.20099358>.
- Korajkic, A., P. Wanjugi, L. Brooks, Y. Cao et V. J. Harwood. 2019. "Persistence and Decay of Fecal Microbiota in Aquatic Habitats." *Microbiol Mol Biol Rev* 83 (4).
<https://doi.org/10.1128/membr.00005-19>.
- Kumar, M., K. Kuroda, A. K. Patel, N. Patel, P. Bhattacharya, M. Joshi et C. G. Joshi. 2021. "Decay of SARS-CoV-2 RNA along the wastewater treatment outfitted with Upflow Anaerobic Sludge Blanket (UASB) system evaluated through two sample

- concentration techniques. in press." *Science of The Total Environment*.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142329>.
- Kumar, M., A. K. Thakur, P. Mazumder, K. Kuroda, S. Mohapatra, J. Rinklebe, A. Ramanathan, Z. Cetecioglu, S. Jain, V. K. Tyagi, P. Gikas, S. Chakraborty, M. Tahmidul Islam, A. Ahmad, A. V. Shah, A. K. Patel, T. Watanabe, M. Vithanage, K. Bibby, M. Kitajima et P. Bhattacharya. 2020. "Frontier review on the propensity and repercussion of SARS-CoV-2 migration to aquatic environment." *Journal of Hazardous Materials Letters* 1: 100001.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.hazl.2020.100001>.
- Kweiyor Tetteh, Emmanuel, Mark Opoku Amankwa, Edward Kwaku Armah et Sudesh Rathilal. 2020. "Fate of COVID-19 Occurrences in Wastewater Systems: Emerging Detection and Treatment Technologies—A Review." *Water* 12 (10).
<https://doi.org/10.3390/w12102680>.
- Lardy-Fontan, S. et B. Lalere. 2017. *AQUAREF. Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau. Auteurs : S. LARDY-FONTAN, B. LALERE (LNE) Avec la collaboration de P. MOREAU, J.P.GHESTEM (BRGM), B. LEPOT, S. NGO (Ineris), C.MARGOUM (Irstea)*
https://www.aquaref.fr/system/files/2016LNE_D2b_lignes_directrices_stabilite_VF_0.pdf.
- Lee, H. S. et M. D. Sobsey. 2011. "Survival of prototype strains of somatic coliphage families in environmental waters and when exposed to UV low-pressure monochromatic radiation or heat." *Water Res* 45 (12): 3723-34.
<https://doi.org/10.1016/j.watres.2011.04.024>.
- LNE. 2020. *Rapport d'étude du Laboratoire national de métrologie et d'essais. Abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées. Auteurs : Lardy-Fontan, S. et Guigues, N. en collaboration avec Gantzer C. (Université de Lorraine/CNRS), la FNCCR et la FP2E.*
- Lu, Dingnan, Zhuangrong Huang, Jiayue Luo, Xiaoqi Zhang et Sha Sha. 2020. "Primary concentration – The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review." *Science of The Total Environment* 747: 141245. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>.
- Mocé-Llivina, L., M. Muniesa, H. Pimenta-Vale, F. Lucena et J. Jofre. 2003. "Survival of bacterial indicator species and bacteriophages after thermal treatment of sludge and sewage." *Appl Environ Microbiol* 69 (3): 1452-6.
<https://doi.org/10.1128/aem.69.3.1452-1456.2003>.
- Monpoeho, S., A. Maul, B. Mignotte-Cadiergues, L. Schwartzbrod, S. Billaudel et V. Ferré. 2001. "Best Viral Elution Method Available for Quantification of Enteroviruses in Sludge by Both Cell Culture and Reverse Transcription-PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6): 2484.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2484-2488.2001>.
- Muirhead, A., K. Zhu, J. Brown, M. Basu, M. A. Brinton, F. Costa, M. J. Hayat et C. E. Stauber. 2020. "Zika Virus RNA Persistence in Sewage." *Environmental Science & Technology Letters* 7 (9): 659-664. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00535>.
- Núñez-Delgado, Avelino. 2020. "SARS-CoV-2 in soils." *Environmental Research* 190: 110045. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110045>.
- Peccia, J., A. Zulli, D. E. Brackney, N. D. Grubaugh, E. H. Kaplan, A. Casanovas-Massana, A. I. Ko, A. A. Malik, D. Wang, M. Wang, J. L. Warren, D. M. Weinberger et S. B. Omer. 2020. "SARS-CoV-2 RNA concentrations in primary municipal sewage sludge as a leading indicator of COVID-19 outbreak dynamics. Pré-print." *medRxiv*: 2020.05.19.20105999. <https://doi.org/10.1101/2020.05.19.20105999>.
- Peccia, Jordan, Alessandro Zulli, Doug E. Brackney, Nathan D. Grubaugh, Edward H. Kaplan, Arnau Casanovas-Massana, Albert I. Ko, Aryn A. Malik, Dennis Wang, Mike

- Wang, Joshua L. Warren, Daniel M. Weinberger, Wyatt Arnold et Saad B. Omer. 2020. "Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics." *Nature Biotechnology* 38 (10): 1164-1167. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0684-z>.
- Randazzo, W., E. Cuevas-Ferrando, R. Sanjuán, P. Domingo-Calap et G. Sánchez. 2020. "Metropolitan wastewater analysis for COVID-19 epidemiological surveillance." *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 230. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113621>.
- Rimoldi, S. G., F. Stefani, A. Gigantiello, S. Polesello, F. Comandatore, D. Mileto, M. Maresca, C. Longobardi, A. Mancon, F. Romeri, C. Pagani, L. Moja, M. R. Gismondo et F. Salerno. 2020. "Presence and vitality of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers." *medRxiv*: 2020.05.01.20086009. <https://doi.org/10.1101/2020.05.01.20086009>.
- Rimoldi, Sara Giordana, Fabrizio Stefani, Anna Gigantiello, Stefano Polesello, Francesco Comandatore, Davide Mileto, Mafalda Maresca, Concetta Longobardi, Alessandro Mancon, Francesca Romeri, Cristina Pagani, Francesca Cappelli, Claudio Roscioli, Lorenzo Moja, Maria Rita Gismondo et Franco Salerno. 2020. "Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers." *Science of The Total Environment* 744: 140911. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>.
- Rusiñol, Marta, Sandra Martínez-Puchol, Eva Forés, Marta Itarte, Rosina Girones et Sílvia Bofill-Mas. 2020. "Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater." *Current Opinion in Environmental Science & Health* 17: 21-28. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>.
- Santé_Canada. 2019. *Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Document technique "Les virus entériques"*.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek et R. John. 2012. "PCR inhibitors – occurrence, properties and removal." *Journal of Applied Microbiology* 113 (5): 1014-1026. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Sherchan, S. P., S. Shahin, L. M. Ward, S. Tandukar, T. G. Aw, B. Schmitz, W. Ahmed et M. Kitajima. 2020. "First detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater in North America: A study in Louisiana, USA." *Science of The Total Environment* 743: 140621. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140621>.
- Silverman, A. I. et A. B. Boehm. 2020. "Systematic Review and Meta-Analysis of the Persistence and Disinfection of Human Coronaviruses and Their Viral Surrogates in Water and Wastewater." *Environmental Science & Technology Letters* 7 (8): 544-553. <https://doi.org/10.1021/acs.estlett.0c00313>.
- Sokolova, E., J. Aström, T. J. Pettersson, O. Bergstedt et M. Hermansson. 2012. "Decay of Bacteroidales genetic markers in relation to traditional fecal indicators for water quality modeling of drinking water sources." *Environ Sci Technol* 46 (2): 892-900. <https://doi.org/10.1021/es2024498>.
- Tran, H. N., G. T. Le, D. T. Nguyen, R. S. Juang, J. Rinklebe, A. Bhatnagar, E. C. Lima, H. M. N. Iqbal, A. K. Sarmah et H. P. Chao. 2021. "SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: A critical review about presence and concern." *Environmental Research* 193. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110265>.
- US-EPA. 2015. *Review of Coliphages as Possible Indicators of Fecal Contamination for Ambient Water Quality. EPA 820-R-15-098. Washington D.C.*
- Viau, Emily, Kyle Bibby, Tania Paez-Rubio et Jordan Peccia. 2011. "Toward a Consensus View on the Infectious Risks Associated with Land Application of Sewage Sludge." *Environmental Science & Technology* 45 (13): 5459-5469. <https://doi.org/10.1021/es200566f>.

- Wang, X. W., J. Li, T. Guo, B. Zhen, Q. Kong, B. Yi, Z. Li, N. Song, M. Jin, W. Xiao, X. Zhu, C. Gu, J. Yin, W. Wei, W. Yao, C. Liu, J. Li, G. Ou, M. Wang, T. Fang, G. Wang, Y. Qiu, H. Wu, F. Chao et J. Li. 2005. "Concentration and detection of SARS coronavirus in sewage from Xiao Tang Shan hospital and the 309th Hospital of the Chinese People's Liberation Army." *Water Science and Technology* 52: 213-221.
- Westhaus, S., F. A. Weber, S. Schiwy, V. Linnemann, M. Brinkmann, M. Widera, C. Greve, A. Janke, H. Hollert, T. Wintgens et S. Ciesek. 2021. "Detection of SARS-CoV-2 in raw and treated wastewater in Germany - Suitability for COVID-19 surveillance and potential transmission risks. pré-print." *Sci Total Environ* 751: 141750.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141750>.
- WHO. 2020a. *Water, sanitation, hygiene and waste management for the COVID-19 virus, 3 march 2020*.
- WHO. 2020b. "Water, sanitation, hygiene, and waste management for the COVID-19 virus: interim guidance, 19 March 2020." Geneva: World Health Organization; Contract No.: WHO/2019-nCoV/IPC_WASH/2020.2.
- Wigginton, K. R., Y. Ye et R. M. Ellenberg. 2015. "Emerging investigators series: The source and fate of pandemic viruses in the urban water cycle." *Environmental Science: Water Research and Technology* 1 (6): 735-746. <https://doi.org/10.1039/c5ew00125k>.
- Wölfel, R., V. M. Corman, W. Guggemos, M. Seilmaier, S. Zange, M. A. Müller, D. Niemeyer, T. C. Jones, P. Vollmar, C. Rothe, M. Hoelscher, T. Bleicker, S. Brünink, J. Schneider, R. Ehmann, K. Zwirgmaier, C. Drosten et C. Wendtner. 2020. "Virological assessment of hospitalized patients with COVID-2019." *Nature* 581 (7809): 465-469.
<https://doi.org/10.1038/s41586-020-2196-x>.
- Wurtzer, S., V. Marechal, J. M. Mouchel et L. Moulin. 2020. "Time course quantitative detection of SARS-CoV-2 in Parisian wastewaters correlates with COVID-19 confirmed cases. pré-print." *medRxiv*. 2020.04.12.20062679.
<https://doi.org/10.1101/2020.04.12.20062679>.
- Wurtzer, S., P. Waldman, A. Ferrier-Rembert, G. Frenois-Veyrat, J. M. Mouchel, M. Boni, Y. Maday, V. Marechal et L. Moulin. 2020. "Several forms of SARS-CoV-2 RNA can be detected in wastewaters : implication for wastewater-based epidemiology and risk assessment. Pré-print." *medRxiv*. 2020.12.19.20248508.
<https://doi.org/10.1101/2020.12.19.20248508>.
- Xiao, F., J. Sun, Y. Xu, F. Li, X. Huang, H. Li, J. Zhao et J. Huang. 2020. "Infectious SARS-CoV-2 in Feces of Patient with Severe COVID-19." *Emerging Infectious Diseases* 26.
<https://doi.org/https://dx.doi.org/10.3201/eid2608.200681>.
- Xiao, Fei, Meiwen Tang, Xiaobin Zheng, Ye Liu, Xiaofeng Li et Hong Shan. 2020. "Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2." *Gastroenterology* 158 (6): 1831-1833.e3. <https://doi.org/https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.
- Ye, Y., R. M. Ellenberg, K. E. Graham et K. R. Wigginton. 2016a. "Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater." *Environ Sci Technol* 50 (10): 5077-85. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>.
- Ye, Yinyin, Robert M. Ellenberg, Katherine E. Graham et Krista R. Wigginton. 2016b. "Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater." *Environmental Science & Technology* 50 (10): 5077-5085.
<https://doi.org/10.1021/acs.est.6b00876>.
- Yuan, Xi, Chengming Yang, Qian He, Junhu Chen, Dongmei Yu, Jie Li, Shiyao Zhai, Zhifeng Qin, Ke Du, Zhenhai Chu et Peiwu Qin. 2020. "Current and Perspective Diagnostic Techniques for COVID-19." *ACS Infectious Diseases* 6 (8): 1998-2016.
<https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00365>.
- Zang, R., M. F. G. Castro, B. T. McCune, Q. Zeng, P. W. Rothlauf, N. M. Sonnek, Z. Liu, K. F. Brulois, X. W. Wang, H. B. Greenberg, M. S. Diamond, M. A. Ciorba, S. P. J. Whelan et S. Ding. 2020. "TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection

of human small intestinal enterocytes." *Science Immunology* 5 (47): eabc3582.

<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc3582>.

Zhang, Y., T. Ding, X. Xiao, Y. Zhang et L. He. 2020. "Predicted Non-Effect Concentrations for Disinfection By-Products of Haloacetic Acids (HAAs) in Freshwater Environment in China. Préprint." *我国淡水环境中卤乙酸类消毒副产物的预测与生态效应研究*

<https://doi.org/10.13198/j.issn.1001-6929.2020.05.42>.

Zheng, S., J. Fan, F. Yu, B. Feng, B. Lou, Q. Zou, G. Xie, S. Lin, R. Wang, X. Yang, W. Chen, Q. Wang, D. Zhang, Y. Liu, R. Gong, Z. Ma, S. Lu, Y. Xiao, Y. Gu, J. Zhang, H. Yao, K. Xu, X. Lu, G. Wei, J. Zhou, Q. Fang, H. Cai, Y. Qiu, J. Sheng, Y. Chen et T. Liang. 2020. "Viral load dynamics and disease severity in patients infected with SARS-CoV-2 in Zhejiang province, China, January-March 2020: retrospective cohort study." *BMJ* 369: m1443. <https://doi.org/10.1136/bmj.m1443>.

► Normes

AFNOR. 2001. NF EN ISO 10705-1. Octobre 2001 T90-440-1 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 1 : dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.

AFNOR. 2001. NF EN ISO 10705-2 Octobre 2001. T90-440-2. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2 : dénombrement des coliphages somatiques.

ISO 2003. ISO 10705-3:2003 Octobre 2003. Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau.

AFNOR. 2003. NF X 50-110 Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

AFNOR. 2011. NF EN ISO 5667-13 Juillet 2011. T90-511-13. Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 13 : lignes directrices pour l'échantillonnage de boues.

► Références réglementaires :

Arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de COVID-19.

Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées

Citation suggérée

Anses. (2021). Demande d'avis sur le projet d'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de COVID-19 (saisine 2020-SA-0137). Maisons-Alfort : Anses 171 pages.

ANNEXE 1

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE: Les experts membres de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, intuitu personae, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

RAPPORTEURS

M. DAGOT Christophe – Enseignant Chercheur – ENSIL – ESTER – expert filière STEP – traitement des boues membre du CES eau de l'Anses.

Mme DEPORTES Isabelle – Ingénieure impacts sanitaires et environnementaux de la gestion des déchets à l'ADEME – spécialiste traitements des déchets – membre du CES Matières Fertilisantes et supports de cultures de l'Anses.

M. GARNAUD-CORBEL Stéphane - Chargé de mission recherche à l'Office français de la biodiversité (OFB) – spécialiste assainissement et traitement des boues - membre du CES eau de l'Anses.

Mme LUCAS Françoise – Enseignant-Chercheur Université Paris-Est CRETEIL – spécialiste virologie, écologie microbienne, indicateurs de contamination fécale, bactériophages, mycobactéries, virus entériques, eaux usées - membre du CES eau de l'Anses.

Mme OGORZALY Leslie – Chercheur au Luxembourg Institute of Science and Technology (LIST) – spécialiste virologie, virus pathogènes et indicateurs viraux de contamination fécale (bactériophage), surveillance des virus dans l'eau.

COMITÉS D'EXPERTS SPÉCIALISÉS

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis et adoptés par le CES suivant :

- CES Matières Fertilisantes et supports de cultures (MFSC) – (2019 – 2022)

Président

M. Abraham ESCOBAR-GUTIÉRREZ

Vice-président

M. Pascal PANDARD

Membres

Mme Isabelle DEPORTES

Mme Céline DRUILHE

M. François LAURENT

Mme Isabelle QUILLERE

Mme Cécile REVELLIN

M. Christian STEINBERG

M. Diederik VAN TUINEN

M. Franck VANDENBULCKE

Les travaux, objets du présent rapport ont été suivis par le CES suivant :

- CES Eaux (2021-2023)

Président

M. Gilles BORNERT

Vice-présidents

M. Jean-François HUMBERT

Mme Anne TOGOLA

Membres

M. Jean BARON

M. Jean-Luc BOUDENNE

M. Nicolas CIMETIERE

M. Bruno COULOMB

M. Christophe DAGOT

Mme Sabine DENOOZ

Mme Isabelle DUBLINEAU

M. Frédéric FEDER

M. Matthieu FOURNIER

M. Stéphane GARNAUD-CORBEL

Mme Nathalie GARREC

M. Johnny GASPERI

M. Julio GONÇALVÈS

M. Jean-Louis GONZALEZ

M. Olivier HORNER

M. Frédéric JORAND

M. Michel JOYEUX

M. Jérôme LABANOWSKI

Mme Sophie LARDY-FONTAN

Mme Françoise LUCAS

M. Christophe MECHOUK

M. Laurent MOULIN

M. Damien MOULY

Mme Fabienne PETIT

Mme Catherine QUIBLIER

Mme Pauline ROUSSEAU-GUEUTIN

Mme Marie-Pierre SAUVANT-ROCHAT

Mme Michèle TREMBLAY

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. DUMENIL Jean-Rémi - Coordinateur scientifique - Pôle Matières Fertilisantes et Supports de Cultures - Unité de Coordination des Intrants du Végétal – Anses

Mme WESTERBERG Estelle - Chef de projets scientifiques – Unité Evaluation des risques liés à l'eau – Anses.

Contribution scientifique

Mr DUBOISSET Arnaud – Cellule Veille et Développement Scientifique (CVDS) – Anses.

Mme PANETIER Pascale - Cheffe de l'unité Evaluation des risques liés à l'eau – Anses.

ANNEXE 2 : LETTRE DE SAISINE

2020-SA-0137



Direction générale de l'aménagement,
du logement et de la nature

Direction de l'eau et de la biodiversité

Paris, le 13 OCT. 2020

Sous-direction de la protection et de la gestion de l'eau,
des ressources minérales et des écosystèmes aquatiques

Bureau de la lutte contre les pollutions domestiques et
industrielles

La directrice générale de l'aménagement du
logement et de la nature

à

Monsieur le Directeur général
Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail

Nos réf. : 2020 457 EARM4 LM Lettre de saisine de l'ANSES projet
d'arrêté modifiant l'arrêté boues covid
Affaire suivie par : lucile.marsollier@developpement-durable.gouv.fr
Tél. : 01 40 81 35 08

**Objet : demande d'avis sur le projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités
d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de covid-19**

PJ :

- projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues pendant la crise sanitaire
- rapport d'étude relatif à l'abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées

Depuis le début de l'épidémie de covid-19, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'ARN viral du SARS-COV 2 dans les eaux usées. Cela a conduit l'Etat à interroger l'ANSES sur les risques de propagation du virus via l'épandage des boues d'épuration urbaines sur les sols agricoles et les éventuelles mesures à prendre pour limiter ce risque. L'ANSES a rendu son avis le 27 mars 2020. Sur cette base, l'Etat a conditionné, via l'arrêté du 30 avril 2020, l'épandage de boues sur les sols agricoles, en forêt ou à des fins de végétalisation ou de reconstitution de sols à leur hygiénisation préalable. Cette disposition concerne toutes les boues extraites après la date d'entrée en zone d'exposition à risque pour le COVID-19.

Ces nouvelles exigences posent des difficultés aux collectivités du fait des dépenses imprévues et parfois élevées qu'elles occasionnent, en fonctionnement et/ou en investissement. Face à cette situation et considérant que cette crise sanitaire pourrait perdurer, il nous faut envisager des pratiques plus adaptées au contexte local.

Aussi, dans le cadre d'une saisine complémentaire de notre part, mes services vous ont adressé le 15 mai 2020 deux projets de protocoles dans le but d'étudier le taux d'abattement de bactériophages dans les boues dans l'attente d'une méthode normalisée du suivi du SARS-CoV-2. Dans ses conclusions, publiées le 19 juin 2020, l'agence confirmait l'intérêt des protocoles pour valider les indicateurs d'efficacité de traitements d'inactivation virale. Sur la base des commentaires et recommandations émis dans cette note d'appui technique, nous vous adressons en pièce jointe, le rapport d'étude présentant les résultats de la mise en œuvre de ces deux protocoles.

De plus, dans cette même note du 19 juin 2020, l'agence préconisait « en première intention de procéder pour les boues non hygiénisées, à la recherche de génome viral du SARS-CoV-2 directement dans ces boues » en

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069

précisant que « l'absence de génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues analysées, dans les conditions de contrôle qualité adaptée, est synonyme d'absence de SARS-CoV-2 infectieux ». Des échanges entre nos services ont permis de préciser quelques modalités opérationnelles à respecter et à suivre pour la réalisation des ces analyses PCR. Ces modalités mériteraient d'être confirmées et, le cas échéant complétées, par l'Agence afin que les résultats obtenus soient suffisamment robustes, pour autoriser, en tout sécurité, l'épandage des boues sans hygiénisation.

Par ailleurs, considérant que les dates d'entrée en zone d'exposition à risques pour le covid-19 ont été définies pour chaque département sur la base du taux d'incidence hebdomadaire du COVID-19 publié chaque semaine par Santé publique France, il est apparu envisageable et cohérent d'utiliser à nouveau cet indicateur pour évaluer la situation épidémique d'un département et déterminer si l'épandage des boues est possible ou non. Cependant des difficultés ont été mises en avant sur l'applicabilité de cet indicateur, défini pour chaque département, à l'échelle d'une station de traitement des eaux usées en raison des éventuelles zones de concentration du virus qui pourraient être masquées à l'échelle départementale mais qui auraient un effet sur la qualité des boues localement.

L'ensemble de ces éléments a conduit la direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, la direction générale de la prévention des risques et la direction générale de l'alimentation, à élaborer un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 afin de faire évoluer le cadre réglementaire relatif à l'épandage des boues pendant la crise sanitaire.

Aussi, nous sollicitons votre avis sur le projet d'arrêté ci-joint, et particulièrement sur les éléments suivants :

- la pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire du covid-19 d'un département pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une station de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants envisagé.
- les modalités d'échantillonnage et d'analyse du génome du SARS-COV-2 prévues au 3° de l'article 1 du projet d'arrêté. Ces dispositions ont été définies sur la base des échanges avec vos services et à partir des modalités d'échantillonnage et d'analyse décrites dans l'arrêté du 8 janvier 1998.
- la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) dès lors qu'elles ont fait l'objet d'un des traitements suivants, dans les conditions qui ont permis de montrer un taux d'abattement suffisant des bactériophages, à savoir :
 - o les boues ayant fait l'objet d'un chaulage avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30% équivalent CaO/MS puis d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois.
 - o les boues ayant fait l'objet d'un séchage solaire avec plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80%.
- la possibilité d'épandre des lots de boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) à l'issue d'une analyse par lot confirmant un taux abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log, dès lors qu'ils ont fait l'objet d'un des traitements suivants :
 - o un séchage sur lit puis un stockage d'une durée minimale de 1.5 mois.
 - o une digestion anaérobie mésophile puis un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

Par ailleurs, nous vous remercions de bien vouloir formuler des recommandations concernant l'utilisation de la RT-PCR:

- la ou les fréquences minimales d'analyse du génome du SARS-CoV-2 qu'il conviendrait de faire figurer dans le futur arrêté ;
- la méthode de préparation des échantillons, la prise d'essai, la méthode d'extraction du virus de la matrice boue ainsi que la méthode d'extraction des acides nucléiques qu'il conviendrait de préciser dans le protocole d'échantillonnage et d'analyse du génome sur SARS-CoV-2 ;
- la matrice pour laquelle l'accréditation sur la méthode RT-PCR est requise.

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069

L'avis de votre agence sur ces questions est attendu au plus tard le 18 décembre 2020. Cet avis tiendra compte de l'évolution des connaissances disponibles sur l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans les selles humaines, les eaux usées et les boues d'épuration urbaines.

Nos services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

La directrice générale de l'aménagement, du logement et de
la nature

Stéphanie DUPUY-LYON



Copie :

-le directeur général de la prévention des risques

-le directeur général de l'alimentation

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069

ANNEXE 3 : RAPPORT D'ETUDE DU LABORATOIRE NATIONAL DE METROLOGIE DES EAUX (LNE) REALISE EN COLLABORATION AVEC L'UNIVERSITE DE LORRAINE/CNRS, LA FNCCR ET LA FP2E DU 23 SEPTEMBRE 2020 ABATTEMENT DES BACTERIOPHAGES DANS LES BOUES DE STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES (P201856 - DOCUMENT DMSI/1 - PAGE 1/50) (LNE (2020))

Abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées

S. Lardy-Fontan, N. Guigues

En collaboration avec
C. Gantzer (Université de Lorraine/CNRS),
la FNCCR et la FP2E

RAPPORT D'ETUDE

| | |
|-----------------------|---|
| Demandeur : | Laure Souillac, Adjointe à la sous directrice Sous direction de la protection et de la gestion de l'eau, des ressources minérales et des écosystèmes aquatiques Direction de l'eau et de la biodiversité Ministère de la transition écologique et solidaire 1 place Carpeaux 92055 La Défense Cedex |
| Date de la commande : | Commande n° 1405033489 du 7/05/2020 |
| Objet : | 20EARM06 – Ependage des boues non <u>hygiénisées</u> |

La reproduction du présent document n'est autorisée que sous sa forme intégrale.
Il comporte 50 pages.

TABLE DES MATIERES

| | | |
|-------|--|-----------|
| 1 | CONTEXTE ET OBJECTIFS..... | 4 |
| 1.1 | Gouvernance | 4 |
| 1.2 | Justification de l'utilisation des bactériophages comme indicateurs | 5 |
| 1.2.1 | Méthodes directes de recherche et de dénombrement du SARS-CoV-2 : principes, limites et capacité des laboratoires..... | 5 |
| 1.2.2 | Intérêt des bactériophages comme indicateurs | 7 |
| 2 | MATERIELS ET METHODES | 9 |
| 2.1 | Méthodes d'analyse des bactériophages | 9 |
| 2.2 | Assurance qualité / contrôle qualité | 10 |
| 2.3 | Performances de la méthode..... | 10 |
| 3 | ETUDE CINETIQUE..... | 12 |
| 3.1 | Choix de la matrice d'essai..... | 12 |
| 3.2 | Choix de la durée et des conditions thermiques de stockage | 12 |
| 3.3 | Protocole général d'étude de la cinétique d'abattement | 13 |
| 3.4 | Résultats..... | 15 |
| 3.4.1 | Etude de stabilité..... | 15 |
| 3.4.1 | Evaluation de l'abattement | 18 |
| 4 | ETUDE DE L'ABATTEMENT DES BACTERIOPHAGES DANS LES BOUES DE STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES | 19 |
| 4.1 | Sélection des stations de traitement des eaux usées..... | 19 |
| 4.2 | Prélèvements et analyses de boues brutes et stockées..... | 22 |
| 4.3 | Types et conditions de stockage de boues | 23 |
| 4.3.1 | Boues chaulées..... | 23 |
| 4.3.2 | Stockage non aéré de boues liquides..... | 26 |
| 4.3.3 | Digestion anaérobie mésophile | 29 |
| 4.3.4 | Filtre planté de roseaux..... | 31 |
| 4.3.5 | Lit de séchage..... | 33 |
| 4.3.6 | Serre | 34 |
| 4.4 | Résultats..... | 36 |
| 4.4.1 | Traitement des données..... | 36 |
| 4.4.2 | Taux de matière sèche..... | 37 |
| 4.4.3 | Concentration et abattement en bactériophages | 38 |
| 4.4.4 | Analyse détaillée par filière de traitement des boues | 41 |
| 5 | CONCLUSIONS-PERSPECTIVES..... | 46 |
| 6 | REFERENCES..... | 49 |

GLOSSAIRE

ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

DGAL : Direction Générale de l'Alimentation (Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation)

MTESS : Ministère de la Transition Ecologique et Solidaire

DGALN : Direction Générale de l'Aménagement, du Logement et de la Nature (Ministère de la Transition Ecologique)

DEB : Direction de l'Eau et de la Biodiversité (Ministère de la Transition Ecologique)

FP2E : Fédération Professionnelle des Entreprises de l'Eau

FNCCR : Fédération nationale des collectivités concédantes et régies

STEU : Station de traitement des eaux urbaines

EH : Equivalent habitants

RT-PCR : RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction

RT-qPCR : RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction quantitative UFP :

unité de concentration en bactériophages (pfu : plaque forming units) NF : norme française

1 CONTEXTE ET OBJECTIFS

Comme suite à l'avis ANSES du 27 mars 2020 sur les risques liés à l'épandage des boues durant l'épidémie de Covid 19, une instruction ministérielle a été adressée aux préfets le 2 avril 2020 par la DGALN et le DGAL prévoyant notamment l'interdiction d'épandage de boues non hygiénisées. Un arrêté du 20 avril 2020 est venu confirmer ces nouvelles exigences.

La pratique de déshydratation et d'hygiénisation des boues n'étant pas si fréquente notamment au sein des petites collectivités, certains exploitants de stations d'épuration se sont organisés pour transférer leurs boues vers d'autres stations d'épuration pratiquant l'hygiénisation ou ont fait appel à des unités de déshydratation mobiles avant compostage ou chaulage. Ces pratiques d'urgence sont onéreuses. Il est donc impérieux d'envisager des pratiques plus adaptées au contexte local. D'autant plus que l'Avis de l'Anses du 27 mars 2020 a été conduit en fonction de l'état des connaissances disponibles, qui restaient très limitées et en conséquence, c'est donc le principe de précaution qui s'est appliqué.

Sur la base de certaines recommandations de l'avis Anses du 27 mars 2020, une étude nationale a été construite avec les parties prenantes de cette filière afin de pouvoir estimer dans différentes configurations les taux d'abattement du SARS-CoV-2 de manière indirecte dans les stations de traitement des eaux usées ne pratiquant pas l'hygiénisation de leurs boues.

Ce rapport présente :

- 1) le cadre général de gouvernance de cette étude,
- 2) les deux approches complémentaires à l'hygiénisation :
 - A. Etude de la cinétique d'élimination des bactériophages dans les boues liquides de STEU en laboratoire pour définir des conditions de stockage pour obtenir 4 unités logarithmiques d'abattement.
 - B. Etude de l'abattement moyen en bactériophages au cours des processus de stockage des boues *in situ* qui ont été ont mises en œuvre tout en argumentant des choix techniques qui ont été décidés et appliqués,
- 3) les résultats, discutés, obtenus par ces 2 approches.

Ce rapport amène des éléments de précisions en réponse à la note d'appui scientifique de l'Anses du 19 juin 2020.

1.1 GOUVERNANCE

Pour coordonner cette étude, un COPIL a été instauré sous la coordination du MTES.

Membres du COPIL :

- Laure SOULIAC (MTES, DEB)
- Lucile MARSOLLIER (MTES, DEB)
- Emmanuel MORICE (MTES, DEB)
- Christophe VENTURINI (MTES, DEB)
- Denis SNIDARO (FP2E - SUEZ)
- Laurent BRUNET (FP2E - SUEZ)
- Régis TAISNE (FNCCR)
- Valéry ESTIER (FNCCR)
- Laure SEMBLAT (FNCCR)
- Sophie RAPENNE (Grand Besançon)
- Christophe GANTZER (Université Lorraine/CNRS)
- Nathalie GUIGUES (LNE)
- Sophie LARDY-FONTAN (LNE)

Rôles et responsabilités :

Tableau 1 : Gouvernance du projet

| PARTIES PRENANTES | RESPONSABILITES |
|-----------------------------|---|
| DEB | <ul style="list-style-type: none"> - Pilotage - Constitution du COPIL |
| LNE | <ul style="list-style-type: none"> - Coordination technique de l'étude - Cadrage technique : établissement de recommandations pour l'ensemble des opérateurs de la chaîne de mesure, du prélèvement à l'analyse - Sélection du laboratoire analyse - Collecte, interprétation et restitution des données de l'étude |
| Université de Lorraine/CNRS | <ul style="list-style-type: none"> - Expert portant appui au LNE |
| FNCCR | <ul style="list-style-type: none"> - Sélection des stations - Coordination des campagnes d'échantillonnage - Collecte des informations sur les filières et stations sélectionnées |
| FP2E | <ul style="list-style-type: none"> - Sélection des stations - Coordination des campagnes d'échantillonnage - Collecte des informations sur les filières et stations sélectionnées |

Calendrier :

Le COPIL s'est réuni en plénière 7 fois entre le 15 avril 2020 et le 1^{er} septembre 2020 (Tableau 2).

Tableau 2 : Réunions du COPIL

| Date des réunions plénières | Objet de la réunion |
|-----------------------------|--|
| 15 avril 2020 | Présentation de la problématique de l'épandage des boues |
| 21 avril 2020 | Présentation de la 1 ^{ère} version du protocole d'étude |
| 30 avril 2020 | Présentation de la 2 ^{ème} version du protocole de l'étude + restitution des réunions sur les capacités analytiques des laboratoires sollicités |
| 12 mai 2020 | Présentation de la 3 ^{ème} version du protocole de l'étude ⇒ Protocole d'étude validé et lancement de l'étude |
| 5 juin 2020 | Etat d'avancement de l'étude |
| 3 juillet 2020 | Présentation des résultats à date et discussion sur le retour SAISINE ANSES SA068 |
| 1 septembre 2020 | Discussion et validation du rapport envoyé à l'Anses |

En parallèle, des réunions en comité restreint ont été organisées entre les différents membres du COPIL.

1.2 JUSTIFICATION DE L'UTILISATION DES BACTERIOPHAGES COMME INDICATEURS

1.2.1 Méthodes directes de recherche et de dénombrement du SARS-CoV-2 : principes, limites et capacité des laboratoires

Il existe deux principes de mesures directes du SARS-CoV-2 : la RT-PCR (RetroTranscription-Polymerase Chain Reaction) et la culture cellulaire. Le Tableau 3 présente les principes, avantages et limites de ces techniques.

Tableau 3 : Principes, avantages et limites des méthodes directes de recherche et de dénombrement du SARS-CoV-2

| | RT-PCR (temps réel) | Culture cellulaire |
|-------------------------|---|--|
| Principe général | Après extraction et purification du génome viral contenu dans un échantillon, la technique de PCR permet d'amplifier une séquence d'ADN spécifique du SARS-CoV-2 en plusieurs millions d'exemplaires. Cette méthodologie consiste à polymériser de façon répétée à l'aide d'une enzyme thermostable, le brin complémentaire d'un fragment d'ADN. Avant l'étape de PCR, il est nécessaire de réaliser la transformation de l'ARN viral en ADNc (ADN complémentaire) à l'aide d'une enzyme de rétrotranscription et d'une amorce anti-sens. Le principe de la quantification repose sur une émission de fluorescence proportionnelle à la quantité de génome produite pendant la réaction qui permet de déduire la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon. L'approche permet de mesurer un niveau de contamination du génome viral qu'il soit libre ou encapsidé | Elle est basée sur la multiplication virale sur des cellules sensibles. Un inoculum obtenu à partir d'un échantillon environnemental est mis en contact avec un tapis de cellules sensibles à l'infection et maintenues en culture dans un milieu nutritif approprié avant de subir une étape de dénombrement. |
| Avantages | Méthode sensible et spécifique Rapide (4h) | C'est la méthode de référence pour établir le caractère infectieux des virus et évaluer l'efficacité des traitements. Permet de statuer sur la présence de particules virales infectieuses |
| Limites | Phénomènes d'interférences induisant des effets d'inhibition. Pas de normes ou méthodes de référence disponibles. Faible volume analysé qui augmente la limite de détection et peut diminuer la représentativité de l'échantillon. Ne permet pas de statuer sur la présence de particules virales infectieuses et ne permet donc pas d'évaluer l'efficacité d'un traitement. | Complexe à mettre en œuvre. La plupart des protocoles d'extraction des virus de la matrice boue sont adaptés aux virus nus et non aux virus enveloppés. Pas de normes ou méthodes de référence disponibles |

En avril 2020, le Laboratoire d'Hydrologie de Nancy a adressé un questionnaire aux 143 laboratoires disposant d'un agrément du ministère de la santé et/ou du ministère de l'environnement afin d'établir un état des lieux des capacités analytiques des laboratoires (Mesures directes et indirectes) concernant le SARS-CoV-2 dans les matrices résiduelles. Cette enquête montre qu' «Aucun laboratoire ne déclare être en mesure de réaliser des analyses par culture cellulaire de SARS-CoV-2 à partir d'échantillons résiduelles. A noter que 3 laboratoires possèdent une accréditation dans le domaine du contrôle des matrices résiduelles, des fertilisants, support de culture ainsi qu'une accréditation en portée flexible pour la détection/quantification de génome viral par RT-PCR. L'un d'eux propose déjà des **analyses qualitatives** de génome de SARS-CoV-2 dans les boues, les deux autres souhaitent développer ces prestations sur matrices résiduelles.»

Dans une publication scientifique de Kitajima et al. (2020), il est rappelé que de nombreux travaux scientifiques ont démontré que les méthodes classiques de concentration de virus dans les matrices de type boues sont inefficaces pour récupérer des virus enveloppés- tel que le SARS-CoV-2, à partir de ce type d'échantillons. En outre, les auteurs concluent : « S'il est difficile de déterminer les valeurs de réduction log₁₀ du SARS-CoV-2 lui-même en raison de la disponibilité du virus et / ou des restrictions de biosécurité, des modèles de

virus enveloppés tels que les CoV humains, le MHV ou le phage Pseudomonas $\Phi 6$ peuvent être utilisés pour des expériences en laboratoire ou des études pilotes à grande échelle » et que

« Actuellement, les tests RT-qPCR développés pour les tests cliniques sont utilisés pour la détection d'ARN du SARS-CoV-2 dans des échantillons environnementaux. Des études environnementales récentes ont indiqué que différents tests pouvaient produire des résultats contradictoires (Ahmed et al., 2020; Medema et al., 2020). De plus, les taux de faux négatifs (dus à des amorces / sondes mal conçues ou à une mutation virale dans la région du génome ciblée) de ces tests doivent être évalués par plusieurs laboratoires. Pour une application environnementale, la sensibilité de ces méthodes RT-qPCR doit être évaluée. La principale limitation de la qPCR est qu'elle ne fournit pas d'informations sur la viabilité. Un protocole normalisé pour récupérer et détecter le SARS-CoV-2 à partir d'échantillons de l'environnement, y compris la méthode de concentration, l'analyse PCR et les contrôles de processus, devrait être établi. »

Il n'existe au moment de lancement de cette étude (ni à la date de rédaction de ce rapport) aucune méthode quantitative reconnue disponible pour l'analyse de SARS-CoV-2 dans les boues que ce soit par RT-PCR ou cultures cellulaires. En considérant le besoin de qualité des données et de nécessité de faire référence au caractère infectieux des virus pour répondre à la question de l'épandage de boues non hygiénisées, le COPIL a par conséquent décidé de suivre les recommandations de l'avis Anses du 27 mars 2020 en ciblant certains bactériophages fécaux plus résistants que les coronavirus et pour

1.2.2 Intérêt des bactériophages comme indicateurs

Les bactériophages (ou phages) sont des virus bactériens. Trois catégories de bactériophages fécaux ont été proposées en tant qu'indicateurs alternatifs de pollution fécale d'origine virale dans le milieu hydrique : il s'agit des coliphages somatiques, des bactériophages à ARN F-spécifiques et des phages de *Bacteroides fragilis*. Seuls les deux premiers ont été considérés pour cette étude.

Les bactériophages ARN F-spécifiques appartiennent à la famille des *Leviviridae* regroupant plusieurs génogroupes. Ils ne possèdent pas d'enveloppe et sont constitués uniquement d'une capsid de nature protéique à l'intérieur de laquelle se trouve un acide nucléique (ARN) qui est le support de l'information génétique. Ces virus de 20-30 nm de diamètre font partie des virus les plus petits connus à l'heure actuelle. Ils infectent certaines entérobactéries par l'intermédiaire de leurs pili sexuels (F pili). Ces bactériophages sont utilisés comme modèles car ils présentent des tailles proches de celles de virus nus tels que le poliovirus ou le virus de l'hépatite A.

Les coliphages somatiques appartiennent à quatre familles différentes : *Myoviridae*, *Siphoviridae*, *Podoviridae* et *Microviridae*. Ils sont définis par leur capacité à infecter les entérobactéries par l'intermédiaire d'un récepteur situé au niveau de leur paroi. Ce sont des virus nus. La plupart des coliphages somatiques possèdent un génome à ADN et possèdent souvent une structure tête-queue. Ils représentent donc un groupe très hétérogène de virus en termes de structure (Ackermann, 2009).

Sur la base des constats de la partie 1.2.1 et en cohérence avec les recommandations de la saisine ANSES (Saisine n° 2020-SA-0043) reprises ci-après « Le dénombrement des bactériophages permet une évaluation rapide (24 h) de l'effet hygiénisant des traitements ». Les deux types de bactériophages sont parfaitement complémentaires pour suivre l'efficacité d'un traitement puisque les coliphages somatiques sont par exemple plus résistants que les phages ARN F-spécifiques à l'impact de la chaleur et du pH alcalin alors que c'est l'inverse pour les traitements de désinfection par les UV ou les traitements physiques (filtration des eaux, adsorption). La revue de la littérature de Jofre *et al.* (2016) conclut à rechercher les deux types de phages pour évaluer un traitement.

Le suivi du niveau d'abattement des formes infectieuses (et pas seulement du génome) de ces indicateurs viraux d'efficacité de traitement, permet de supposer un abattement supérieur en SARS-CoV-2 (virus enveloppé). Au moins un des deux types de bactériophages est toujours au moins aussi résistant que les virus nus pathogènes. A leur tour, les virus nus sont plus résistants que les virus enveloppés. Ces données ont été synthétisées dans la saisine de l'ANSES (Saisine n° 2020-SA-0043) pour la chaleur et le pH qui sont les deux paramètres majeurs de l'inactivation virale dans les boues.

Ainsi, les bactériophages ARN F-spécifiques et les coliphages somatiques sont considérés comme des indicateurs pertinents pour évaluer l'efficacité des traitements appliqués à des eaux résiduaires ou à des boues vis-à-vis du SARS-CoV-2 », le COPIL a donc décidé de conduire l'étude sur ces deux types de bactériophages.

Le tableau ci-dessous reprend les caractéristiques d'intérêt qui ont été considérées pour choisir les deux familles de bactériophages de l'étude. Les bactériophages ARN F- spécifiques et coliphages somatiques présentent des profils de résistance au pH et thermiques différents. L'analyse de ces deux types de bactériophages permettra d'obtenir des résultats plus robustes.

Tableau 4 : Caractéristiques d'intérêt qui ont été retenues pour choisir les deux familles de bactériophages : Coliphages Somatiques et Bactériophages ARN-F (d'après Lucena et al)

| | Coliphages Somatiques | Bactériophages ARN F |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Abondance dans les boues | +++ | ++ |
| Méthodes normalisées | +++ | +++ |
| Faisabilité de la détection | +++ | ++ |
| Temps d'obtention des résultats | 4h-6h | 8h-12h |
| Résistance à la chaleur | +++ | ++ |
| Résistance à des pH élevés | +++ | ++ |

Légende : ++ : moyenne ; +++ : bonne

Ainsi c'est sur cette base que cette étude a été construite pour que les exploitants et collectivités puissent suivre le taux d'abattement SARS-CoV-2 de manière indirecte dans les STEU ne pratiquant pas l'hygiénisation. Cette étude permet d'amener des éléments tangibles et robustes à l'ANSES afin d'ouvrir la possibilité pour les collectivités d'épandre des boues sans hygiénisation préalable.

Les choix qui ont été faits sont le reflet des connaissances disponibles lors du

2 MATERIELS ET METHODES

Cette partie présente les aspects méthodologiques communs à l'ensemble des deux études de ce projet. Les points spécifiques à certains volets seront détaillés dans les paragraphes ad hoc.

L'ensemble des analyses a été confié à un laboratoire unique¹ afin de ne pas introduire d'effets laboratoires dans l'étude.

2.1 METHODES D'ANALYSE DES BACTERIOPHAGES

Les protocoles mis en œuvre dans cette étude sont issus du projet **HORIZONTAL - HYG²** qui avait pour objectif de développer une norme d'analyse de phages dans les boues (Lucena et al, 2007). La méthode développée a été soumise à une comparaison interlaboratoires au niveau européen. Cette CIL a permis de démontrer sa transférabilité et d'obtenir des données de fidélité qui ont conduit à sa reconnaissance.

1 - Homogénéisation

Les échantillons sont homogénéisés au blender pendant 30s avant prélèvement d'une prise d'essai de $25 \pm 0,1g$ (poids humide) contrôlée gravimétriquement. Cette prise d'essai est ensuite transférée dans un contenant stérile hermétique d'un volume minimal de 500mL.

2 - Elution

Une solution tampon stérile est ajoutée jusqu'à atteindre un volume de 250mL. Un barreau aimanté stérile est ajouté et l'échantillon est agité pendant 15 à 20 minutes à température ambiante.

NOTE Pour les boues chaulées, ajuster le pH de l'échantillon ($7,2 \pm 0,5$) avec une solution d'acide chlorhydrique à 1 M. Si le pH descend en-dessous de 4,5, un nouvel échantillon doit être préparé.

3 - Clarification

L'échantillon est transféré dans un tube stérile et centrifugé à 4000g à une température de $4 \pm 2^\circ C$ pendant 30 min, le surnageant est récupéré.

4 - Décontamination

Le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue stérile et filtré à l'aide d'un filtre seringue avec une membrane polyethersulphone de taille de pores $0,2 \mu m$.

Le volume total à décontaminer dépend de la densité de bactériophages et donc du type de boues.

Le filtrat est récupéré dans un flacon stérile hermétique et transféré immédiatement à $5 \pm 3^\circ C$ jusqu'à l'énumération qui doit être réalisée dans les 12 h.

5 - Énumération et dénombrement des bactériophages

L'énumération et le dénombrement des bactériophages sont réalisés selon les normes françaises (NF) en vigueur. Les bactériophages ARN F-spécifiques et les coliphages somatiques sont analysés en suivant respectivement les principes de la norme NF EN ISO 10705-1 et de la norme NF EN ISO 10705-2.

¹ Le processus de sélection du laboratoire a fait l'objet d'un travail spécifique. Un cahier des charges techniques a été préparé et envoyé à deux laboratoires connus par le COPIL pour leur expérience dans l'analyse des bactériophages. Des entretiens individuels ont été réalisés et ont permis d'évaluer la qualité technique des réponses proposées par ces laboratoires. Ce travail a été présenté au COPIL qui a choisi le laboratoire. Ce laboratoire est Eurofins Expertise Microbiologique France qui est reconnu comme compétent pour réaliser des études large échelle (coordination et gestion de flux d'échantillons importants dans des conditions spécifiées exigeantes en termes de délai et de contrôle de température des enceintes frigorifiques) et également l'analyse de phages dans les eaux usées.

² HORIZONTAL STANDARDS ON HYGIENIC PARAMETERS FOR IMPLEMENTATION OF EU DIRECTIVES ON SLUDGE, SOIL AND TREATED BIO-WASTE SSPI-CT-2004- 513660

6 - Détermination du taux de matière sèche

Une analyse du taux de matière sèche est réalisée sur chaque échantillon selon les principes de la norme NF EN 12880. Ce taux de matière sèche est nécessaire pour calculer les concentrations en bactériophages en UFP / g de matière sèche.

7 - Expression des résultats

Les résultats sont exprimés par le laboratoire en UFP/g de matière brute (UFP : Unités Formant Plages).

Dans le cadre des interprétations de résultats réalisées dans ce rapport, les données sont corrigées des valeurs de matière sèche et transformées pour être exprimées sous forme de logarithme (Log 10) afin de permettre une comparaison des données.

2.2 ASSURANCE QUALITE / CONTROLE QUALITE

Afin de fiabiliser les données de l'étude, des contrôles qualité ont été associés à chaque série d'analyses selon les recommandations des normes en vigueur. Les principes de la NF EN ISO 10705-3 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau ont été appliqués. Pour les bactériophages ARN-F-spécifiques :

- témoin négatif : krypton sel.
- témoin positif : une suspension de phage MS2 (dilution adaptée pour obtenir entre 30 et 300 phages par boîte) avec et sans RNase.

Pour les bactériophages somatiques :

- témoin négatif : tryptone sel.
- témoin positif : une suspension de phage Bactériophage Φ X174 (ATCC 13706-B1) (dilution adaptée).

L'ensemble des résultats de ces contrôles qualité ont été restitués (non présentés) et ont permis de qualifier les résultats des mesures sur les échantillons de l'étude en vue de leur exploitation.

2.3 PERFORMANCES DE LA METHODE

Les principes de la NF EN ISO 10705-3 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau ont été appliqués.

Une synthèse des performances obtenues sont résumées ci-après.

Limite de détection / limite de quantification :

Les limites de quantification et de détection sont les mêmes pour les bactériophages ARN-F-spécifiques et bactériophages somatiques et sont présentées ci-dessous (exprimées en g de matière brute MB).

| | Coliphages somatiques | Bactériophages ARN F |
|---------------------------------|-----------------------|----------------------|
| Limite de quantification | 40 UFP/g MB | 40 UFP/g MB |
| Limite de détection | 10 UFP/g MB | 10 UFP/g MB |

Rendements :

Les rendements par type de matrice et par type de phages sont présentés ci-dessous.

| Matrice | Coliphages somatiques | Bactériophages ARN F |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|
| Boues liquides | 56% | 85% |
| Boues déshydratées | 48% | 73% |
| Boues chaulées | 46% | 86% |

Incertitudes de mesures :

Les incertitudes relatives élargies (k=2) par type de matrice et par type de phage sont présentées ci-dessous.

| Matrice | Coliphages somatiques | Bactériophages ARN F |
|---------------------------|-----------------------|----------------------|
| Boues liquides | 18% | 22% |
| Boues déshydratées | 22% | 24% |
| Boues chaulées | 17% | 23% |

Il est à noter que les matrices ayant servi à la validation de la méthode d'analyse des bactériophages, incluant l'étape d'extraction dans les échantillons de boues sont caractérisées par des taux de matières sèches suivants :

| Matrice | Taux de matière sèche |
|---------------------------|-----------------------|
| Boues liquides | 0,4 – 2 % |
| Boues déshydratées | 77 – 92 % |
| Boues chaulées | 28 – 38 % |

Les performances de la méthode mise en œuvre sont satisfaisantes et compatibles avec les objectifs de cette étude. Il est à noter que ces dernières ont été déterminées sur des matrices représentatives des types d'échantillons faisant l'objet de cette étude. Enfin, les résultats des contrôles qualité (contrôles positifs et blancs ; données non présentées) soutiennent l'exploitabilité des données acquises sur les 3 mois de l'étude.

3 ETUDE CINETIQUE

L'objectif est d'étudier la cinétique d'abattement des bactériophages somatiques et des bactériophages ARN F-spécifiques dans le temps en fonction de conditions thermiques, dans des conditions contrôlées. Elle permettra également de consolider le deuxième volet du travail sur l'étude de filières de stockage des boues.

La réduction des agents pathogènes pendant le traitement secondaire peut être due à l'élimination physique ou à l'inactivation. Il a été universellement démontré que des températures plus élevées sont associées à une inactivation rapide des virus entériques, et la température est reconnue comme le facteur le plus influent pour la survie virale dans l'eau en raison de la dénaturation accrue des protéines et de l'activité des enzymes extracellulaires (Pinon et Vialette, 2018 d'après revue La Rosa et al., 2020). La bibliographie met en avant un spectre très hétérogène de conditions d'étude d'abattement que ce soit en température (de 5°C à plus de 70°C), milieu d'essai (de simples liquides stériles à des surfaces solides) (d'après Avis Anses 27 mars 2020). Il n'existe que de très rares références sur des matrices complexes comparables à celles mises en œuvre au sein du présent travail et leurs résultats ne sont donc pas directement utilisables pour répondre aux questions de cette étude.

3.1 CHOIX DE LA MATRICE D'ESSAI

Il est reconnu que la préparation de matériau par le dopage de suspension virale est extrêmement complexe à mettre en œuvre, peu reproductible et n'aboutit pas un échantillon représentatif des échantillons naturels. En effet, dans les boues, les virus sont présents soit sous forme libre ou adsorbés aux particules (Funderburg et al., 1985; Ketranakul et al., 1991; Armon and Kott, 1996; Araujo et al., 1997 cités par Lucela et al. 2007). Pour cette raison, le recours à une boue naturellement contaminée en phages a été privilégié. Le choix s'est porté sur des boues activées en aération prolongée qui est un procédé très largement mis en œuvre dans les STEU en France.

La STEU de Reims a été sélectionnée pour fournir les matériaux d'essai aux motifs de :

- Sa taille (470 000 EH) et le type de traitement de la filière eau (Boues activées faible charge) permettant de sécuriser une teneur importante en bactériophages du matériau d'essai soumis à l'étude de cinétique, avec un taux de matière sèche compris entre 0,5 % et 2 %, typique des boues liquides avant traitement et stockage,
- Sa proximité par rapport au site du laboratoire permettant ainsi un temps minimal de transport,
- L'accord de l'exploitant de s'impliquer dans ce travail.

3.2 CHOIX DE LA DUREE ET DES CONDITIONS THERMIQUES DE STOCKAGE

Conditions thermiques

Idéalement la température doit être testée dans des gammes de températures observées lors du traitement des boues au cours d'une année sur les STEU de plus de 2 000 EH tout en gardant une certaine représentativité. C'est-à-dire que les conditions appliquées ne soient pas spécifiques d'une filière de traitement/stockage des boues (ex boues mésophiles, plancher chauffant). A la suite d'échanges au sein du COPIL, il est apparu qu'il y avait une

faible connaissance des températures réellement rencontrées dans les différentes filières boues car ce paramètre ne fait a priori pas l'objet de suivi en continu. Initialement, trois conditions de températures avaient été envisagées : 5°C (conditions extrêmes minimales, conditions hivernales), 20°C (conditions médianes) et 35°C (conditions extrêmes chaudes, conditions estivales et DROM). Pour des contraintes techniques : difficultés de stocker pendant 3 mois des échantillons dans une enceinte contrôlée à 35°C, cette condition n'a finalement pas été retenue.

Deux conditions thermiques ont ainsi été définies : $5^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$ et $22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Conditions temporelles

A la suite d'échanges au sein du COPIL, il a été décidé de réaliser l'étude sur une période maximale de 3 mois. Cette période est représentative des périodes de stockage des boues avant épandage. Afin de pouvoir construire une courbe cinétique pour connaître l'abattement dans le temps, des pas de temps intermédiaires ont été définis : J0, J7, J14, J21, J28, J42, J56, J96 (Jfinal égal à 3 mois).

3.3 PROTOCOLE GENERAL D'ETUDE DE LA CINETIQUE D'ABATTEMENT

Pour répondre aux contraintes de cette étude, une approche chronologique, illustrée dans la figure ci-dessous, est mise en œuvre pour évaluer la cinétique de l'abattement des bactériophages, et disposer des résultats au fur et à mesure.

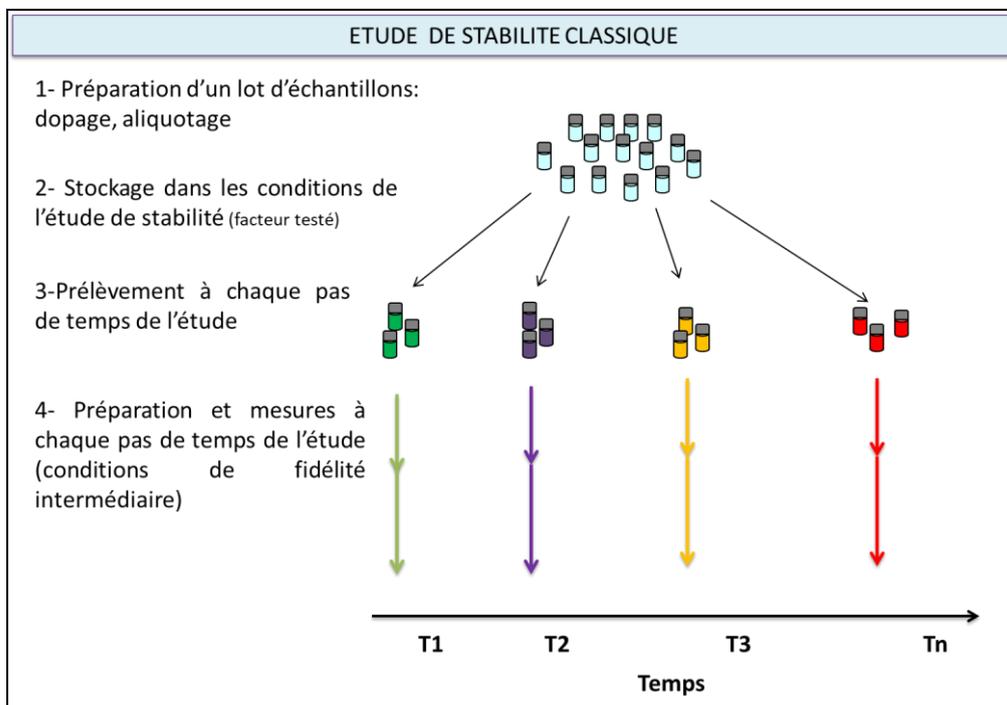


Figure 1 : Illustration schématique des principes d'une étude de stabilité chronologique

Ce travail est basé sur des travaux réalisés par AQUAREF (Lardy-Fontan et al. 2016) et repris dans le projet de norme ISO/TD 5667:25.

De manière générale, il est recommandé de séparer l'échantillon de boue brute en lots selon le nombre de conditions testées et le nombre de pas de temps de l'étude. Il est généralement préférable de ne pas prélever plusieurs fois dans le temps dans le même

flacon pour ne pas engendrer de biais (liées par exemple à des multiples ouvertures/fermetures du flaconnage, multiples étapes d'homogénéisation). Ces recommandations ont été mises en œuvre dans cette étude. De même, afin de recueillir des données plus robustes, à chaque pas de temps et pour chaque condition, des analyses de triplicats sont réalisées. Afin de rationaliser le nombre de flacons à préparer, les analyses de réplicats seront réalisées au sein d'un même flacon et non entre différents flacons, l'homogénéité intra et interflacons ayant été vérifiée à J0.

L'ensemble de l'étude a été réalisé en appliquant un principe de randomisation.

A J0 :

Objectifs :

- Caractérisation de la teneur en bactériophages ARN F-spécifiques et en coliphages somatiques.
- Caractérisation de l'homogénéité (intra et inter flacons) de l'échantillon indispensable pour pouvoir interpréter les résultats des études cinétiques
- ⇒ 3 flacons sélectionnés aléatoirement avec 3 prises d'essai par flacons. ~~Sur~~ un nombre total de 9 mesures pour chaque type de bactériophages.
- Caractérisation de la boue brute en matière sèche.
- ⇒ 1 détermination par flacon soit 3 analyses

Placer les différents flacons de boue dans les différentes conditions de températures (2).

A chaque pas de temps :

Sélectionner de manière aléatoire un flacon dans chaque condition de l'étude (température) et réaliser une analyse en triplicats pour chaque type de bactériophages et une analyse des matières sèches.

- ⇒ Pour un pas de temps soit un nombre total de 6 mesures pour chaque type de bactériophages et 2 mesures de matières sèches.

Que ce soit à J0 et pour tous les pas de temps de l'étude, le flacon est homogénéisé avant de procéder à toute prise d'essai.

Le tableau ci-dessous présente une synthèse du plan d'essais de l'étude cinétique.

Tableau 5 : Synthèse du protocole de l'étude cinétique

| | | | |
|------------|----------|---|--|
| | 25/05/20 | Prélèvement de 20 L de boues liquides – STEU de Reims (470 000 EH) | |
| J0 | 26/05/20 | Réception des 20L de boues liquides Homogénéisation et répartition des boues liquides dans 20 flacons 3 flacons, 3 prises d'échantillon par flacon pour analyses | |
| | | Condition de température : 5°C | Condition de température : 20°C |
| J7 | 02/06/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J14 | 09/06/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J21 | 16/06/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J28 | 23/06/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J42 | 07/07/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J56 | 21/07/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |
| J96 | 31/08/20 | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses | 1 flacon, 3 prises d'échantillon pour analyses |

3.4 RESULTATS

3.4.1 Etude de stabilité

Les résultats obtenus lors de l'étude cinétique sont présentés dans la Figure 2 pour les coliphages somatiques (à 5°C et 22°C) et dans la Figure 3 pour les ARN F-spécifiques. Les pointillés rouges représentent l'écart minimal par rapport à la valeur assignée du paramètre dans l'échantillon à J0, pouvant être attribué à de l'instabilité, de manière univoque. Cet écart prend en compte l'inhomogénéité du matériau d'essai et la variabilité intrinsèque de l'ensemble des résultats de mesure dans le temps. C'est sur la base de cette limite que se fait la première évaluation de la stabilité : une tendance significative est observée quand plusieurs points successifs se situent en dehors de la zone définie par les pointillés rouges.

Sur la base des illustrations présentées en Figure 2 et Figure 3, les éléments notables suivants peuvent être mis en avant :

- Les niveaux initiaux (J0) de concentrations en coliphages somatiques et en bactériophages ARN F-spécifiques et le taux de matière sèche mesurés dans la boue sélectionnée sont du même ordre de grandeur que ceux déterminés dans les boues liquides des stations d'épuration retenues dans l'étude de filières. Cette grande cohérence des résultats observés permet de conclure d'une part en la robustesse des méthodologies sélectionnées et mises en œuvre en laboratoire et d'autre part en la représentativité du matériau d'essai sélectionné.
- Tout au long de l'étude cinétique, le taux de matière sèche (<1% matières sèches) du matériau d'essai est resté stable (données présentées) quelle que soit la température de stockage (5°C, 22°C).
- Que ce soit pour les coliphages somatiques ou les bactériophages ARN F- spécifiques, les cinétiques montrent une tendance à la diminution plus forte à 22°C qu'à 5°C. Cette tendance étant nettement plus nuancée pour les coliphages somatiques. Cet élément confirme les hypothèses que la température est un élément critique de la stabilité des bactériophages et par extrapolation un élément clé à considérer pour l'étude des filières
- Pour les coliphages somatiques : à 5°C il faut attendre J96 pour observer une première tendance à la décroissance. J96 étant le dernier point de l'étude, il n'est cependant pas possible de conclure. A 22°C, une première étape de décroissance est observée dès J28 avec l'atteinte d'un plateau et une seconde phase entre J56 et 96. Là encore cette deuxième phase ne peut être confirmée en l'absence de point supplémentaire (post J96).
- Pour les bactériophages ARN F-spécifiques : aucune diminution significative n'est observée à 5 °C. Au contraire, à 22°C, très rapidement une décroissance du niveau de concentrations est observée, qui est en-dessous des seuils de performances de la méthode dès J42.
- Ces données sont cohérentes avec les hypothèses initiales de ce travail avec une stabilité des coliphages somatiques supérieure à celle des bactériophages ARN F- spécifiques vis-à-vis de la chaleur.

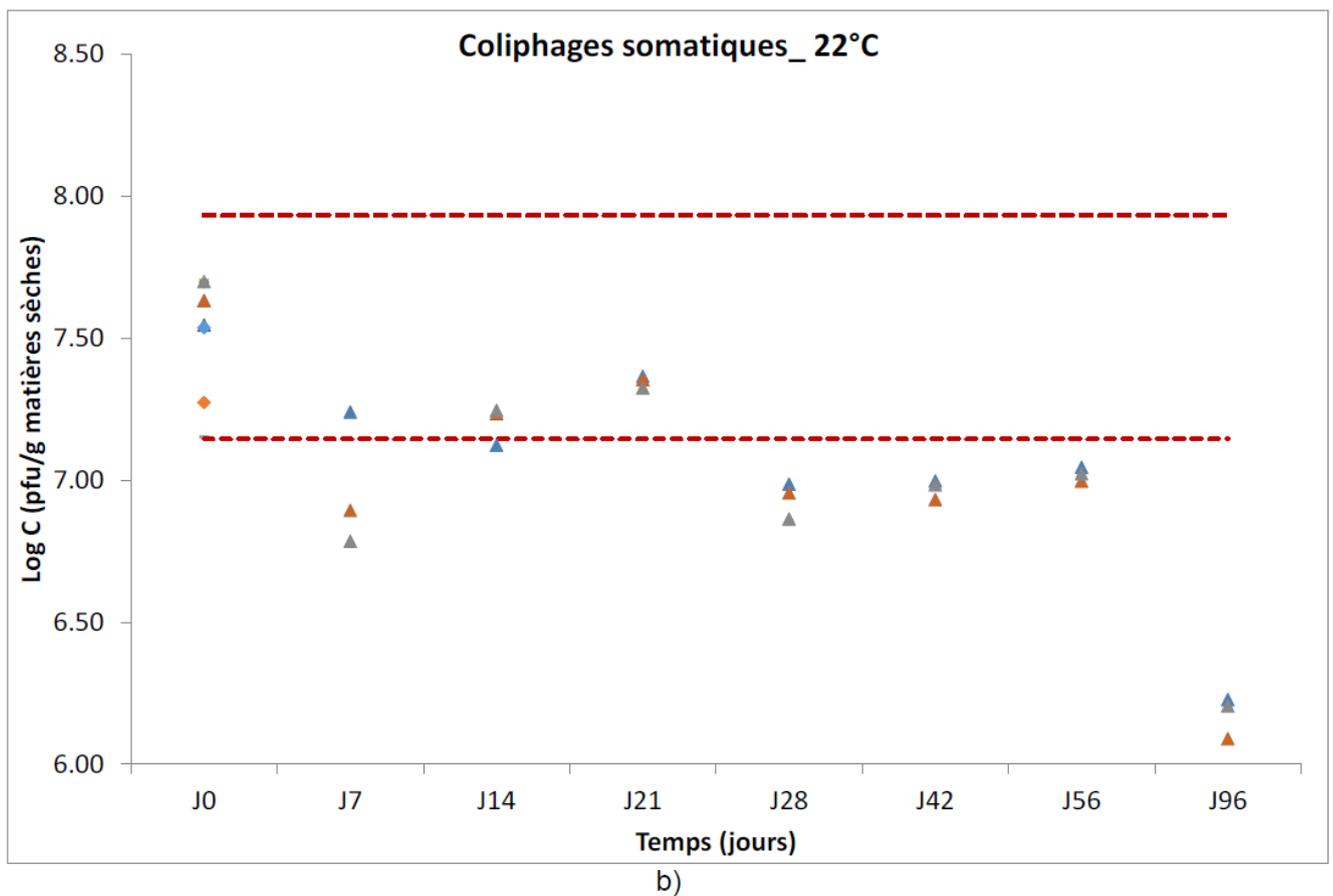
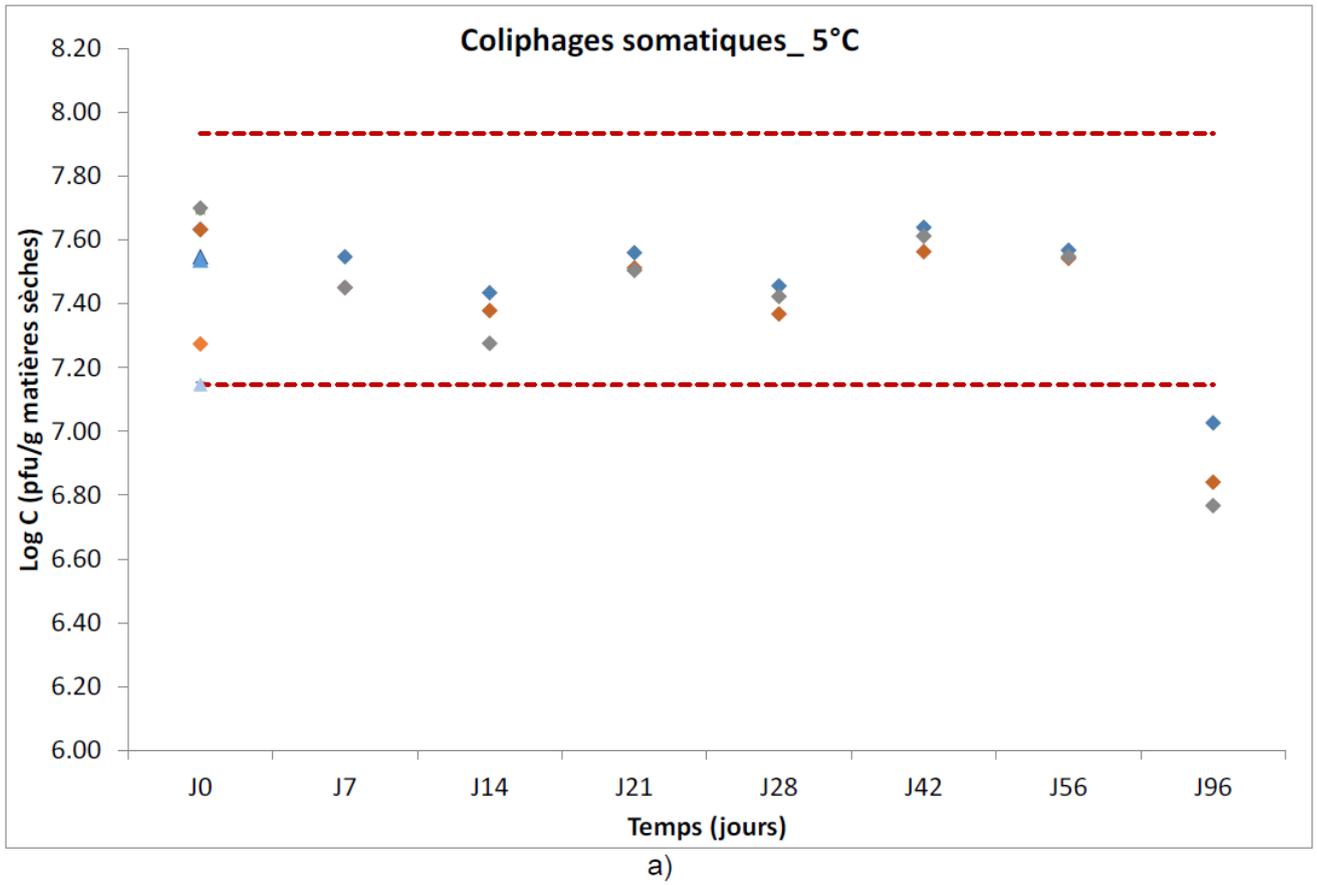
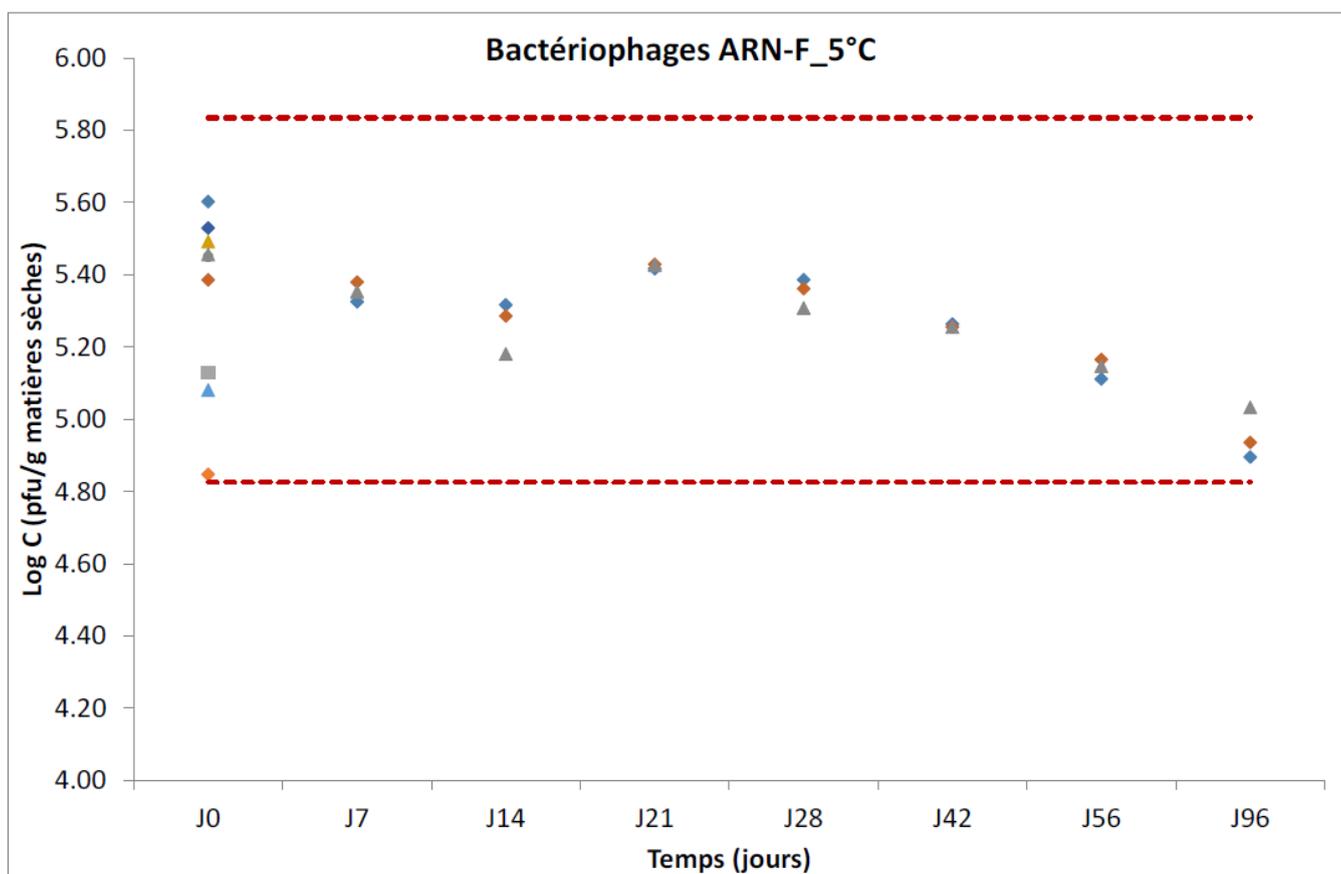
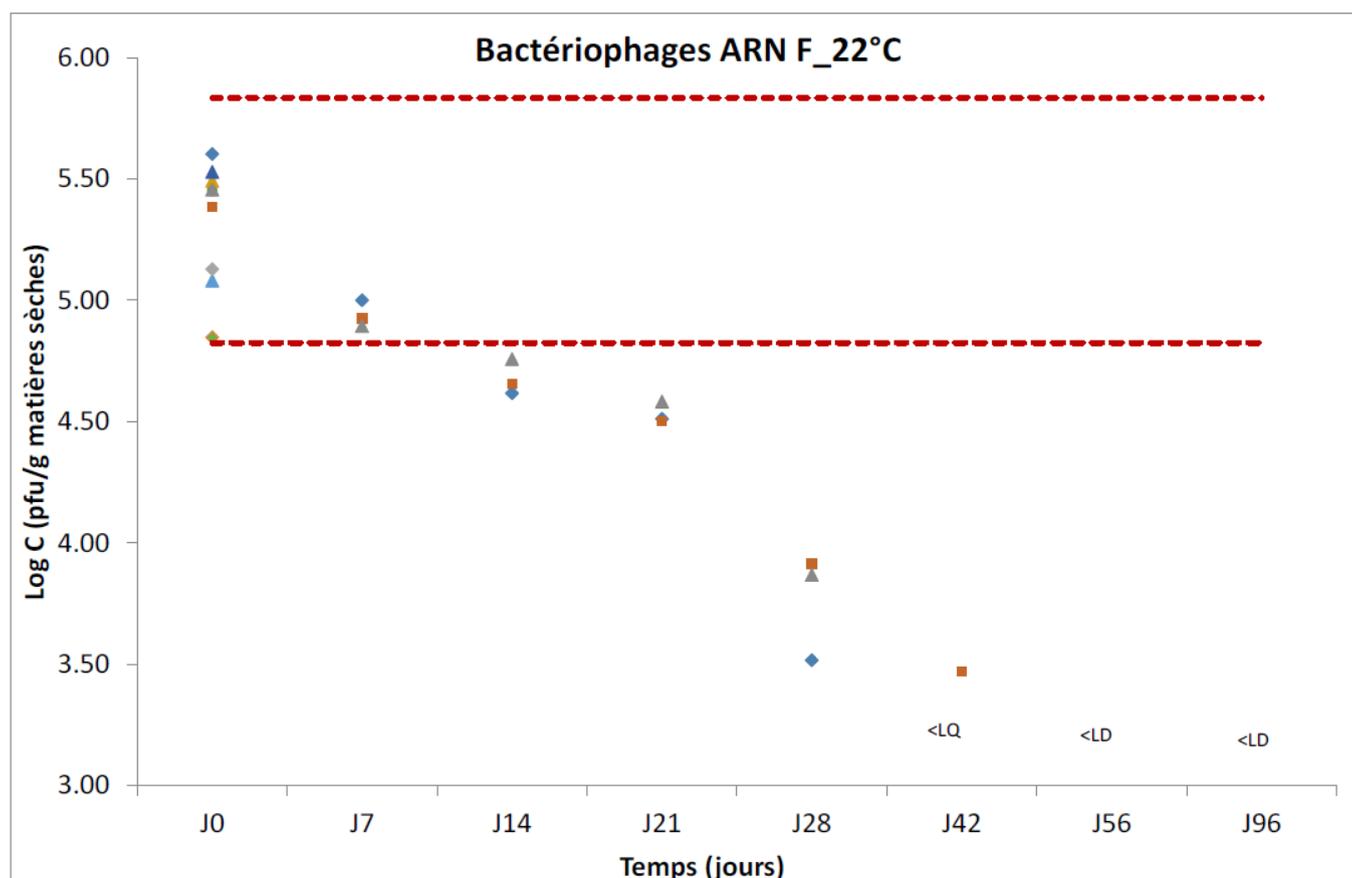


Figure 2 : Evolution des concentrations (log (pfu/g matières sèches)) en coliphages somatiques au cours du temps dans des conditions de stockage spécifiées a) à 5°C et b) 22°C



a)



b)

Figure 3 : Evolution des concentrations (log (pfu/g matières sèches)) en bactériophages ARN F-spécifiques au cours du temps dans des conditions de stockage spécifiées a) à 5°C et b) 22°C

3.4.1 Evaluation de l'abattement

Sur la base des données cinétiques présentées en paragraphe 3.4.1, les taux d'abattement ont été estimés à chaque pas de temps de l'étude (Figure 4). Les taux d'abattement sont faibles et voisins de 1 Log, y compris après 3 mois de stockage. Les tendances qui semblent émerger à J96 mériteraient d'être confirmées par une étude cinétique plus longue. Ces données sont cohérentes avec le taux de matière sèche stable observée au cours de l'étude.

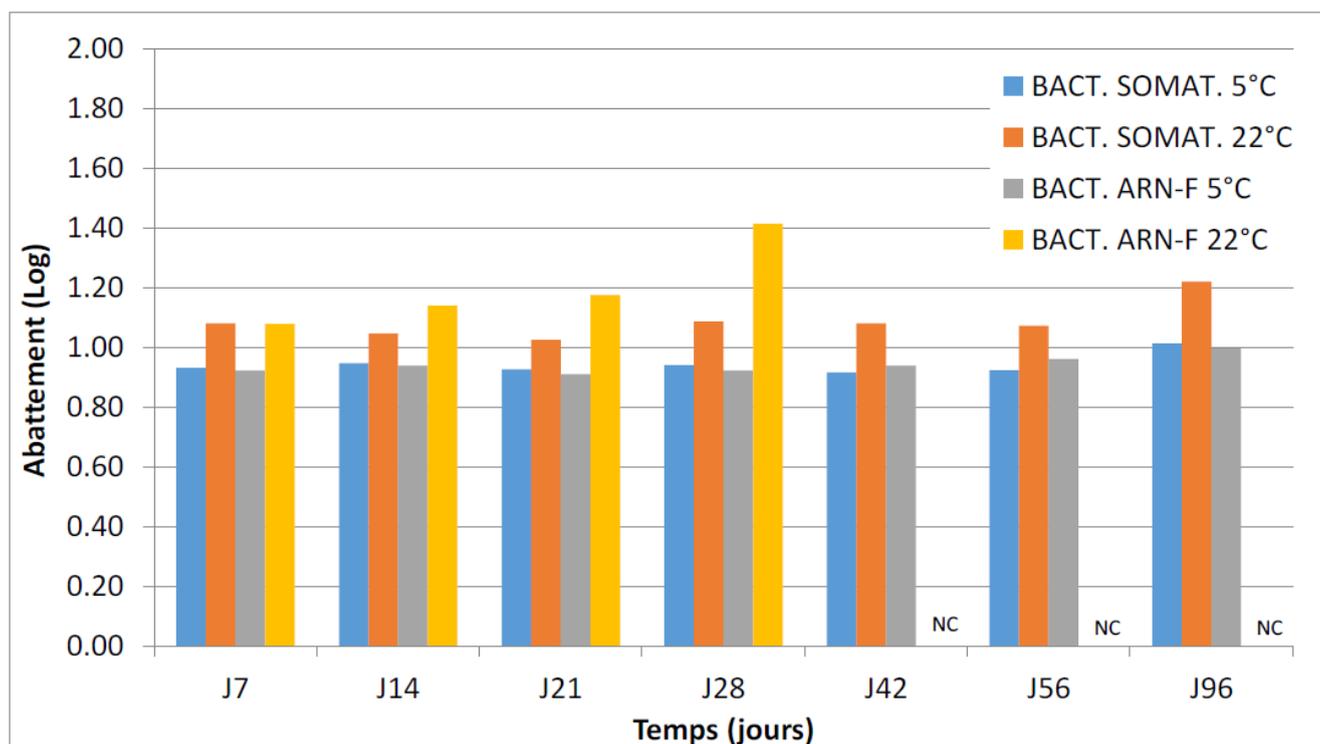


Figure 4 : Estimation de l'abattement en coliphages somatiques et ARN F-spécifiques au cours du temps dans des conditions de températures contrastées (5°C, 22°C)

NC : abattement non calculé car les données mesurées sont < au seuil de détermination de la méthode

Pour conclure l'ensemble des résultats observés au travers de cette étude permet d'amener des éléments expérimentaux objectifs étayant les hypothèses initiales de l'étude des filières et utiles pour leur interprétation.

4 ETUDE DE L'ABATTEMENT DES BACTERIOPHAGES DANS LES BOUES DE STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

Une étude en conditions réelles a été réalisée pour évaluer le taux d'abattement des bactériophages ARN F-spécifiques et des coliphages somatiques sur les boues brutes avant et après stockage sur une sélection de station de traitement des eaux usées (STEU) utilisant des procédés de traitements des boues différents.

4.1 SELECTION DES STATIONS DE TRAITEMENT DES EAUX USEES

La sélection des stations participantes doit être la plus représentative possible des différentes situations et contextes de stockage des boues liquides existants sur le territoire national.

Les critères considérés pour sélectionner les STEU sont :

- Taille de la station en équivalent-habitant EH (très petites, petites, moyennes et grandes stations)
- Répartition géographique sur le territoire métropolitain
- Type de traitement des boues.

La sélection des stations a été réalisée conjointement par la FP2E et la FNCCR qui ont sollicité les exploitants de stations pour participer à cette étude sur la base du volontariat. 42 STEU ont participé à cette étude (Tableau 6).

Tableau 6 : Liste des STEU ayant participé à l'étude (nom, département, taille en EH, type de traitement de boues – voir § 4.3 pour la description des traitements et stockages de boues

| Nom de la STEU | Département | Taille (EH) | Procédé de traitement |
|---------------------------------|-------------|-------------|---|
| Laon | 02 | 40 000 | Boues chaulées après déshydratation par filtre-presse |
| Les Martres de Veyre | 63 | 32 600 | Boues chaulées filtre-presse |
| Pons | 17 | 9 800 | Boues chaulées filtre-presse |
| Saint-Dizier | 52 | 50 000 | Boues chaulées filtre-presse |
| Schwindratzheim | 67 | 12 000 | Boues chaulées filtre-presse |
| Dreux | 28 | 86 667 | Boues chaulées post-chaulage |
| Fécamp | 76 | 40 000 | Boues chaulées post-chaulage |
| Isles sur Suipe | 51 | 12 000 | Boues chaulées post-chaulage |
| Sin le Noble | 59 | 23 000 | Boues chaulées post-chaulage |
| Audeux | 25 | 500 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Cintré | 35 | 1 500 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Crèche | 71 | 19 000 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| CT Evron / Ste Gemmes le Robert | 53 | 800 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Mamirolle | 25 | 3 000 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Saint Anne sur Brivet | 44 | 36 250 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Saint Genis de Saintonge | 17 | 1 300 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Savigny | 69 | 2 200 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Val Saint Germain | 91 | 3 000 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| Valmont | 76 | 4 000 | Boues liquides avec stockage non aéré |
| St-Lisier | 09 | 41 000 | Centrifugation et stockage en benne |
| Cholet | 49 | 116 000 | Digestion anaérobie mésophile |
| Les Mureaux | 78 | 120 500 | Digestion anaérobie mésophile |
| Port-Douvot | 25 | 188 000 | Digestion anaérobie mésophile |
| Chevanceaux | 17 | 1 100 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Devecey-Bonnay | 25 | 4 667 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Le Verdon | 33 | 5 000 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Marchaux | 25 | 2 500 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Romillé | 35 | 2 500 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Torcé Viviers en Charnie | 53 | 700 | Filtre planté de roseaux (rhizocompostage) |
| Espondeilhan | 34 | 1 800 | Filtre planté de roseaux (rhizofiltration) |
| Francheleins Champ les Vignes | 01 | 1 000 | Filtre planté de roseaux (rhizofiltration) |
| Houdancourt | 60 | 600 | Filtre planté de roseaux (rhizofiltration) |
| Lude-Mailly | 51 | 2 500 | Lit de séchage |
| Trépail | 51 | 800 | Lit de séchage |
| Verzy | 51 | 1 500 | Lit de séchage |
| Chartres | 28 | 160 000 | Serre solaire avec plancher chauffant |
| Evron - Cepur | 53 | 16 500 | Serre avec plancher chauffant |
| Laillé | 35 | 5 500 | Serre avec plancher chauffant |
| Aups | 83 | 5 500 | Serre solaire |
| Brenouille /Pont Sainte Maxence | 60 | 40 000 | Serre solaire |
| Gemozac | 17 | 2 200 | Serre solaire |
| Névez | 29 | 5 000 | Serre solaire |

La répartition des STEU en fonction de leur taille (nombre d'équivalent-habitant) est présentée dans la Figure 5. La moitié des STEU présentent une taille de moins de 5 000 EH.

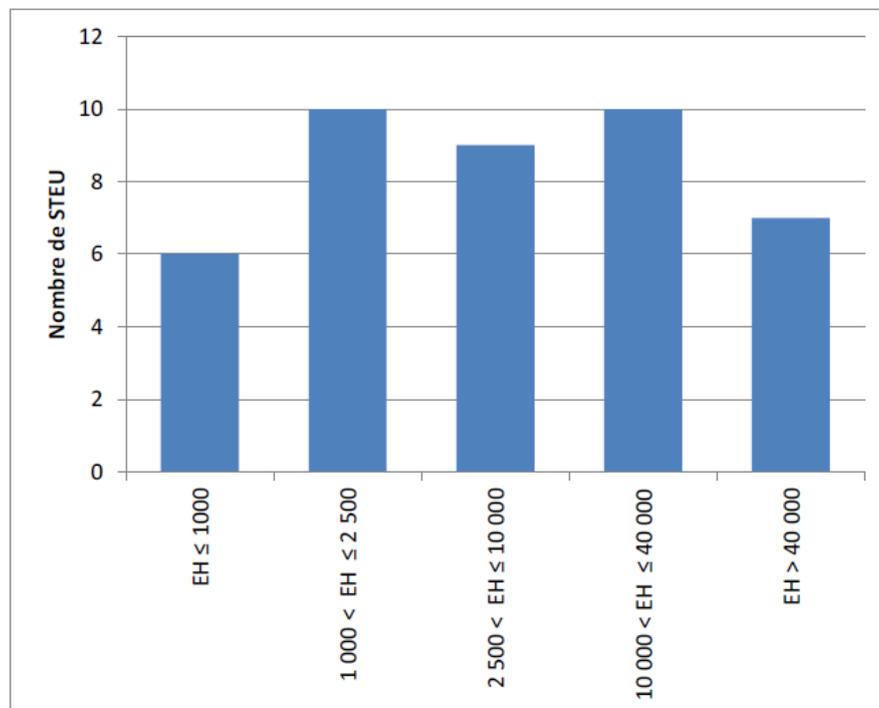


Figure 5 : Répartition des STEU en fonction de leur taille, exprimée en équivalent-habitant (EH)

La répartition géographique des STEU a été réalisée est illustrée en Figure 6. L'ensemble des 12 régions de la métropole est représenté, assurant ainsi une couverture nationale pour l'étude.

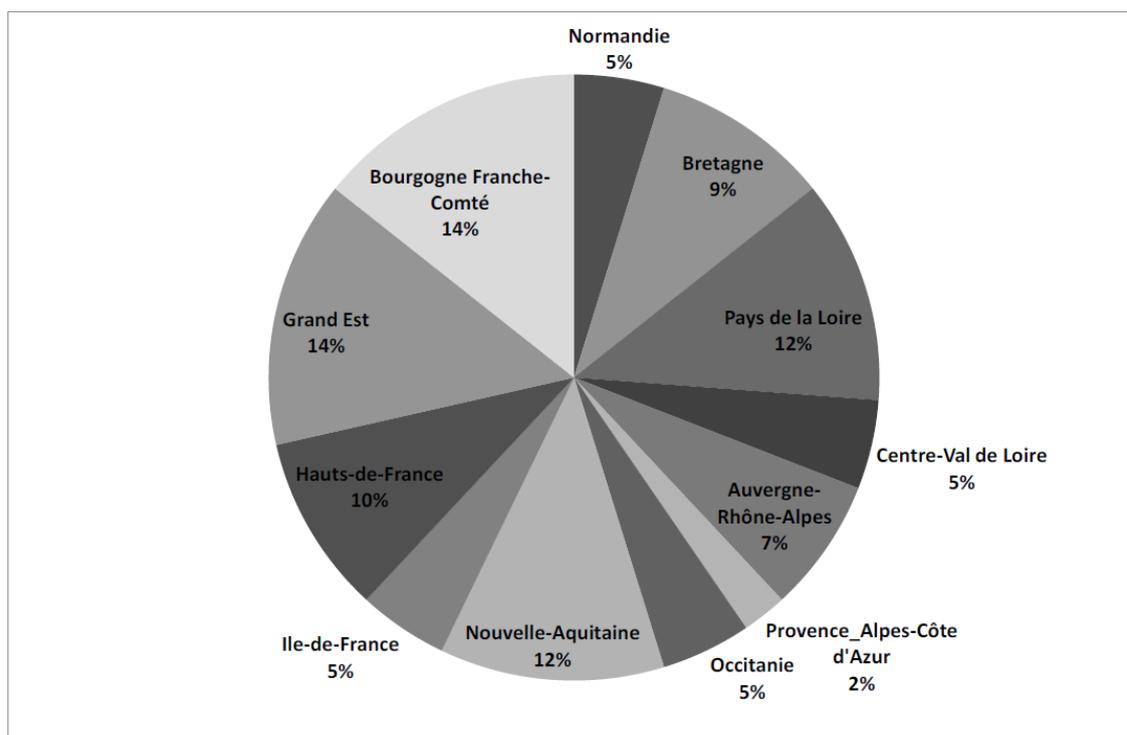


Figure 6 : Répartition des STEU en fonction de leur localisation géographique (Régions).

Afin d'avoir une bonne représentativité des types de traitement mis en œuvre pour les boues

issues des STEU, une variété de types et conditions de traitement a été considérée. Ainsi ont été sélectionnés dix types de stockage différents, comme le stockage non aéré de boues liquides, le chaulage des boues, les filtres plantés de roseaux, les serres, les lits de séchage et la digestion anaérobie mésophile.

La répartition des STEU en fonction des typologies de traitement se trouve dans le Tableau 7. Les quatre types de traitement les plus représentés sont :

- 1) le stockage de boues liquides en conditions non aérées (en silo)
- 2) les boues chaulées (filtre presse et post chaulage)
- 3) les filtres plantés de roseaux (rhizocompostage et rhizofiltration)
- 4) le séchage en serre (solaire ou avec plancher chauffant) avec entre 7 et 10 STEU pour chacun de ces types de stockage.

Seulement 3 STEU mettent en œuvre la digestion anaérobie mésophile et le lit de séchage, ce qui pourrait limiter l'interprétation sur ces deux filières.

| Type de traitement et de stockage | Nombre de STEU |
|--|----------------|
| Stockage non aéré de boues liquides | 10 |
| Centrifugation et stockage en benne | 1 |
| Boues chaulées | |
| - Filtre presse | 5 |
| - Post chaulage | 4 |
| Lit de séchage | 3 |
| Filtre planté de roseaux (FPR) | |
| - Rhizofiltration | 3 |
| - Rhizocompostage | 6 |
| Serre solaire | 4 |
| Serre avec plancher chauffant | 3 |
| Digestion anaérobie mésophile | 3 |

Tableau 7 : Répartition des STEU en fonction du type de stockage (voir § 4.3 pour la description des traitements et stockages de boues)

4.2 PRELEVEMENTS ET ANALYSES DE BOUES BRUTES ET STOCKEES

Prélèvements

Les prélèvements des boues brutes et des boues après traitement et stockage ont été réalisés par les exploitants des stations, conformément aux prescriptions de l'arrêté du 8 janvier 1998. Dans le cas des boues chaulées, des prélèvements de boues stockées à 2-3 semaines et à 3 mois ont été réalisés afin d'intégrer la diversité et l'âge des lots de boues stockées. Les boues des 42 STEU ont été prélevées entre le 25 mai 2020 et le 16 juillet 2020.

Prélèvement des boues liquides : les boues sont homogénéisées avant prélèvement entre trente minutes et deux heures. Les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de quatre séries de 5 prélèvements élémentaires de deux litres.

Prélèvement des boues solides (échantillonnage sur un lot) : les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de 25 prélèvements élémentaires uniformément répartis en différents points et différentes profondeurs du lot de boues destinées à être épanchées. Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une sonde en dehors de la croûte de surface et des zones où une accumulation d'eau s'est produite. Les prélèvements élémentaires sont mélangés dans un récipient ou sur une bêche et donnent, après réduction, un échantillon d'un kilogramme environ envoyé au laboratoire.

Analyses

Les analyses de bactériophages ARN F-spécifiques, coliphages somatiques et de matière sèche ont été réalisées par le laboratoire Eurofins Expertise Microbiologie France (voir §2

pour les protocoles mis en œuvre ainsi que les performances des méthodes d'extraction et analyse des bactériophages dans les boues).

Le laboratoire s'est chargé d'envoyer des flacons stérilisés et de gérer le transport en conditions réfrigérées ($5^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$) des échantillons prélevés. Un contrôle des échantillons à réception lors de l'enregistrement a été réalisé, en considérant les éléments suivants : intégrité des échantillons reçus, conformité de l'identification et nombre de flacons / sachets par rapport à la commande, délai entre l'échantillonnage et la réception, température de l'enceinte frigorifique. Par ailleurs, le délai entre l'échantillonnage et la mise en analyse par le laboratoire doit respecter un délai maximum de 72h.

4.3 TYPES ET CONDITIONS DE STOCKAGE DE BOUES

Pour chaque STEU participante, les conditions de stockage ainsi que l'historique du stockage ont été transmis.

4.3.1 Boues chaulées

Principe de la centrifugation et du post chaulage (Sources : Fiche Technique 4 – Seine et Marne ; Fiche Technique 5- Seine et Marne ; Conseil Général de la Dordogne, 2011)

La séparation est effectuée dans un rotor cylindro-conique horizontal contenant une vis convoyeuse qui tourne dans le même sens que le rotor mais à une vitesse légèrement supérieure. La différence de vitesse est appelée vitesse relative. La boue à traiter, additionnée de polymères, est introduite dans la machine. Sous l'action de la force centrifuge, les solides se déposent en couche sur les parois (bol). La vitesse relative de la vis convoyeuse fait progresser le produit décanté ou sédiment vers la sortie de la machine, alors que le liquide extrait des boues se collecte au centre de la machine pour être évacué (centrat).

Le chaulage est basé sur le malaxage de la boue avec de la chaux vive (chaux issue directement de la calcination du calcaire), stockée dans un silo dont la capacité est généralement supérieure à 20 m³. Il se produit une réaction chimique exothermique (dégageant de la chaleur) permettant l'obtention d'un produit hygiénisé (pH > 12) et solide (siccité supérieure à 30 %).

Station de Dreux (28, 86 667 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 25/05/20 11h15 | 27/05/20 9h46 | 28/05/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 25/05/20 11h20 | 27/05/20 9h46 | 28/05/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 25/05/20 11h25 | 27/05/20 9h46 | 28/05/20 |

Le traitement de la station de Dreux suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection de FeCl₃ ; 2) épaissement par flottation ; 3) Centrifugation et 4) post-chaulage.

Le taux de chaulage est de 24 % (chaux vive CaO/MS).

Station de Fécamp (76, 40 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 08/06/20 11h30 | 9/06/20 9h26 | 10/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 08/06/20 11h30 | 9/06/20 9h26 | 10/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 08/06/20 11h30 | 9/06/20 9h26 | 10/06/20 |

Le traitement de la station de Fécamp suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée (BRM) ; 2) épaissement gravitaire ; 3) centrifugation et 4) post-chaulage. Le taux de chaulage est de 30 % (chaux vive CaO/MS).

Station d'Isle sur Suipe (51, 12 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides | 17/06/20 9h30 | 18/06/20 8h30 | 19/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – lot récent | 17/06/20 12h | 18/06/20 8h30 | 19/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – lot ancien | 17/06/20 11h30 | 18/06/20 8h30 | 19/06/20 |

Le traitement de la station d'Isles sur Suipe suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection de FeCl₃ ; 2) épaissement par ajout de polymères sur une grille d'égouttage ; 3) coagulation par ajout de chlorure ferrique et floculation par ajout de lait de chaux 4) déshydratation sur filtre presse. Les boues sont stockées par lot en fonction de leur période de production. Le lot le plus ancien qui a été prélevé correspond aux boues produites entre le 18 mars et le 23 avril. Le lot le plus récent correspond à celles produites entre le 28 mai et le 16 juin. Les lots sont caractérisés par environ 5 000 à 10 000 m³ de boues produites.

Station de Sin le Noble (59, 23 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|---|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 15/06/20 10h30 | 16/06/20 9h47 | 17/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines (27-28 mai) | 15/06/20 10h30 | 16/06/20 9h47 | 17/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois (9 mars) | 15/06/20 10h30 | 16/06/20 9h47 | 17/06/20 |

Le traitement de la station de Sin le Noble suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection de FeCl₃ ; 2) Centrifugation et 3) post-chaulage.

Le taux de traitement en chaux vive est de 13%.

Principe du filtre presse (source Fiche Technique 4 – Seine et Marne)

Après un traitement préalable des boues (concentration sur table d'égouttage) avec ajout de différents réactifs (polymère, chlorure ferrique et lait de chaux), les boues sont pressées entre des plateaux dotés de toiles filtrantes, à une pression voisine de 15 bars. Ces filtres

peuvent être équipés de plateaux à membranes permettant d'augmenter le niveau de pressurisation avec deux objectifs principaux : réduction du temps de pressage et augmentation de la siccité du gâteau de 5 points. Le système fonctionne en discontinu et nécessite une présence humaine importante, tout particulièrement pour la phase de débâtissage. La boue produite présente une bonne qualité : produit solide et stabilisé, riche en chaux. La siccité moyenne attendue est supérieure à 30 %.

Station de Laon (02, 40 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 09/06/20 12h | 10/06/20 10h | 11/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 09/06/20 12h | 10/06/20 10h | 11/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 09/06/20 12h | 10/06/20 10h | 11/06/20 |

Le traitement de la station de Laon suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection de FeCl₃ ; 2) épaissement par flottation ; 3) Filtre-pressé avec conditionnement minéral.

Le taux de traitement de chaux éteinte est de 37% et celui de chlorure ferrique de 13%.

Station Les Martres de Veyre (63, 32 600 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 15/06/20 9h30 | 16/06/20 9h51 | 17/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 15/06/20 9h45 | 16/06/20 9h51 | 17/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 15/06/20 10h | 16/06/20 9h51 | 17/06/20 |

Le traitement de la station de Martres de Veyre suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) épaissement gravitaire ; 3) Filtre-pressé avec conditionnement minéral.

Le taux de traitement de chaux éteinte est de 45% et celui de chlorure ferrique de 25% (en solution commerciale à 200 g/L).

Station de Pons (17, 9 800 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|-------------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides | 03/06/20 10h | 04/06/20 14h44 | 08/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 12 jours (lot 2) | 03/06/20 10h15 | 04/06/20 14h44 | 08/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 35 jours (lot 1) | 03/06/20 10h30 | 04/06/20 14h44 | 08/06/20 |

Le début du stockage pour le lot 1 a démarré le 20 mars 2020, des apports par batch ont eu lieu jusqu'au 13 mai et l'âge moyen des boues est de 35 jours.

Le début du stockage pour le lot 2 a démarré le 19 mai 2020. L'âge moyen des boues est de 12 jours.

Station de Saint Dizier (52, 50 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|-------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues flottées | 25/05/20 13h45 | 27/05/20 13h | 28/05/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 25/05/20 14h | 27/05/20 13h | 28/05/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 25/05/20 14h | 27/05/20 13h | 28/05/20 |

Le traitement de la station de Saint Dizier suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) épaissement par flottation ; 3) Filtre-presse avec conditionnement minéral.

Station de Schwindratzheim (67, 12 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 03/06/20 | 04/06/20 10h05 | 04/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Zone de stockage – 3 semaines | 03/06/20 | 04/06/20 10h05 | 04/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Zone de stockage – 3 mois | 03/06/20 | 04/06/20 10h05 | 04/06/20 |

Le traitement de la station de Schwindratzheim suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore avec injection FeCl₃ ; 2) épaissement dynamique ; 3) Filtre-presse avec conditionnement minéral.

Le taux de traitement à la chaux est de 30% et celui de chlorure ferrique de 18%.

Une homogénéisation avant déshydratation est effectuée. Les boues sont stockées sous aire à boues couverte.

La quantité de boues brutes est de 286 T et la siccité est de 31%.

4.3.2 Stockage non aéré de boues liquides

Principe (source : fiche technique 3 - Seine et Marne)

Les filières « boues liquides » reposent sur une pré-concentration des boues avant leur transfert dans une unité de stockage. Il existe trois manières de concentrer les boues :

- Concentration directe dans l'ouvrage de stockage par le biais d'un drain, d'une jauge mobile ou d'une pompe immergée, solution non recommandée puisqu'elle manque d'efficacité et génère des problèmes sur la filière de traitement des eaux (retour de surnageants de mauvaise qualité).
- Concentration par le biais d'un épaisseur, petit silo en béton de quelques dizaines de m³, le temps de séjour des boues dans l'ouvrage ne dépassant pas 48 heures.
- Concentration à l'aide d'une table ou d'une grille d'égouttage, matériel placé sur le silo ou dans un local qui est constitué d'une toile ou d'une grille sur laquelle les boues, associées à un produit permettant la séparation de l'eau (le floculant), vont s'épaissir. La toile est lavée périodiquement pour éviter son colmatage, le nettoyage étant automatique.

Le stockage peut se présenter sous différentes formes :

- Silo de stockage en béton équipé obligatoirement d'un ou plusieurs agitateurs, la couverture de l'ouvrage étant conseillée (pas de dilution avec les eaux de pluie).
- Lagune de stockage rendue étanche par une géomembrane.
- Citerne souple, l'agitation étant assurée par une motopompe qui assure une circulation des boues.

Au regard des retours d'expériences, les deux dernières solutions ne sont pas conseillées.

Station d'Audeux (25, 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération | 8/06/20 9h30 | 9/06/20 9h36 | 10/06/20 |
| Boues stockées | Silo brassé et non aéré | 8/06/20 9h00 | 9/06/20 9h36 | 10/06/20 |

Le silo, qui dispose d'un système d'homogénéisation, est alimenté en boues brutes par batch de 5 m³ par semaine. Le début du stockage a commencé fin octobre 2019 (dernier épandage réalisé le 28/10/2010).

Station de Cintré (35, 1 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | bassin biologique | 17/06/20 | 18/06/20 14h18 | 19/06/20 |
| Boues stockées | Silo | 03/06/20 | 04/06/20 10h | 05/06/20 |

L'âge des boues du bassin biologique est de 30 jours (siccité de 20g/L).

Le stockage dans le silo, qui dispose d'un système d'homogénéisation, a repris en janvier 2020.

Le silo est alimenté en continu au rythme de 4 m³/j jusqu'à atteindre environ 380 à 400 m³. Une fois le seuil atteint, il est procédé à une exportation vers le procédé de traitement OVH à hauteur de 9,15 m³/j (moyenne constatée sur la dernière phase d'extraction) tout en continuant l'alimentation journalière à 4 m³/j, jusqu'à atteindre environ 130 m³.

Station de Crêche (71, 19 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 02/06/20 11h | 03/06/20 9h04 | 03/06/20 |
| Boues stockées | Silo | 02/06/20 11h | 03/06/20 9h04 | 03/06/20 |

Le traitement de la station Crêche suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection du phosphore ; 2) épaissement dynamique 3) stockage en silo boues liquides

Le début du stockage a démarré le 6 avril 2020. Le silo est alimenté en boues par batch, avec un cumul de boues stockées au 2 juin de 505 m³.

Station de Sainte Gemmes le Robert (53, 800 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Recirculation | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |
| Boues stockées | Silo | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |

Le silo, d'un volume de 115 m³ et non équipé d'un système d'homogénéisation, est alimenté avec apport de boues en continu. La dernière vidange a eu lieu le 20/03/20.

Station de Mamirolle (25, 3 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération | 15/06/20 10h | 16/06/20 9h43 | 17/06/20 |
| Boues stockées | Silo brassé et non aéré | 15/06/20 10h | 16/06/20 9h43 | 17/06/20 |

Le silo, qui dispose d'un système d'homogénéisation, est alimenté en boues brutes par batch de 20 m³ par batch. Entre le 19 mars et le 20 juin, 240 m³ de boues ont été stockées.

Station de Saint Anne sur Brivet (44, 36 350 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 24/06/20 11h | 25/06/20 10h12 | 26/06/20 |
| Boues stockées | Boues stockées 13 semaines | 24/06/20 11h | 25/06/20 10h12 | 26/06/20 |

Le silo est alimenté en boues en continu. Le début du stockage a démarré au printemps 2019.

Station de Saint Genis de Saintonge (17, 1 300 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--------------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides avant stockage | 9/06/20 10h | 10/06/20 10h12 | 11/06/20 |
| Boues stockées | Boues après stockage de 3 mois | 9/06/20 10h | 10/06/20 10h12 | 11/06/20 |

Le silo, d'un volume de 300 m³ et équipé d'un système d'homogénéisation, est alimenté par des boues en continu. Le début du stockage a commencé le 15 mars 2020.

Station de Savigny (69, 2 200 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 04/06/20 | 06/06/20 9h17 | 06/06/20 |
| Boues stockées | Silo | 04/06/20 | 06/06/20 9h17 | 06/06/20 |

Le traitement de la station de Savigny suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) épaissement dynamique ; 3) stockage en Silo des boues liquides
Le silo de 250 m³, est équipé d'un système d'homogénéisation et est alimenté en continu par des boues liquides. Le stockage a démarré en octobre 2019, et le 25 mai 2020 il contenait le 150 m³.

Station de Val Saint Germain (91, 3 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 10/06/20 | 11/06/20 9h40 | 12/06/20 |
| Boues stockées | Stockage après 36 semaines | 10/06/20 | 11/06/20 9h40 | 12/06/20 |

Le traitement de la station de Val Saint Germain suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) épaissement dynamique ; 3) stockage en silo des boues liquides Le silo est équipé d'un système d'homogénéisation. Le stockage a démarré début octobre 2019.

Station de Valmont (76, 4 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Recirculation | 02/06/20 | 04/06/20 9h26 | 04/06/20 |
| Boues stockées | Silo | 02/06/20 | 04/06/20 9h26 | 04/06/20 |

Le silo, d'une capacité de 1750 m³, est équipé d'un système d'homogénéisation, et est alimenté par batch à partir d'extractions d'environ 10 m³ / semaine. Le dernier épandage de boues liquides a eu lieu en août 2019.

Le taux de matière sèche dans l'échantillon de boues brutes était particulièrement faible (0,08 %).

4.3.3 Digestion anaérobie mésophile

Principe (Source : cahier FNDAE n°22 bis)

La fermentation mésophile, au voisinage de 35°C, est celle généralement mise en œuvre. Appliquée à la boue épaisse, la digestion anaérobie mésophile poursuit trois principaux objectifs :

- réduire la masse de boue, et stabiliser la boue, sous réserve de respecter un temps de séjour suffisant dans le réacteur.
- hygiéniser partiellement la boue, en plaçant les espèces pathogènes dans un environnement peu propice à leur survie.
- produire du biogaz.

La boue épaisse est admise dans une chambre de mélange où elle est réchauffée par de la boue digérée, elle-même chauffée grâce à un échangeur. L'ensemble est ensuite envoyé dans le digesteur qui est agité par un dispositif mécanique ou par injection de gaz.

A l'issue de sa digestion, la boue est généralement évacuée vers un stockage qui garantit l'alimentation régulière de l'atelier de déshydratation.

Station de Cholet (49, 116 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bâche de mélange / en amont du digesteur | 08/07/20 8h30 | 09/07/20 10h08 | 10/07/20 |
| Boues stockées durée 1 | Sortie centrifugeuse | 17/06/20 | 18/06/20 11h11 | 23/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | boues stockées – 3 semaines | 17/06/20 8h30 | 18/06/20 11h11 | 19/06/20 |

Le traitement de la station de Cholet suit les étapes suivantes : 1) décantation primaire ; 2) boues activées aération prolongée ; 3) digestion anaérobie ; 4) centrifugation. Le temps de séjour des boues dans le digesteur est de 34,3 j. Le volume de digestion est de 6000 m³ et la concentration de boues digérées est de 32,4 g/L. Un apport journalier de boues de 176 m³ permet d'alimenter le digesteur.

Station Les Mureaux (78, 120 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-------------------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | boues mixtes fraîches en amont de la digestion | 16/06/20 9h | 17/06/20 9h25 | 18/06/20 |
| Boues stockées durée 1 | Boues chaulées - Zone de stockage – 3 semaines | 16/06/20 8h45 | 17/06/20 9h25 | 18/06/20 |
| Boues stockées durée 2 | Boues chaulées - Zone de stockage – 3 mois | 16/06/20 8h | 17/06/20 9h25 | 18/06/20 |

Le traitement de la station des Mureaux suit les étapes suivantes : 1) décantation primaire ; 2) Boues activées aération prolongée ; 3) Digestion anaérobie ; 4) Filtre-presse

| | Stockage = digesteur | Stockage = Plateforme |
|--------------------------------|--|--|
| Concentration boue alim | Alimentation digestion à 52g/L en moyenne sur la période (estimé 45g/L le jour du prélèvement) | 40% siccité en moyenne |
| Conditions de stockage | avec homogénéisation : brassage mécanique Couvert fermé | Pas d'homogénéisation ni couverture |
| Historique du stockage | Apport de boues continu : environ 130 m ³ /j | Apport de boues par batch 23T / 3 j en moyenne |

Station de Port-Douvot (25, 188 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|---|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues mixtes | 25/05/20 8h30 | 26/05/20 9h50 | 27/05/20 |
| Boues stockées | Boues sortie centrifugeuse déshydratation | 07/07/20 8h | 09/07/20 10h39 | 09/07/20 |
| Boues stockées | Hangar 4 mois | 07/07/20 8h15 | 09/07/20 10h39 | 09/07/20 |

La durée de la digestion est de 30 jours. Les boues sont ensuite centrifugées et stockées dans une zone couverte qui est alimentée en boues en continu avec un débit de 193 m³/jour. Les boues ne sont pas chaulées après la digestion, contrairement aux deux autres stations.

4.3.4 Filtre planté de roseaux

Rhizofiltration (Source : Conseil Général de la Dordogne, 2011)

Les lits sont composés d'un massif filtrant à fond étanche constitué de différentes couches de matériaux (galets, graves, gravillons et couche d'amendement organique) qui font office de filtre et de support pour les roseaux et sont alimentées par les eaux usées. Des drains sont disposés dans la première couche de matériaux (galets) pour récupérer les filtrats mais aussi pour servir de système d'aération du massif et permettre l'activité biologique. Le nombre de lits dépend de la capacité de l'unité et de la technique de réalisation (enterré ou hors sol). Néanmoins, pour une bonne gestion de la filière (curage des boues), il faut au minimum 6 lits, mais l'exploitation est plus facile et moins coûteuse avec 8 voire 10 lits. La hauteur utile des bassins permet l'accumulation d'environ 1,50 m de boues.

Les boues traitées sont transformées en un « terreau » bien minéralisé où les risques sanitaires sont minimisés. La siccité est de 13% en moyenne

Station d'Espondeilhan (34, 1 800 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | boues au droit de l'alimentation du lit de rhizofiltration | 09/06/20 | 10/06/20 9h30 | 11/06/20 |
| Boues stockées | boues après stockage – échantillon moyen | 09/06/20 | 10/06/20 9h30 | 11/06/20 |

Le début du stockage a démarré en septembre 2011. Le rhizofiltre est alimenté en continu par des eaux usées. Le débit moyen journalier est de 170 m³/j et le flux de matières en suspension de 42 kg/j.

Station de Francheleins Champ les Vignes (01, 1 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | boues au droit de l'alimentation du lit de rhizofiltration | 02/06/20 9h | 04/06/20 8h52 | 04/06/20 |
| Boues stockées | boues après stockage – échantillon moyen | 02/06/20 9h | 04/06/20 8h52 | 04/06/20 |

La station est composée de 2 étages de filtres plantés de roseaux, avec 3 lits par étage. Une permutation hebdomadaire est mise en œuvre pour l'alimentation des lits : chaque lit est alimenté une semaine sur trois.

Le début du stockage a démarré en octobre 2009.

Station d'Houdancourt (60, 600 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|---|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Eaux usées alimentant les lits de rhizofiltration | 09/06/20 10h30 | 10/06/20 9h39 | 10/06/20 |
| Boues stockées | stockage après 1 semaine | 09/06/20 10h45 | 10/06/20 9h39 | 10/06/20 |

La date de début de stockage n'est pas connue car la station a été reprise en exploitation il y a 1,7 an.

Le rhizofiltre est alimenté par batch journalier (en moyenne 68 m³ / j avec taux de MES 314 mg/L en 2019).

Rhizocompostage (Source : Etude diagnostique du système d'assainissement de Chalamont – Verdi)

L'objectif du traitement des boues sur macrophytes est, d'une part, la déshydratation par élimination de l'eau, et d'autre part, la stabilisation et le compostage des boues. L'apport de matières carbonées par les feuilles et tiges des roseaux en décomposition assure un compostage naturel et lent des boues avec une minéralisation progressive.

Station de Chevanceaux (17, 1 100 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides | 02/06/20 10h | 04/06/20 14h44 | 08/06/20 |
| Boues stockées | Stockage de 4 ans | 02/06/20 15h15 | 04/06/20 14h44 | 08/06/20 |

Le dernier curage du lit N°1 a été réalisé en août 2016. Les lits de macrophytes sont alimentés par un apport hebdomadaire par batch de 7 m³ (21kg/MS/j).

Station de Devecey-Bonnay (25, 4 667 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | bassin d'aération | 16/06/20 11h | 17/06/20 9h17 | 18/06/20 |
| Boues stockées | Filtre planté de roseaux | 16/06/20 10h30 | 17/06/20 9h17 | 18/06/20 |

Le rhizocompostage est alimenté en boues liquides par batch de 39 à 150 m³, depuis le 17 janvier 2020. Le dernier batch a été apporté le 12 juin 2020.

Station Le Verdon (33, 5 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 27/05/20 10h45 | 28/05/20 9h19 | 29/05/20 |
| Boues stockées | rhizocompostage après stockage (lit n°2) | 27/05/20 11h20 | 28/05/20 9h19 | 29/05/20 |

Le traitement de la station du Verdon suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) rhizocompostage.

L'extraction à partir des boues recirculées se fait pendant 30 minutes par jour avec un débit de pompe de 20 m³/h pour 2 lits, soit 5 m³ par lit par jour.

Le début du stockage du lit n°2 a démarré en septembre 2018.

Station de Marchaux (25, 2 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération | 16/06/20 9h30 | 17/06/20 9h17 | 18/06/20 |
| Boues stockées | Filtre planté de roseaux | 16/06/20 9h30 | 17/06/20 9h17 | 18/06/20 |

Le rhizocompostage est alimenté en boues liquides par batch de 100 à 400 m³, depuis le 28 janvier 2020. Le dernier batch a été apporté le 12 juin 2020.

Station de Romillé (35, 2 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin biologique | 17/06/20 | 18/06/20 14h18 | 19/06/20 |
| Boues stockées | Boues stockées | 03/06/20 | 04/06/20 10h10 | 05/06/20 |

Les lits plantés de roseaux sont alimentés en continu avec un débit de 15 m³/j à 6 g/l (l'âge de boues dans le bassin biologique est de 51 jours).

Station de Torcé Viviers en Charnie (53, 700 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |
| Boues stockées | Stockage casier 1 | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |

Les 4 casiers de 50 m² sont alimentés en alternance plusieurs fois par jour. Le dernier curage du casier 1 a été réalisé en avril 2018.

4.3.5 Lit de séchage

Principe (Source Fiche technique 2 – Seine et Marne)

Les lits de séchage sont des ouvrages constitués de bacs en béton dont le plancher est rendu étanche par une bâche ou un radier béton. Dans la partie inférieure, le massif filtrant, non colmatant, est composé de couches superposées de galets, graviers et sable grossier. Les boues issues du système épuratoire sont directement extraites du clarificateur et transférées après floculation sur le lit. Ensuite, les boues égouttées sèchent en fonction des conditions climatiques, la durée moyenne de séchage étant estimée à 3 semaines. Les boues sont ensuite ratissées manuellement, reprises et stockées dans un endroit approprié (bennes étanches, aire de stockage couverte). La boue présente un aspect très hétérogène de type pâteux (hiver) à solide (été). La siccité moyenne attendue est supérieure à 30 %.

Station de Lude Mailly (51, 2 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boucle de recirculation | 06/07/20 | 07/07/20 10h24 | 08/07/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 1 | 23/06/20 10h20 | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 2 | 23/06/20 10h30 | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |

La date de production des boues est le 5 mai 2020.

Station de Trépail (51, 800 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boucle de recirculation | 06/07/20 | 07/07/20 10h24 | 08/07/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 1 | 23/06/20 | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 2 | 23/06/20 | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |

La date de production des boues est le 22 juin 2020.

Station de Vezy (51, 1 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|-------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boucle de recirculation | 06/07/20 | 07/07/20 10h24 | 08/07/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 1 | 23/06/20 9h50 | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |
| Boues stockées | lit de séchage 2 | 23/06/20 10h | 25/06/20 9h20 | 25/06/20 |

La date de production des boues est le 5 mai 2020.

4.3.6 Serre

Les systèmes existants sont basés sur le principe de l'effet de serre.

Solaire (Source Fiche Technique 5- Seine et Marne)

Le procédé utilise l'énergie solaire captée au niveau de serres pour évaporer l'eau des boues placées en couche mince sur un radier béton et retournées de manière régulière par un scarificateur. La serre est équipée de ventilateurs/extracteurs permettant un renouvellement de l'air et l'évacuation de l'humidité. La siccité des boues dépasse les 70%.

Station d'Aups (83, 5 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 27/05/20 9h45 | 29/05/20 8h51 | 29/05/20 |
| Boues stockées | Serre solaire – 36 semaines | 27/05/20 9h45 | 29/05/20 8h51 | 29/05/20 |

Le traitement de la station d'Aups suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) épaissement gravitaire ; 3) centrifugation ; 4) serre solaire.

La serre est équipée d'un système d'homogénéisation et est alimentée en continu permettant la déshydratation de 40 m³ de boues par semaine de boues à 12 g/l de matière sèche en moyenne.

Le début du stockage a démarré en août 2019.

Station de Brenouille / Pont Saint Maxence (60, 40 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues épaissies - Bassin d'aération ou de la recirculation | 10/06/20 11h | 11/06/20 9h49 | 12/06/20 |
| Boues stockées | Serre solaire -2 semaines | 10/06/20 11h | 11/06/20 9h49 | 12/06/20 |

Le traitement de la station de Brenouille / Saint Maxence suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée avec traitement du phosphore par injection du phosphore 2) épaississement dynamique ; 3) Filtre-presse avec conditionnement polymère ; 4) serre solaire

La serre est alimentée en continu à raison de 9,8 t de matière sèche par semaine.

Station de Gemozac (17, 2 200 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides | 08/06/20 15h | 10/06/20 10h12 | 11/06/20 |
| Boues stockées | Serre solaire – 3 mois | 08/06/20 15h | 10/06/20 10h12 | 11/06/20 |

Les boues sont centrifugées puis stockées en serre. Le casier P3 est alimenté en continu depuis le 24/02/2020. Les boues stockées sont homogénéisées.

Station de Névez (29, 5 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 03/06/20 | 04/06/20 10h12 | 4/06/20 |
| Boues stockées | Serre solaire – 12 mois | 03/06/20 | 04/06/20 10h12 | 4/06/20 |

Le traitement de la station de Névez suit les étapes suivantes : 1) boues activées aération prolongée ; 2) lagune de finition ; 3) centrifugation ; 4) serre solaire

La serre dispose d'un système d'homogénéisation et est alimentée en boues par batch, avec un apport mensuel de 8 m³ (soit 1,55 t de matière sèche par mois).

Avec plancher chauffant (Source Fiche Technique 5- Seine et Marne)

Il est possible de réduire la superficie de la serre solaire en intégrant un plancher chauffant alimenté par une pompe à chaleur, celle-ci puisant les calories dans l'eau rejetée (température relativement constante). La siccité des boues dépasse les 70 %.

Station de Chartres (28, 160 000 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Boues liquides avant déshydratation | 22/06/20 10h | 23/06/20 14h | 24/06/20 |
| Boues stockées | Boues sortie sècheurs – 18 jours | 22/06/20 11h | 23/06/20 14h | 24/06/20 |
| Boues stockées | Boues séchées et stockées pendant 5 semaines | 22/06/20 11h | 23/06/20 14h | 24/06/20 |

Les boues en sortie des sècheurs ont été produites 18 jours avant le prélèvement.

Station Evron – Cépur (53, 16 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Recirculation | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |
| Boues stockées | Serre | 10/06/20 | 11/06/20 9h | 12/06/20 |

Le prélèvement a été réalisé dans la serre à la fin du plancher chauffant. A partir du 2 avril les boues sont produites depuis coronavirus.

Station de Laillé (35, 5 500 EH)

| Type d'échantillon | Lieu d'échantillonnage | Date de prélèvement | Date de réception au laboratoire | Date de début d'analyse |
|-----------------------|--|---------------------|----------------------------------|-------------------------|
| Boues brutes | Bassin d'aération ou de la recirculation | 17/06/20 | 18/06/20 14h18 | 19/06/20 |
| Boues stockées | Serre | 03/06/20 | 04/06/20 10h10 | 05/06/20 |

L'âge des boues dans le bassin biologique est de 40 jours (siccité de 14%). La serre est alimentée par 2 à 3 apports par semaine par batch de 2 à 3 m³.

4.4 RESULTATS**4.4.1 Traitement des données**

Afin de pouvoir calculer les abattements en bactériophages, les concentrations inférieures à la limite de détection ont été remplacées par la moitié de cette limite. Pour la majorité des échantillons de boues stockées analysées, la limite de détection était de 10 pfu/g de matière brute.

Les concentrations en bactériophages mesurées par le laboratoire en pfu / g de matière brute ont été converties en pfu / g de matière sèche.

Le calcul de l'abattement en bactériophages a été réalisé comme suit :

$$\text{Abattement} = \log (C/C_0)$$

Avec:

C : concentration en bactériophages dans les boues stockées, exprimée en pfu / g de matière sèche.

C₀ : concentration en bactériophages dans les boues liquides avant stockage, exprimée en pfu / g de matière sèche.

4.4.2 Taux de matière sèche

Les taux de matière sèche dans les boues liquides avant stockage sont globalement inférieurs à 8% (Figure 7). Seules 3 STEU présentent des taux de matière sèche entre 17 % et 32 % : Aups (17%), Espondeilhan (21%) et Francheleins (32%). Pour les deux dernières stations, il a probablement été difficile d'échantillonner au regard de l'apport en eaux usées des rhizofiltres, ce qui peut expliquer les taux de matière sèche élevés. Par contre pour la station d'Aups, le prélèvement des boues liquides a certainement été effectué après une étape d'épaississement. Cette station, atypique par rapport aux autres stations de la filière des serres solaire, n'a pas été retenue pour les calculs d'abattement en charge virale.

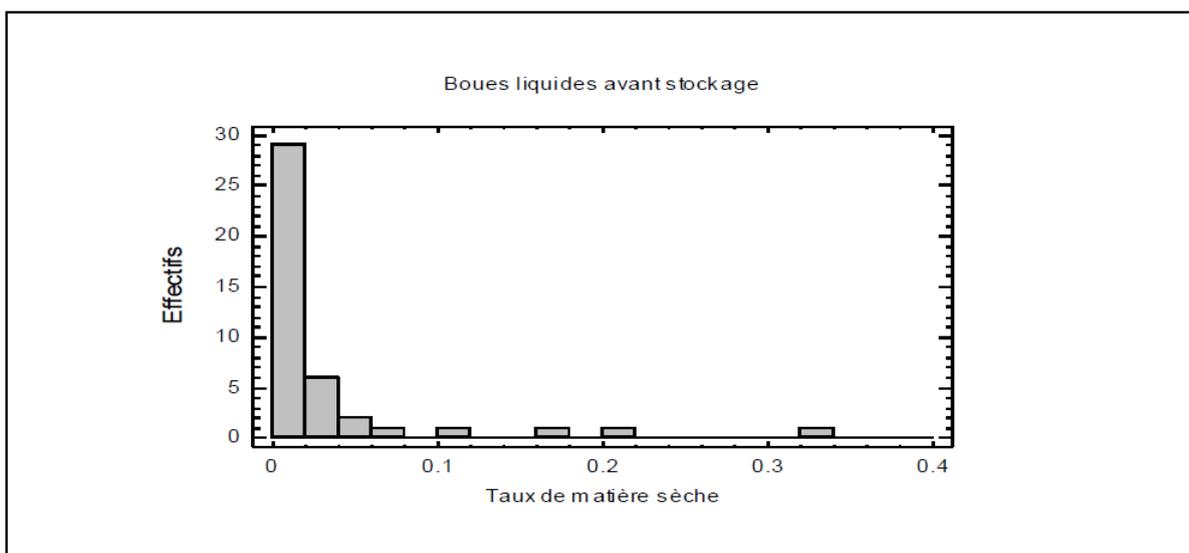


Figure 7 : Histogramme de distribution du taux de matière sèche dans les boues liquides avant stockage

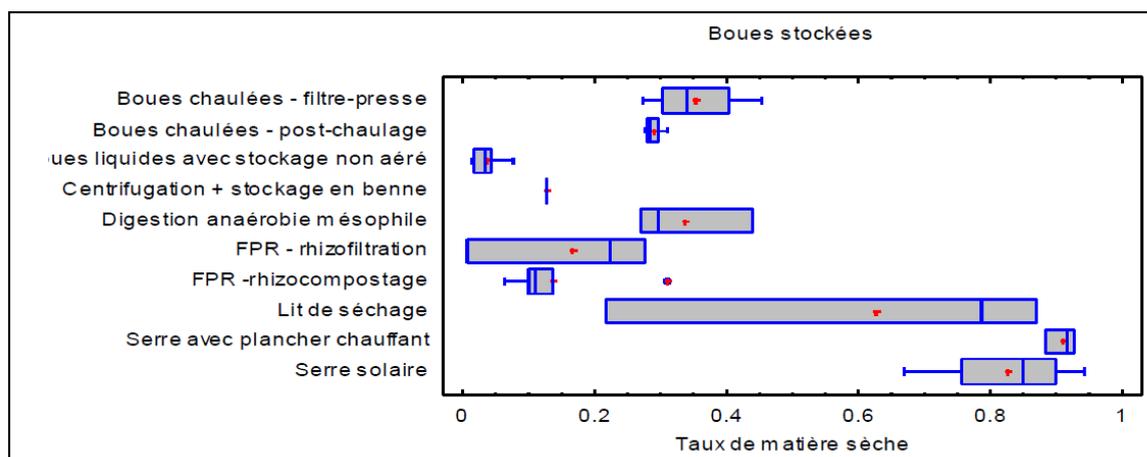


Figure 8 : Taux de matière sèche dans les boues stockées.

Le graphique est élaboré comme suit : la boîte est construite à partir du centile 25 et du centile 75, avec la médiane représentée par la barre dans cette boîte. La moyenne est aussi représentée par une croix rouge. Les moustaches correspondent aux valeurs minimum et maximum, hors points extrêmes. Il existe deux types de points extrêmes : les points éloignés (carré bleu, > 1.5 fois la largeur de la boîte) et très éloignés (carré rouge, > 3 fois la largeur de la boîte).

En ce qui concerne les taux de matière sèche dans les boues stockées, une différenciation selon le procédé de traitement des boues est mise en évidence (Figure 8). Ainsi, les boues stockées dans des serres (solaire ou avec plancher chauffant) sont caractérisées par des taux de matière sèche

élevés (entre 70 et 95%). A l'opposé, les boues liquides stockées en silo ont des taux de matière sèche faibles (inférieurs à 8%). Les boues chaulées (filtre presse et post chaulage), ainsi que les boues digérées ont des taux de matière sèche compris entre 30 % et 45 %.

4.4.3 Concentration et abattement en bactériophages

Le logarithme des concentrations en bactériophages dans les boues liquides avant stockage est en moyenne de 7, avec une majorité de boues caractérisées par des valeurs comprise entre 6.5 et 7.5 pour les coliphages somatiques (Figure 9) et est en moyenne de 5 pour les ARN F-spécifiques, avec une majorité de boues caractérisées par des valeurs entre 4 et 6 (Figure 10).

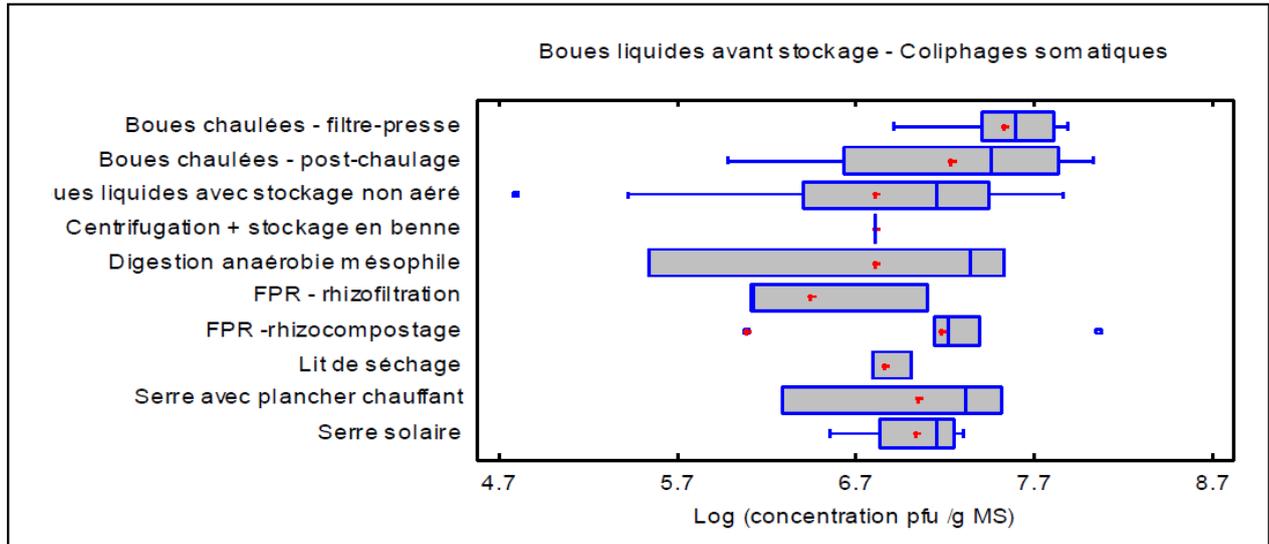


Figure 9 : Concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides avant stockage en pfu / g de matière sèche (échelle logarithmique). Voir la légende de la Figure 8 pour la construction des boîtes à moustaches.

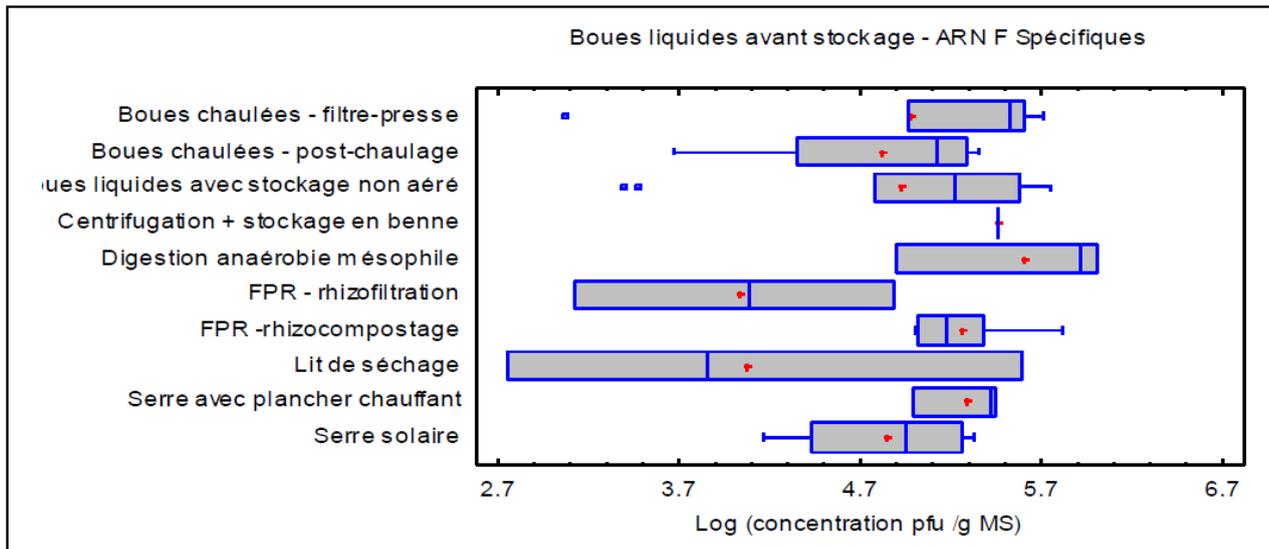


Figure 10 : Concentration en ARN F spécifiques dans les boues liquides avant stockage en pfu/ g de matière sèche (échelle logarithmique). Voir la légende de la Figure 8 pour la construction des boîtes à moustaches.

Cependant, une forte dispersion des concentrations en bactériophages dans les boues liquides avant stockage pour la digestion anaérobie mésophile peut être observée. Ceci est dû à la station de Cholet qui présente une concentration en bactériophages dans les boues avant digesteurs anormalement basse (en coliphages somatiques log 5,5 contre log 7,3 pour les deux autres stations).

Le logarithme des concentrations en bactériophages dans les boues stockées est dépendant du procédé de traitement et stockage des boues mis en œuvre, que ce soit pour les coliphages somatiques (Figure 11) ou pour les ARN F spécifiques (Figure 12).

Ainsi, les boues issues du chaulage (filtre presse et post chaulage) et des serres avec plancher chauffant, sont caractérisées par des concentrations (en échelle logarithmique) proche de 1. A l'opposé, les boues stockées en conditions non aéré ou dans des filtres plantés de roseaux (FPR) ont des concentrations logarithmiques entre 5 et 6,5 pour les coliphages somatiques et entre 2 et 6 pour les phages ARN F-spécifiques.

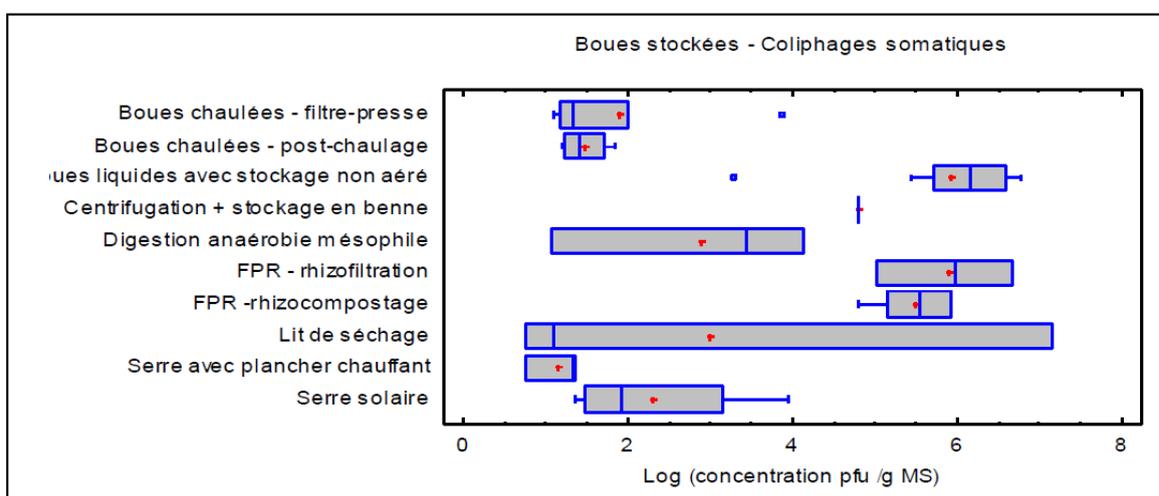


Figure 11 : Concentration en coliphages somatiques dans les boues stockées en pfu / g de matière sèche (échelle logarithmique). Voir la légende de la Figure 5 pour la construction des boîtes à moustaches.

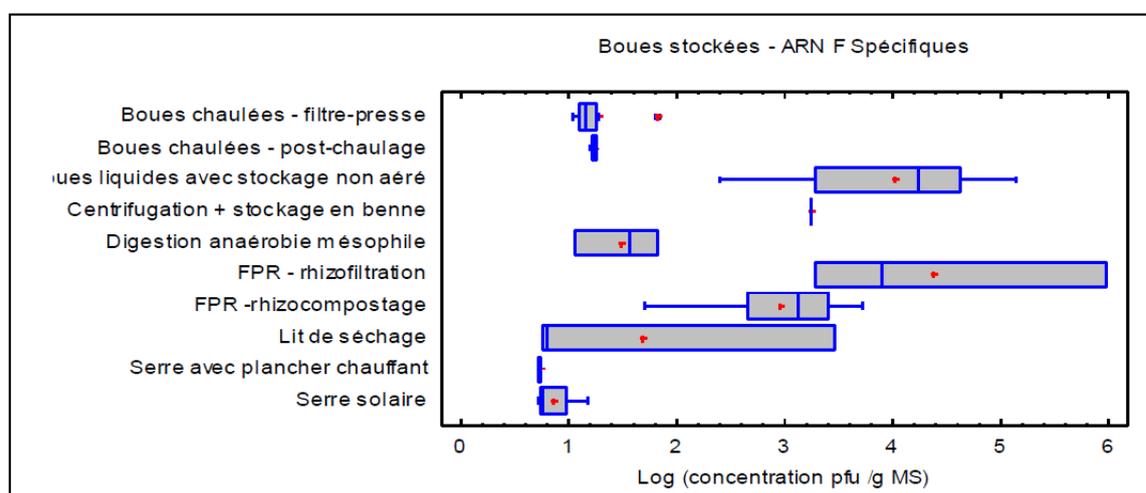


Figure 12 : Concentration en ARN spécifiques dans les boues stockées en pfu / g de matière sèche (échelle logarithmique). Voir la légende de la Figure 5 pour la construction des boîtes à moustaches.

Enfin, les concentrations logarithmiques en coliphages somatiques dans les autres boues sont très dispersées, entre 1 à 7 et entre 1 et 4 pour les lits de séchages et la digestion anaérobie mésophile respectivement, illustrant une disparité importante entre les STEU d'une même filière de traitement et stockage. Ainsi la station du Trépail, dont le prélèvement des boues stockées a été réalisé le lendemain du démarrage du lit de séchage, montre une concentration en bactériophages très forte (log 7) alors que les deux autres stations, échantillonnées environ 1,5 mois après le démarrage du lit de séchage présentent des concentrations dans les boues stockées de l'ordre de log 1. La station du Trépail n'a pas été incluse pour le calcul de l'abattement du titre viral.

L'estimation de la perte du titre viral (ou abattement) au cours du stockage a été calculée comme le logarithme du rapport des concentrations (en pfu / g de matière sèche) dans les boues brutes et dans les boues après stockage. Pour les filières ayant plusieurs durées de stockage, la plus longue a été considérée pour réaliser la Figure 13 et la Figure 14.

Le taux d'abattement semble fortement dépendant du type de traitement et du temps de stockage mis en œuvre (Figure 13 et Figure 14). Ainsi le chaulage des boues (filtre presse ou post chaulage) et le stockage en serre solaire ou avec plancher chauffant permettent en général d'avoir des abattements très importants en coliphages somatiques (supérieurs à 5 log) et en phages ARN F-spécifiques (supérieurs à 3 log). Par ailleurs, pour ces filières, les concentrations mesurées en bactériophages dans les boues stockées sont dans la plupart des cas inférieures à la limite de quantification de 10 pfu/g de matière brutes.

Pour les autres types de traitement et stockage comme les boues liquides en stockage non aéré et les filtres plantés de roseaux (rhizocompostage et rhizofiltration), l'abattement en coliphages somatiques et en phages ARN F-spécifiques est faible, majoritairement inférieur à 3 log.

Enfin le taux d'abattement en bactériophages (coliphages somatique et phages ARN F spécifiques) est très dispersé pour la digestion anaérobie mésophile et les lits de séchage, avec probablement des résultats très différents selon les STEU concernées pour chacune de ses filières (voir § 3.4.4).

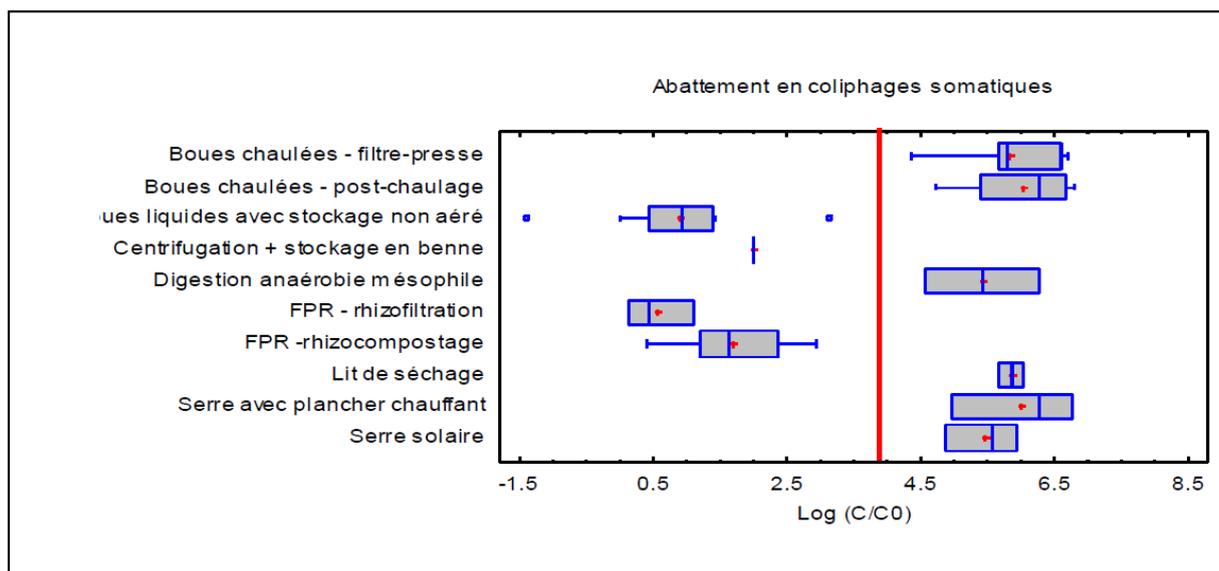


Figure 13 : Abattement en coliphages somatiques (échelle logarithmique). La barre en rouge correspond à un abattement de 4 log. Voir la légende la Figure 5 pour la construction des boîtes à moustaches.

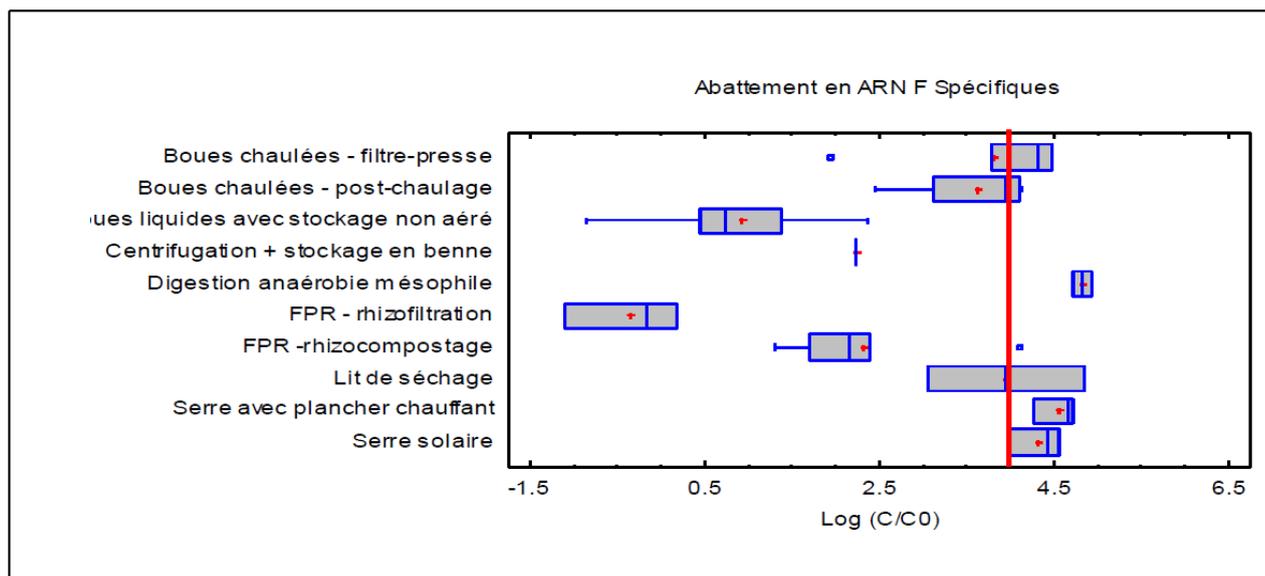


Figure 14 : Abattement en ARN F spécifiques (échelle logarithmique). La barre en rouge correspond à un abattement de 4 log. Voir la légende la Figure 5 pour la construction des boîtes à moustaches.

4.4.4 Analyse détaillée par filière de traitement des boues

Boues chaulées - filtre presse

5 STEU de 10 000 à 50 000 EH sont concernées

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de 1,1 % et celui des boues stockées à 3 semaines et 3 mois est en moyenne de 34%.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 7,5.

Un abattement important en coliphages somatiques (> 5 log) et en ARN F-spécifiques (> 3.8 log), est observé dès 3 semaines de stockage, à l'exception de Saint Dizier qui est caractérisée par un abattement moindre en coliphages somatiques (3,7). En ce qui concerne la STEU de Pons l'abattement en ARN F-spécifiques est plus faible (2 log) en raison de la concentration initiale dans les boues brutes faibles (3 log).

Enfin, après trois mois de stockage, les concentrations mesurées en coliphages somatiques et ARN F-spécifiques, exprimées en g de matière brutes, sont inférieures à la limite de détection (soit 1,1 à 1,3 en logarithme de la concentration en bactériophages, exprimée par g de matière sèche).

Boues centrifugée et post chaulées

4 STEU de 12 000 à 87 000 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de 1,2 % et celui des boues stockées à 3 semaines et 3 mois est en moyenne de 30%.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 7,2.

Un abattement important en coliphages somatiques (> 4,8 log) et en ARN F-spécifiques (> 3.8 log sauf pour une station caractérisée par un abattement de 2.5 log et une concentration initiale de 3 log), est observé dès 3 semaines de stockage.

Enfin, après trois mois de stockage, les concentrations mesurées en coliphages somatiques et en ARN F-spécifiques, exprimées en g de matière brutes, sont inférieures à la limite de détection (soit 1,1 à 1,3 en logarithme de la concentration en bactériophages, exprimée par g de matière sèche).

Boues liquides, stockage non aéré

10 STEU sont concernées, dont 8 de taille inférieures à 4 000 EH et 2 plus grandes (19 000 et 36 000 EH).

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de 1,3 %, avec une valeur très basse pour la station de Valmont (0,08%) et une plus élevée pour la station de Val Saint Germain (5,9 %). Le taux de matière sèche dans les boues stockées est en moyenne de 3,2 %.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 6,9. Les stations de Valmont et Savigny ont des concentrations plus faibles (4,8 – 5 en échelle logarithme).

Les abattements en coliphages somatiques et en ARN F-spécifiques observés sont assez faibles, en moyenne de 0,9 log, sauf pour la STEU de Saint Anne sur Brivet caractérisée des abattements de l'ordre de 3 log. Ceci peut s'expliquer par la très longue durée de stockage (> 1 an) par rapport aux autres STEU. Ces résultats sont en cohérence avec ceux obtenus sur l'étude cinétique de stockage de boues liquides.

Digestion anaérobie mésophile

3 STEU de 116 000 à 188 000 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est compris entre 3 % et 6 %. Le taux de matière sèche dans les boues stockées est compris entre 30 et 40 %.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est compris entre 5,5 et 7,5.

L'abattement en coliphages somatiques observé est important pour la station des Mureaux (> 6 log) dont les boues sont chaulées avant stockage, et pour la station de Port-Douvot (>4 log) mais plus faible pour la station de Cholet (2 log). Pour cette dernière, le niveau de concentration en coliphages somatiques dans les boues brutes est plus faible (5.5 log) que pour les autres stations, ce qui peut expliquer le plus faible abattement observé.

L'abattement en ARN F-spécifiques est supérieur à 3.8 pour les 3 STEU concernées.

Rhizocompostage

6 STEU de 700 à 5 000 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de à 0,6 % et celui des boues stockées est en moyenne de 14 % (compris entre 6% et 31 %).

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 7,2.

L'abattement en coliphages somatiques observé est assez faible, en moyenne de 1,7 log. L'abattement en coliphages somatiques de la station de Torcé Viviers en Charnie est cependant proche de 3 log.

Rhizofiltration

3 STEU de 600 à 1 800 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est compris entre 11 % et 32 %. Les boues stockées de la station d'Houdancourt sont caractérisées par un taux de matière sèche de 0,6% et celles des deux autres stations par un taux compris entre 22 et 28 %.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est compris entre 6 et 7.

Les abattements en coliphages somatiques et en ARN F-spécifiques observés sont assez faibles (inférieurs à 1 log).

Lit de séchage

3 STEU de 800 à 2500 EH sont concernées.

Les taux de matières sèches des boues liquides est en moyenne de 1%. Le taux de matières sèches dans les lits de séchage est de 21 % pour la STEU de Trépail et entre 80 et 90 % pour les STEU de Lude-Mailly et Verzy.

Des abattements importants en coliphages somatiques (> 5,5 log) et en ARN F-spécifiques (> 3 log) sont observés pour 2 STEU (Lude-Mailly et Verzy).

Aucun abattement en bactériophage n'a été observé pour la STEU de Trépail. A noter que le début de stockage sur cette STEU a démarré 1 jour avant la réalisation des prélèvements, alors que pour les deux autres STEU il a démarré 1,5 mois avant.

Enfin, pour les STEU de Lude-Mailly et Verzy les concentrations en bactériophages mesurées dans les boues stockées, exprimées en g de matière brutes, sont inférieures à la limite de détection (soit 1,1 à 1,3 en logarithme de la concentration en bactériophages, exprimée par g de matière sèche).

Serre Solaire

4 STEU de 2 200 à 40 000 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de 1,7 %, excepté pour la station d'Aups pour laquelle il est de 17 %. Le taux de matière sèche des boues stockées est très élevé et compris entre 85 % et 95 %, excepté pour la station d'Aups (67 %).

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 7,0.

Un abattement important en coliphages somatiques (> 4,9 log) et en ARN F-spécifiques (> 4 log), est observé, excepté pour la station d'Aups où cet abattement n'est que de 2,6 log pour les coliphages somatiques et de 3 pour les ARN F-spécifiques.

Enfin, les concentrations mesurées en ARN F-spécifiques, exprimées en g de matière brutes, dans les boues stockées sont en général inférieures à la limite de détection (soit 1,1 à 1,3 en logarithme de la concentration en coliphages somatiques, exprimée par g de matière sèche).

Serre avec plancher chauffant

3 STEU de 5 500 à 160 000 EH sont concernées.

Le taux de matière sèche des boues liquides est en moyenne de 0,5 %, et celui des boues stockées est très élevé et en moyenne de 92 %.

Le logarithme de la concentration en coliphages somatiques dans les boues liquides, exprimées en g de matière sèche, est en moyenne de 6,3.

Un abattement important en coliphages somatiques (> 5 log) et en ARN F-spécifiques (> 4 log), est observé pour l'ensemble des STEU.

Enfin, les concentrations mesurées en bactériophages, exprimées en g de matière brutes, dans les boues stockées sont en général inférieures à la limite de détection (soit 1,1 à 1,3 en logarithme de la concentration en coliphages somatiques, exprimée par g de matière sèche).

Une synthèse basée sur deux critères est présentée dans le Tableau 8. Les coliphages somatiques ont été retenus pour réaliser cette synthèse car ils sont plus résistants et donc sont plus protecteurs. Les critères utilisés sont :

- Taux d'abattement ($\log C/C_0$) en coliphages somatiques supérieur à 4 log ;
- Concentration en coliphages somatiques proches de la limite de détection (ce qui correspond en échelle logarithmique à 0,7 – 1,35 selon le taux de matière sèche).

Tableau 8 : Synthèse des résultats obtenus pour chacune des 42 STEU en considérant un abattement en coliphages somatiques supérieur à 4 log et une concentration dans les boues stockées proches des limites de détection (log C < 1.35) comme critère. Dans le cas où 2 durées ou conditions de stockage ont été mis en œuvre les réponses sont doublées. Les STEU atypiques par rapport à leur filière sont identifiées avec *

| Nom de la STEU | Département | Equivalent Habitant | Procédé de traitement | Abattement Log C/C0 > 4 | Concentration dans les boues stockées Log C < 1.35 | |
|--------------------------------|-------------|---------------------|--|-------------------------------------|--|-----------|
| Laon | 02 | 40 000 | Boues chaulées filtre-presse | oui / oui | oui / oui | |
| Les Martres de Veyre | 63 | 32 600 | | oui / oui | oui / oui | |
| Pons | 17 | 9 800 | | oui / oui | oui / oui | |
| Saint-Dizier | 52 | 50 000 | | non / oui | non / oui | |
| Schwindratzheim | 67 | 12 000 | | oui / oui | non / oui | |
| Dreux | 28 | 86 667 | Boues chaulées post-chaulage | oui / oui | oui / oui | |
| Fécamp | 76 | 40 000 | | oui / oui | non / oui | |
| Isles sur Suipe | 51 | 12 000 | | oui / oui | oui / oui | |
| Sin le Noble | 59 | 23 000 | | oui / oui | non / oui | |
| Audeux | 25 | 500 | Boues liquides avec stockage non aéré | non | non | |
| Cintré | 35 | 1 500 | | non | non | |
| Crêche | 71 | 19 000 | | non | non | |
| Ste Gemmes le Robert | 53 | 800 | | non | non | |
| Mamirolle | 25 | 3 000 | | non | non | |
| Saint Anne sur Brivet | 44 | 36 250 | | non | non | |
| Saint Genis de Saintonge | 17 | 1 300 | | non | non | |
| Savigny | 69 | 2 200 | | non | non | |
| Val Saint Germain | 91 | 3 000 | | non | non | |
| Valmont | 76 | 4 000 | | non | non | |
| St-Lizier | 09 | 41 000 | | Centrifugation | non | non |
| Cholet* | 49 | 116 000 | | Digestion anaérobie mésophile | non | non |
| Les Mureaux | 78 | 120 500 | | | oui / oui | oui / oui |
| Port-Douvot | 25 | 188 000 | | | oui | non |
| Chevanceaux | 17 | 1 100 | Filtre planté de ro- seaux (rhizocompos- tage) | non | non | |
| Devecey-Bonnay | 25 | 4 667 | | non | non | |
| Le Verdon | 33 | 5 000 | | non | non | |
| Marchaux | 25 | 2 500 | | non | non | |
| Romillé | 35 | 2 500 | | non | non | |
| Torcé Viviers en Charnie | 53 | 700 | | non | non | |
| Espondeilhan | 34 | 1 800 | Filtre planté de ro- seaux (rhizofiltration) | non | non | |
| Francheleins Champ les Vignes | 01 | 1 000 | | non | non | |
| Houdancourt | 60 | 600 | | non | non | |
| Lude-Mailly | 51 | 2 500 | Lit de séchage | oui | oui | |
| Trépail* | 51 | 800 | | non | non | |
| Verzy | 51 | 1 500 | | oui | oui | |
| Chartres | 28 | 160 000 | Serre avec plancher chauffant | oui | oui | |
| Evron – Cepur | 53 | 16 500 | | oui | oui | |
| Laillé | 35 | 5 500 | | oui | oui | |
| Aups* | 83 | 5 500 | Serre solaire | non | non | |
| Brenouille/Pont Sainte Maxence | 60 | 40 000 | | oui | non | |
| Gemozac | 17 | 2 200 | | oui | non | |
| Névez | 29 | 5 000 | | oui | non | |

5 CONCLUSIONS-PERSPECTIVES

L'étude cinétique de l'abattement des coliphages somatiques et bactériophages ARN F- spécifiques dans des boues liquides stockées dans des conditions maîtrisées a permis de confirmer les hypothèses suivantes :

- Un abattement des coliphages somatiques moins importants que celui observé pour les bactériophages ARN-spécifiques,
- Un abattement plus important à 22°C comparé à celui observé à 5°C,
- Dans des conditions de stockage à 22°C : un abattement maximal de 1,2 log pour les coliphages somatiques à J96 et 1,4 log pour les bactériophages ARN F-spécifiques après J28.

Les résultats sur l'étude de l'abattement en bactériophages dans les boues issues de stations d'épuration ont montré que les boues liquides, avant traitement ou stockage présentaient un taux de matière sèche qui variait entre 0,5% et 8%. Le taux de matières sèches dans les boues stockées ayant fait l'objet d'un traitement est directement lié aux procédés de traitement et aux conditions de stockage, avec des taux compris entre 0,5% et 95%.

Le logarithme de base 10 (log) des concentrations en bactériophages dans les boues extraites de la « filière eau », avant tout traitement ou stockage est en moyenne de 7, avec une majorité de boues caractérisées par des valeurs comprises entre 6,5 et 7,5 pour les coliphages somatique et est en moyenne de 5 pour les phages ARN F-spécifiques, avec une majorité de boues caractérisées par des valeurs entre 4 et 6.

Par ailleurs, au regard de l'objectif fixé initialement d'un abattement de 4 log pour les bactériophages, il apparaît, au travers de cette étude, que cet objectif est atteint pour les coliphages somatiques en raison de la concentration importante présente dans les boues liquides avant stockage. Par contre pour les phages ARN F-spécifiques, cet objectif d'un abattement de 4 log doit être considéré au regard de la concentration initiale déterminée dans les boues liquides qui est plus faible que pour les coliphages somatiques (environ 5 log en moyenne). Ainsi, l'objectif sur le taux d'abattement en ARN F- spécifiques doit d'une certaine manière tenir compte de cette concentration initiale dans les boues liquides car il peut être inférieur à 4 log selon les règles de calcul défini dans l'étude (concentration équivalente à la moitié du seuil de détection si l'échantillon est négatif ou non quantifiable) si la concentration en phages ARN F-spécifiques mesurée dans les boues stockées est inférieure à la limite de quantification. Dans ce cas, l'abattement en phages ARN F- spécifiques peut-être largement sous-estimé, par conséquent, les conclusions se focalisent essentiellement sur les coliphages somatiques.

Les résultats obtenus dans cette étude démontrent, d'une part, qu'il y a une bonne homogénéité des concentrations de coliphages somatiques mesurées dans les boues liquides avant stockage, et ce quelle que soit la taille de la STEU et, d'autre part, que les taux d'abattement en bactériophages estimés sont très largement dépendant de la filière de production et traitement boues et de leurs conditions de stockage. Ce constat permet par conséquent d'émettre des propositions par filières.

Les résultats des deux protocoles de cette étude soutiennent les choix stratégiques et techniques mis en œuvre : **Les bactériophages sont des indicateurs fiables de l'évaluation de l'efficacité d'abattement au cours du stockage de la charge virale des boues produites par les différentes filières présentes sur le territoire métropolitain.**

Enfin, le recours à des protocoles analytiques éprouvés ayant notamment été validés et ayant démontré leur transférabilité apparaît comme un élément satisfaisant à l'exploitabilité

des données acquises, de même que la mise en œuvre d'un panel d'outils de contrôle qualité.

Considérant que le taux d'abattement en coliphages somatiques est largement plus robuste et plus précis que celui en phages ARN F-spécifiques, il a été retenu pour émettre des propositions de possibilité d'épandage par filière de traitement et conditions de stockage des boues.

Le taux d'abattement en coliphages somatiques est supérieur à 4 log pour l'ensemble des filières de traitement des boues suivantes :

- Boues chaulées (filtre presse et post chaulage) après 3 mois de stockage (n=9)
- Serre solaire et avec plancher chauffant, avec un taux de matière sèche supérieur à 80 % (n=6)

Par ailleurs pour ces filières, la concentration en coliphages somatiques dans les boues stockées est généralement inférieure à la limite de quantification de la méthode d'analyse.

Ainsi, il est proposé que pour ces filières « boues chaulées » et « serre » les boues stockées dans les conditions précisées ci-dessus soient épandues sans analyses complémentaires à celles requises habituellement (arrêté du 8 janvier 1998).

En raison du plus faible nombre de stations étudiées, il est plus difficile de conclure pour les filières suivantes.

- Lit de séchage après 1,5 mois de stockage (n=2)
- Digestion anaérobie mésophile après 4 mois de stockage (n=1),

En effet, pour ces filières le nombre d'échantillon disponible exploitable reste trop faible. Pour les lits de séchage, une des trois stations étudiées a été échantillonnée à une date trop proche de la mise en service du lit de séchage (l'échantillon était représentatif de boues quasiment « fraîches »).

En ce qui concerne la digestion anaérobie mésophile, une des trois stations a présenté des données sur les boues en entrée de filière avant stockage très différentes (taux de matière sèche élevé et concentration initiale beaucoup plus faible) et n'a donc pas été retenue pour l'exploitation finale. Par ailleurs, pour une autre de ces trois stations, les boues sont chaulées au moyen d'un filtre presse. Cette station est donc à rapprocher de la filière filtre presse. Cependant, ces filières présentent un potentiel d'abattement des coliphages somatiques important, comme cela a pu être observé pour les lits de séchage après 1,5 mois de stockage (taux d'abattement supérieur à 5 log) ou pour la digestion anaérobie mésophile (taux d'abattement de 4,5 log).

En attente de données supplémentaires permettant de définir des conditions de stockage précise pour les filières « lit de séchage » et « digestion anaérobie mésophile », il est proposé pour ces deux filières que le maître d'ouvrage réalise une estimation du taux d'abattement en coliphages somatiques de chaque lot de boues stockées en suivant le protocole mis en place dans cette étude. Dans le cas où l'abattement serait supérieur à 4 log, il est proposé que le lot de boues soit épandu sans analyses complémentaires à celles requises habituellement (arrêté du 8 janvier 1998). Il est ainsi conseillé de suivre les recommandations suivantes pour le stockage :

- **Lit de séchage : stockage de 1,5 mois minimum**
- **Digestion anaérobie mésophile : 4 mois de stockage minimum**

Enfin, les taux d'abattement en coliphages somatiques sont très majoritairement inférieurs à 4 log, pour les filières suivantes :

- Boues liquides en stockage non aéré (n=10)
- Filtres planté de roseaux (rhizocompostage et rhizofiltration) (n= 9)

Pour ces filières « boues liquides » et « filtres plantés de roseaux », au vu des résultats obtenus, il n'est pas proposé de faire évoluer les dispositions de l'arrêté du 30 avril 2020.

Enfin, des données complémentaires incluant d'autres stations permettraient de statuer sur les filières comme les lits de séchage ou la digestion anaérobie mésophile. Par ailleurs, des études sur le chaulage des silos de stockage des boues liquides ont été engagées récemment afin de trouver une solution pour l'épandage de ces boues liquides. Une détermination du taux d'abattement en coliphages somatiques permettrait de valider ou non cette option.

Synthèse des propositions par filière :

| Filières | Conditions de stockage minimum requis | Conditions d'épandage particulières |
|---|---------------------------------------|---|
| Boues chaulées | 3 mois | aucune |
| Serre solaire ou avec plancher chauffant | taux de matière sèche > 80% | aucune |
| Lit de séchage | 1.5 mois | Confirmation d'un taux d'abattement en coliphages somatiques de 4 log pour chaque lot |
| Digestion anaérobie mésophile | 4 mois | Confirmation d'un taux d'abattement en coliphages somatiques de 4 log pour chaque lot |
| Boues liquides en stockage non aéré | Aucune | Hygiénisation requise (arrêtés 1998 et 2020) |
| Filtres planté de roseaux | Aucune | Hygiénisation requise (arrêtés 1998 et 2020) |

6 REFERENCES

Avis Anses Saisine n° 2020-SA-0043 AVIS de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de COVID-19, 27 mars 2020

Sophie Lardy-Fontan et Béatrice Lalere – Lignes directrices pour la conduite et la validation d'études de stabilité des paramètres physico-chimiques dans le domaine de l'eau – Rapport AQUAREF 2006 –45 p.

NF EN ISO 10705-1 Qualité de l'eau Détection et dénombrement des bactériophages Partie Dénombrement des bactériophages ARN F spécifiques.

NF EN ISO 10705-2 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 2 : dénombrement des coliphages somatiques.

NF EN ISO 10705-3 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau

NF EN 12880 Caractérisation des boues - Détermination de la teneur en matière sèche et de la teneur en eau.

Pr ISO TS 5667:25 Water quality - Sampling - Part 25: Guideline on the validation of the preservation time of water samples

Lucena F., Blanch A.R. and Jofre J. (2007) Suitability Study Report Development of a standardised protocol for analyses somatic coliphages in sludge, soil and treated biowastes. (DL 2/4.2).

Giuseppina La Rosa, Lucia Bonadonna, Luca Lucentini, Sebastien Kenmoe, Elisabetta Sufredini, Coronavirus in water environments: Occurrence, persistence and concentration methods - A scoping review, Water Research, 179, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.115899>

Masaaki Kitajima, Warish Ahmed, Kyle Bibby, Annalaura Carducci, Charles P. Gerba, Kerry A. Hamilton, Eiji Haramoto, Joan B. Rose, SARS-CoV-2 in wastewater: State of the knowledge and research needs, Science of The Total Environment, 739, 2020 <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139076>.

Gwenaëlle PIERRE-COLLET (2010) Rétention de virus en ultrafiltration : protocole de caractérisation. Doctorat de l'Université de Toulouse. <http://www.theses.fr/2010TOU30085>

HORIZONTAL STANDARDS ON HYGIENIC PARAMETERS FOR IMPLEMENTATION OF EU DIRECTIVES ON SLUDGE, SOIL AND TREATED BIO-WASTE SSPI-CT-2004- 513660

Juan Jofre, Francisco Lucena, Anicet R. Blanch and Maite Muniesa, Coliphages as Model Organisms in the Characterization and Management of Water Resources, Water 2016, 8, 199; doi:10.3390/w8050199.

Paris, le 23 septembre 2020

La Responsable du Département
Biomédical et Chimie Organique



Béatrice LALERE

Les Responsables techniques



Sophie LARDY-FONTAN



Nathalie GUIGUES



ANNEXE 4 : PROJET D'ARRETE MODIFIANT L'ARRETE DU 30 AVRIL 2020 PRECISANT LES MODALITES D'EPANDAGE DES BOUES ISSUES DU TRAITEMENT DES EAUX USEES URBAINES PENDANT LA PERIODE DE COVID-19

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

Ministère de la transition écologique

Arrêté du

modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la période de covid-19

NOR

La ministre de la transition écologique, le ministre des solidarités et de la santé et le ministre de l'agriculture et de l'alimentation,

Vu le code de l'environnement, notamment ses articles L. 123-19-3, L. 512-5 et R. 211-25 à R. 211-47 et R. 214-1 et suivants ;

Vu le code général des collectivités territoriales notamment son article L. 2224-8 ;

Vu le code rural et de la pêche maritime, notamment son article L. 255-16 ;

Vu la loi n° 2020-290 du 23 mars 2020 d'urgence pour faire face à l'épidémie de covid-19 ;

Vu l'ordonnance n° 2020-306 du 25 mars 2020 relative à la prorogation des délais échus pendant la période d'urgence sanitaire et à l'adaptation des procédures pendant cette même période ;

Vu l'arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées ;

Vu l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de covid-19 ;

Vu l'avis n° 2020-SA-0043 de l'Anses du 27 mars 2020 relatif à une demande en urgence d'appui scientifique et technique sur les risques éventuels liés à l'épandage de boues d'épuration urbaines durant l'épidémie de covid-19 ;

Vu les données transmises par Santé publique France concernant les dates d'entrée des départements dans une zone d'exposition à risques pour le covid-19 ;

Vu les données de l'observatoire cartographique des indicateurs épidémiologiques produits par Santé publique France,

Vu l'avis de l'Anses du XXX

Arrêtent :

Article 1^{ier}

L'arrêté du 30 avril 2020 susvisé est ainsi modifié :

1° Après le c) de l'article 2, il est ajouté un d), un e) et un f) ainsi rédigés :

d) Les boues extraites après le début d'exposition à risques pour le covid-19 et durant une période pendant laquelle le taux d'incidence hebdomadaire du covid-19 dans le ou les départements d'où proviennent toutes les eaux usées et tous les déchets (matières de vidange, boues d'autres stations...) reçus par la station de traitement des eaux usées est inférieur à 10 pour 100 000 habitants ;

e) Les boues pour lesquelles le génome du virus SARS-Cov-2 n'a pas été détecté conformément à la méthodologie décrite en annexe 2, ou à une méthodologie équivalente. Ces analyses sont réalisées par le producteur de boues. Les résultats de ces analyses sont transmis au service de police de l'eau, selon les modalités décrites à la section III de l'arrêté du 8 janvier 1998, ou à l'inspection des installations classées selon les modalités définies dans l'arrêté d'autorisation de l'installation.

f) Les boues extraites après le début d'exposition à risques pour le covid-19 et répondant à l'un des critères suivants:

1° les boues ont fait l'objet d'un chaulage avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30% équivalent CaO/MS¹³ puis d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois.

2° les boues ont fait l'objet d'un séchage solaire avec plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80%.

3° les boues ont fait l'objet d'un séchage sur lit puis d'un stockage d'une durée minimale de 1.5 mois.

4° les boues ont fait l'objet d'une digestion anaérobie mésophile puis d'un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

Dans les cas 3° et 4°, il est également nécessaire que, pour chaque lot de boues épandu, le taux d'abatement en coliphages somatiques mesuré conformément à la méthodologie décrite à l'annexe 3, ou à une méthodologie équivalente, soit supérieur ou égal à 4 log. Les résultats de ces analyses sont transmis, au service de police de l'eau, selon les modalités décrites à la section III de l'arrêté du 8 janvier 1998, ou à l'inspection des installations classées selon les modalités définies dans l'arrêté d'autorisation de l'installation.

2° L'article 2 est complété par l'alinéa suivant :

¹³ En cas d'utilisation de chaux éteinte, tenir compte de la conversion : 1 Ca(OH)₂ représente 0,75 équivalent CaO.

« Le taux d'incidence hebdomadaire de chaque département est défini et calculé par Santé publique France. Cette donnée est accessible sur le site internet de l'observatoire cartographique des indicateurs épidémiologiques de Santé publique France :

https://geodes.santepubliquefrance.fr/#c=indicateur&f=0&i=sp_pe_tb_heb.tx_pe_hebdo&t=a01&view=map2 »

3° Après l'annexe 1, il est ajouté une annexe 2 et une annexe 3 ainsi rédigées :

« **Annexe 2 : Méthodologie d'analyse du génome du virus SARS-Cov-2 dans les boues en vue de leur épandage**

Matériel de prélèvement :

Le préleveur doit être équipé des équipements de protection individuelle avant le démarrage de l'opération de prélèvement. Avant utilisation, le matériel de prélèvement et les équipements de protection individuelle doivent être lavés et désinfectés.

Les sacs ou récipients destinés à l'emballage final des échantillons doivent être inertes vis-à-vis des boues, résistants à l'humidité et étanches à l'eau et à la poussière.

Echantillonnage des boues liquides :

Celles-ci doivent être homogénéisées avant prélèvement, soit par recirculation, soit par agitation mécanique pendant une durée comprise entre trente minutes et deux heures selon leur état.

Les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de quatre séries de 5 prélèvements élémentaires, à des hauteurs différentes et en des points différents. Les différents prélèvements élémentaires sont de volumes identiques (2 litres) pour garantir la représentativité de l'échantillon final de boue à analyser. Ils sont effectués à l'aide d'un bécher avec clapet et d'une canne télescopique de prélèvement, sont mélangés, homogénéisés et réduits à un échantillon global d'un volume minimum de deux litres.

Un autre échantillon de 1500 ml est également constitué à partir d'un prélèvement de boue effectué en surface.

Echantillonnage des boues solides ou pâteuses :

Deux options sont possibles

-échantillonnage sur lot : les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de 25 prélèvements élémentaires uniformément répartis en différents points et différentes profondeurs du lot de boues destinées à être épandues. Les différents prélèvements élémentaires sont de volumes identiques pour garantir la représentativité de l'échantillon final de boue à analyser. Les prélèvements sont effectués à l'aide d'une sonde en dehors de la croûte de surface et des zones où une accumulation d'eau s'est produite. Les prélèvements élémentaires sont mélangés dans un récipient ou sur une bâche et donnent, après réduction, un échantillon d'1 kilogramme environ. Celui-ci est envoyé au laboratoire dans une bouteille en verre à bouchon étanche vissé.

-échantillonnage en continu : les échantillons représentatifs des boues soumis à l'analyse sont constitués de 25 prélèvements élémentaires régulièrement espacés au cours de la période séparant chaque envoi au laboratoire. Chaque prélèvement élémentaire doit contenir au moins 50 grammes de matière sèche, et tous doivent être identiques. Ces échantillons élémentaires sont conservés dans des conditions ne modifiant pas leur composition, puis rassemblés dans un récipient sec, propre et inerte afin de les homogénéiser de façon efficace avec l'aide d'un outil adéquat pour constituer un échantillon composite qui, après réduction éventuelle, est envoyé au laboratoire.

L'échantillon pour le laboratoire représente 500 grammes à un kilogramme de matière sèche.

Identification, conservation et envoi des échantillons :

Chaque échantillon à analyser est versé dans une bouteille en verre à bouchon étanche vissé de plus grande contenance que le volume de l'échantillon. Chaque bouteille est pourvue d'une étiquette sur laquelle sont indiquées l'adresse de l'exploitant et toute information d'identification selon les indications du laboratoire destinataire.

Les prélèvements seront codés de la manière suivante : P pour le prélèvement en profondeur et S pour le prélèvement en surface.

L'extérieur de chaque bouteille est lavé à grande eau puis fait l'objet d'une pulvérisation avec un désinfectant virucide.

Les prélèvements sont transportés sous froid positif (+4°C) dans une glacière avec des réfrigérants ou freeze-packs en quantité suffisante.

Désinfection avant sortie de la STEU :

Le matériel de prélèvement et les équipements individuels de protection sont lavés à grande eau puis font l'objet d'une pulvérisation avec un désinfectant virucide.

Expédition / destinataire :

Le transport est effectué par transporteur rapide, sous froid positif, et doit parvenir au laboratoire dans un délai maximum de 48h post-prélèvement.

Méthode d'analyse, limite de détection :

L'analyse par RT-PCR est conduite par un laboratoire

- ayant au moins une méthode RT-PCR accrédité dans sa portée d'accréditation
- et à partir d'un kit ayant fait l'objet d'une validation par le centre national de référence de l'Institut Pasteur dont la liste est disponible sur le site de la SFM : <https://www.sfm-microbiologie.org/covid-19-reactifs-evaluations/>

Ces kits validés doivent avoir une limite théorique inférieure ou égale à 100 copies de génome par prise d'essai.

Annexe 3 : Méthodologie d'échantillonnage et d'analyse pour l'évaluation du taux d'abattement en coliphages somatiques dans les boues.

Prélèvements des échantillons

Les prélèvements des boues brutes non traitées et des boues après stockage seront réalisés conformément aux prescriptions de l'annexe V de l'arrêté du 8 janvier 1998.

Prise en charge des échantillons

Le laboratoire doit effectuer un contrôle des échantillons à réception lors de l'enregistrement. Ce contrôle porte sur l'intégrité des échantillons, la conformité de l'identification, du nombre de flacons, du délai entre l'échantillonnage et la réception et de la température de l'enceinte frigorifique ($5 \pm 3^\circ\text{C}$). Le délai entre l'échantillonnage et l'analyse par le laboratoire ne doit pas dépasser 72 heures.

Méthode d'analyse

Homogénéisation

Les échantillons sont homogénéisés au blender pendant 30s avant prélèvement d'une prise d'essai de 25g (poids humide) contrôlée gravimétriquement. Cette prise d'essai est ensuite transférée dans un contenant stérile hermétique d'un volume minimal de 500mL.

Elution

Une solution tampon stérile est ajoutée jusqu'à atteindre un volume de 250mL. Un barreau aimanté stérile est ajouté et l'échantillon est agité pendant 15 à 20 minutes à température ambiante.

Clarification

L'échantillon est transféré dans un tube stérile et centrifugé à 4000g à une température de $4 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 30 min; le surnageant est récupéré.

Décontamination

Le surnageant est récupéré à l'aide d'une seringue stérile et filtré à l'aide d'un filtre seringue avec une membrane polyethersulphone de taille de pores 0,2 μm .

Le volume total à décontaminer dépend de la densité de coliphages somatiques et donc du type de boues.

Le filtrat est récupéré dans un flacon stérile hermétique et transféré immédiatement à $5 \pm 3^\circ\text{C}$ jusqu'à l'énumération qui doit être réalisée dans les 12 h.

Enumération et dénombrement des bactériophages

La méthode de détection et de dénombrement des coliphages somatiques devra reposer sur les principes des normes NF EN ISO 10705-2

Détermination du taux de matière sèche

Une analyse du taux de matière sèche est réalisée sur chaque échantillon selon les principes de la norme NF EN 12880.

Expression des résultats

Les résultats d'analyses des concentrations en coliphages sont exprimés par le laboratoire en pfu/g de matière brute (pfu : plaque forming unit) ou en pfu/g de matières sèche.

Performance de la méthode

Les principes de la norme NF EN ISO 10705-3 Qualité de l'eau - Détection et dénombrement des bactériophages - Partie 3 : validation des méthodes de concentration des bactériophages dans l'eau sont respectées et les limites de quantification et de détection suivante sont respectées :

-limite de quantification 40 UPF/g MB

-limite de détection : 10 UPF/g MB

Méthode de calcul du taux d'abattement

Les concentrations en bactériophages mesurées par le laboratoire en pfu / g de matière brute ont été converties en pfu / g de matière sèche.

Le taux d'abattement est calculé en comparant la concentration en coliphages somatiques mesurée dans les boues brutes non traitées (C0) et celle mesurée dans les boues traitées après stockage (C) :

$$\text{Taux d'abattement} = \log (C/C0)$$

C0 : concentration initiale en coliphages somatiques exprimée en pfu/ g de matière sèche

C : concentration en coliphages somatiques après la durée de stockage exprimée en pfu/ g de matière sèche

Les concentrations mesurées inférieures à la limite de détection sont remplacées par la moitié de cette limite. »

Article 2

La directrice générale de l'aménagement, du logement et de la nature, le directeur général de la prévention des risques, le directeur général de l'alimentation et le directeur général de la santé sont chargés, chacun en ce qui le concerne, de l'exécution du présent arrêté, qui sera publié au Journal officiel de la République française.

Fait le

La ministre de la transition écologique,

Pour la ministre et par délégation :

La directrice générale de l'aménagement, du logement et de la nature

S. DUPUY-LYON

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069

La ministre de la transition écologique,

Pour la ministre et par délégation :

Le directeur général de la prévention des risques

C. BOURILLET

Le ministre des solidarités et de la santé,

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur général de la santé,

J. SALOMON

Le ministre de l'agriculture et de l'alimentation,

Pour le ministre et par délégation :

Le directeur général de l'alimentation,

B. FERREIRA

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

**Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056,
2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069**

**ANNEXE 5 : RAPPORT D'APPUI SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE DE L'ANSES- LABORATOIRE
D'HYDROLOGIE DE NANCY ANSES) REPONSE AUX QUESTIONS 2 ET 4 - SAISINE 2020-SA-0137**

Demande d'avis sur le projet d'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de Covid-19

Partie Analyse du SARS-CoV-2 dans les boues avant épandage

Demande 2020-SA-0137

Saisines liées : 2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056, 2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069

RAPPORT
d'appui scientifique et technique

Janvier 2021

Mots clés

SARS-CoV-2, Coronavirus, Boue résiduaire, Epandage, RT-PCR.

Keywords

SARS-CoV-2, Coronavirus, Sewage sludge, Land application, RT-PCR.

Présentation des intervenants

PRÉAMBULE : Les experts, membres du laboratoire, de comités d'experts spécialisés, de groupes de travail ou désignés rapporteurs sont tous nommés à titre personnel, *intuitu personae*, et ne représentent pas leur organisme d'appartenance.

PARTICIPATION ANSES

Coordination scientifique

M. Benoît GASSILLOUD – Chef d'unité de microbiologie des eaux du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy – ANSES.

M. Thierry CHESNOT – Adjoint chef d'unité de microbiologie des eaux du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy – ANSES.

Contribution scientifique

M. Jean-Francois MUNOZ – Directeur du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy – ANSES.

Secrétariat administratif

Mme Sophie MARCHAL – Documentaliste du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy – ANSES.

AUDITION DE PERSONNALITÉS EXTÉRIEURES

ADEME

Mme Isabelle DEPORTES – Ingénieure impacts sanitaires et environnementaux de la gestion des déchets. Service Mobilisation et Valorisation des Déchets.

COFRAC

Mme Céline BEAUGEARD – Responsable d'accréditation - Pôle Biologie-Agroalimentaire | Section Laboratoires.

M. Stéphane BOIVIN – Responsable du pôle Chimie - Environnement | Section Laboratoires.

Mme Safaa KOBBI-ABIL – Responsable du pôle Biologie -Agroalimentaire | Section Laboratoires.

Mme Claire POULLY – Responsable d'accréditation - Pôle Chimie-Environnement | Section Laboratoires.

Laboratoire des Eaux de Paris pour le réseau « OBEPINE »

M. Laurent MOULIN – Responsable du département recherche et développement.

Laboratoire LABOCEA

Mme Camille LEVESQUE NINIO – Cheffe de service Virologie PCR.

CONTRIBUTIONS EXTÉRIEURES À L'AGENCE

Sans objet

SOMMAIRE

| | |
|---|------------|
| Présentation des intervenants | 104 |
| Synthèse..... | 108 |
| Sigles et abréviations | 111 |
| Liste des tableaux..... | 112 |
| Liste des figures | 112 |
| 1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux..... | 113 |
| 1.1 Contexte..... | 113 |
| 1.2 Objet de la demande | 114 |
| 1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation..... | 114 |
| 2 Présentation du questionnaire | 115 |
| 2.1 Liste des informations demandées..... | 115 |
| 2.1.1 Informations techniques générales relatives au statut du laboratoire et à son expérience sur des matrices environnementales complexes | 115 |
| 2.1.2 Informations concernant l'étape de désorption des particules virales des boues et leur concentration | 115 |
| 2.1.3 Informations concernant l'étape d'extraction et purification du génome viral..... | 115 |
| 2.1.4 Informations concernant l'étape d'amplification du génome viral par RT-PCR..... | 117 |
| 2.1.5 Informations concernant l'expression des résultats | 118 |
| 2.1.6 Informations relatives aux capacités analytiques par culture cellulaire et à l'intérêt de participer à un EIL | 118 |
| 3 Données brutes des réponses au questionnaire | 120 |
| 3.1 Informations techniques générales relatives au statut du laboratoire et à son expérience sur des matrices environnementales complexes | 120 |
| 3.2 Informations concernant l'étape de désorption des particules virales des boues et leur concentration | 124 |
| 3.3 Informations concernant l'étape d'extraction et purification du génome viral..... | 125 |
| 3.4 Informations concernant l'étape de détection/quantification du génome viral par RT-PCR | 128 |
| 3.5 Informations concernant l'expression des résultats | 130 |
| 3.6 Informations en lien avec les capacités analytiques par culture cellulaire et avec l'intérêt de participer à un EIL | 132 |
| 4 Exploitation des données de l'enquête | 134 |
| 4.1 Préparation de l'échantillon par élution et/ou concentration | 134 |
| 4.2 Extraction et purification du génome viral | 134 |
| 4.3 Amplification du génome viral | 134 |
| 4.4 Expression des résultats | 135 |
| 5 Synthèse des informations issues des audits | 136 |

| | | |
|----------------|--|------------|
| 5.1 | Laboratoire A | 136 |
| 5.1.1 | Contexte du retour d'expérience..... | 136 |
| 5.1.2 | Mode opératoire retenu par le laboratoire et résultats observés..... | 136 |
| 5.1.3 | Limites identifiées lors de l'entretien..... | 137 |
| 5.2 | Laboratoire B | 137 |
| 5.2.1 | Contexte du retour d'expérience..... | 137 |
| 5.2.2 | Mode opératoire retenu par le laboratoire et résultats observés..... | 137 |
| 5.2.3 | Limites identifiées..... | 138 |
| 5.2.4 | Éléments de validation..... | 139 |
| 5.3 | Réutilisation et surveillance microbiologiques des boues pour épandage, ADEME, Mme Isabelle DEPORTES | 139 |
| 5.4 | Accréditation, COFRAC | 139 |
| 5.5 | Réseau OBEPINE, M. Laurent MOULIN | 140 |
| 6 | Analyse critique des contraintes analytiques et des données bibliographiques associées | 141 |
| 6.1 | Préambule..... | 141 |
| 6.2 | Désorption et concentration des particules virales..... | 142 |
| 6.3 | Extraction et purification de l'ARN viral..... | 144 |
| 6.4 | Amplification de l'ARN viral..... | 146 |
| 6.5 | Validation des méthodes..... | 147 |
| 6.5.1 | Spécificité analytique..... | 147 |
| 6.5.2 | Limite de détection..... | 148 |
| 6.5.3 | Rendement..... | 148 |
| 6.6 | Expression des résultats..... | 149 |
| 6.7 | Synthèse méthodologique..... | 150 |
| 7 | Recommandations en lien avec les points critiques identifiés | 153 |
| 8 | Mode opératoire de référence | 156 |
| 9 | Conclusions | 157 |
| 10 | Bibliographie | 159 |
| ANNEXES | | 162 |
| | Annexe 1 : Données communiquées par les laboratoires en mesure de réaliser l'ensemble du processus analytique pour la détection / quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues..... | 163 |
| | Annexe 2 : Éléments de calculs concernant la détermination de la limite de détection de génome de SARS-CoV-2 dans les boues..... | 166 |
| | Annexe 3 : Lettre de la demande..... | 168 |
| | Annexe 4 : Suivi des actualisations du rapport..... | 171 |

Synthèse

L'excrétion fécale du SARS-CoV-2 interroge sur les risques de contamination des individus via les matrices résiduelles : la surveillance des niveaux de contamination des boues destinées à être épanchées se pose. Deux stratégies ont été proposées, l'une s'appuie sur le suivi d'indicateurs de traitement que constituent les bactériophages cultivables, l'autre repose sur la détection du génome de SARS-CoV-2 afin de distinguer les boues contaminées de celles caractérisées par une absence de détection du génome viral. Les méthodes de culture des bactériophages sont connues et normalisées, ce qui n'est pas le cas des méthodes de détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les matrices environnementales complexes telles que les boues d'origine résiduelle.

La Direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale de l'alimentation, ont élaboré un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 afin de faire évoluer le cadre réglementaire relatif à l'épandage des boues pendant la crise sanitaire. L'ANSES a été sollicitée pour donner son avis sur le projet d'arrêté et notamment au travers d'un appui scientifique et technique du Laboratoire d'Hydrologie de Nancy afin de préciser les modalités qui pourraient s'appliquer à un protocole d'analyse de référence du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. L'objectif est de disposer de résultats analytiques suffisamment robustes, pour autoriser, en toute sécurité, l'épandage des boues sans hygiénisation.

L'utilisation de la RT-PCR pour des échantillons environnementaux et notamment des matrices résiduelles, nécessite de répondre aux spécificités de ces échantillons dont la charge virale est diluée dans un milieu complexe, riche en composés inhibiteurs de RT-PCR et propice à l'adsorption sur les matières en suspension. Des méthodes de désorption, de concentration, et de purification doivent donc s'ajouter à l'étape d'extraction génomique qui est généralement l'unique étape qui s'applique aux échantillons cliniques. Au travers d'un questionnaire, le LHN a recueilli les pratiques des laboratoires ayant développé ou acquis des compétences sur l'ensemble du processus analytique, c'est-à-dire depuis le prélèvement jusqu'à la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Cette démarche a été complétée en réalisant l'audition de deux laboratoires identifiés comme ayant acquis un retour d'expérience significatif dans la recherche du génome de SARS-CoV-2 dans les boues liquides et/ou solides. Les compétences des laboratoires du réseau « OBEPINE » concernant l'analyse des boues ont également été examinées. Par ailleurs, l'ADEME et le COFRAC ont été consultés pour recueillir des informations permettant de situer le positionnement des méthodes de biologie moléculaire à des fins de recherche et développement ou encore de surveillance des boues de stations d'épuration et des matrices similaires. Enfin, une analyse bibliographique des publications scientifiques récentes a été réalisée. Ces différentes sources d'informations ont été confrontées pour identifier les points méthodologiques critiques et dresser un constat des besoins en termes de validation.

46 laboratoires agréés ont répondu de manière déclarative dont 7 ont mis en place la totalité de la filière analytique. Leurs réponses montrent une grande hétérogénéité dans les pratiques sur l'ensemble du processus, depuis le prélèvement et la préparation des échantillons, jusqu'à l'extraction et l'étape de détection/quantification du génome qui s'en suit. Sur les 7 laboratoires qui disposent d'une méthode applicable aux boues, 2 ne la réalisent que sur des boues liquides. Le réseau « OBEPINE » qui regroupe des laboratoires académiques en relation avec quelques laboratoires d'analyses d'échantillons environnementaux, dispose de modes opératoires adaptés aux eaux usées. Cependant les protocoles ne sont que partiellement harmonisés entre les différents membres du réseau et ne sont pas directement transposables à la matrice boue. Une dizaine de publications récentes traite également de manière directe ou indirecte de la détection/quantification du génome dans les boues liquides ou solides.

Les données indiquent que les rendements de désorption et de concentration à partir des boues sont fortement dépendants de la méthode utilisée et de la nature du virus recherché. De plus les étapes de désorption et de concentration pourraient co-concentrer des inhibiteurs de PCR. Certains laboratoires considérant la faiblesse des rendements de récupération, leur variabilité en fonction des échantillons et les risques accrus d'inhibition de la RT-PCR, ont fait le choix de s'affranchir des étapes de désorption et de concentration en réalisant les analyses à partir de faibles prises d'essai typiquement inférieures à 1 g de matière brute. Cette pratique pose néanmoins la question de la représentativité des résultats obtenus, notamment lorsqu'on la confronte aux modalités actuelles de rendu des analyses microbiologiques des boues épanchées dont les seuils réglementaires sont exprimés pour 10 g de matière sèche.

Il semblerait préférable de conserver une étape de désorption et concentration permettant de traiter des prises d'essais représentatives cependant il n'existe pas à l'heure actuelle de mode opératoire consensuel ni parmi les participants à notre enquête, ni dans la bibliographie. Au regard de son impact particulièrement critique, il conviendrait que le choix de retenir ou non une étape de désorption/concentration fasse l'objet d'une étude de validation, permettant de définir le niveau de prise d'essai le plus adapté ainsi que les caractéristiques de la solution éluante et les modalités de remise en suspension, d'éluion et de concentration des particules virales de SARS-CoV-2 à partir des boues liquides et des boues solides.

Consécutivement à l'étape de désorption et de concentration, une étape d'extraction et de purification de l'ARN viral doit être réalisée. Malgré la mise en œuvre de kits commerciaux adaptés à la complexité des matrices de type boues résiduelles certains laboratoires de l'enquête, tout comme la bibliographie du domaine, alertent sur la persistance de phénomènes d'inhibition avec pour conséquence un risque significatif de dégradation de la limite de détection de la RT-PCR. Une évaluation des méthodes d'extraction et de purification de l'ARN viral devrait être réalisée en prenant en compte les différentes combinaisons de lyse (mécanique, chimique, thermique), les différentes solutions de purification et notamment l'utilisation de colonne de silice ou de billes magnétiques de silice, ainsi que les procédés de capture d'inhibiteurs en solution ou sur colonne. La capacité d'automatisation du procédé d'extraction devrait également être considérée car elle pourrait permettre d'améliorer la robustesse de la méthode. Comme pour l'étape de désorption/concentration, les critères d'évaluation devraient porter prioritairement sur les rendements d'extraction et la capacité à éliminer les inhibiteurs de RT-PCR, aussi bien à partir d'échantillons naturellement contaminés qu'à partir d'échantillons artificiellement contaminés par des virus modélisant le comportement des virus enveloppés.

Concernant l'étape d'amplification, les zones du génome ORF1ab/RdRp et le gène E sont actuellement majoritaires dans les modes opératoires des laboratoires consultés pendant l'enquête. Il conviendrait cependant d'évaluer les performances analytiques des cibles localisées sur le gène N décrites dans la bibliographie afin de préciser leur intérêt et de définir *a minima* la nature des 2 voire 3 zones codantes à cibler et plus précisément encore les séquences des systèmes de RT-PCR de référence à utiliser par les laboratoires. La spécificité analytique (capacité à ne détecter que le coronavirus SARS-CoV-2) et la sensibilité analytique (limite de détection) seraient retenues comme critères de comparaison. Il conviendrait d'abord de comparer les performances relatives des différents systèmes sur la base des résultats qualitatifs avant d'envisager une comparaison sur une base quantitative. En effet, en l'absence d'un matériau de référence consensuel et partagé et en l'absence d'EILs, des écarts conséquents de quantification sont susceptibles d'être observés pour un même extrait : il semble donc prématuré de comparer les concentrations d'échantillons qui seraient déterminées dans différents laboratoires. En revanche, les quantifications réalisées au sein d'un même laboratoire sont comparables entre elles, par exemple au sein d'une filière de traitement ou dans le cadre de l'évaluation d'une cinétique de dégradation. Enfin, la RT-ddPCR n'a été que peu explorée et pourrait pourtant s'avérer utile pour améliorer la robustesse analytique notamment en limitant l'impact des inhibiteurs de RT-PCR et les biais liés à la quantification.

Au niveau de l'expression des résultats, il doit être retenu que la capacité d'un laboratoire à détecter la présence de génome dans un échantillon est liée à la limite de détection du mode opératoire qu'il emploie. Cette dernière est elle-même influencée par la prise d'essai initiale, les caractéristiques de l'échantillon et les performances du mode opératoire. Par conséquent faute d'un mode opératoire de référence il ne peut être exclu, notamment pour les échantillons les moins contaminés, que différents laboratoires puissent aboutir à des résultats divergents quant à la présence ou non de génome de SARS-CoV-2. Pour ces raisons il semble indispensable que les laboratoires accompagnent les résultats qualitatifs d'informations contextuelles et en particulier de la limite de détection correspondante à l'analyse de l'échantillon concerné. De plus, afin de faciliter la comparaison des résultats entre échantillons et entre laboratoires, les résultats devraient être exprimés par rapport à la matière sèche et non par rapport à la matière brute. La détermination de la matière sèche à partir de la norme applicable pour les boues à savoir la NF EN 12 880 apparaîtrait alors comme une compétence de base dont l'accréditation serait souhaitable.

Il peut être noté que les laboratoires de biologie médicale qui réalisent les tests de diagnostic humain, doivent être préalablement accrédités ou en démarche d'accréditation et disposer d'une portée incluant la technique de RT-PCR. Concernant l'analyse microbiologique des boues, un seul laboratoire est accrédité à ce jour. Cette accréditation concerne la quantification d'entérovirus cultivables ainsi que la quantification de leur génome par RT-PCR. A défaut de normes analytiques dédiées à l'analyse des paramètres microbiologiques par PCR ou RT-PCR dans la matrice boue, les laboratoires candidats à une accréditation seraient actuellement dans l'obligation de recourir à des méthodes internes. Qu'il s'agisse des matières fertilisantes (MF), des supports de culture (SC) ou des boues, en dehors du laboratoire mentionné ci-dessus, l'état actuel des accréditations ne permet pas d'identifier de laboratoires disposant de compétences analytiques par biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) pour les paramètres microbiologiques sur ces matrices. Il serait donc difficile d'aboutir rapidement à l'accréditation de laboratoires pour la détection/quantification spécifique du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Une stratégie alternative pourrait être d'identifier les laboratoires disposant d'une bonne connaissance des matrices boues et MF/SC du point de vue des analyses microbiologiques conventionnelles et qui par ailleurs, disposeraient d'accréditation en PCR ou RT-PCR sur d'autres matrices. Les laboratoires qui exercent en plus de leur activité MF/SC, des activités en lien avec la santé animale ou végétale pourraient correspondre à ce profil.

Il doit être retenu que la diversité constatée à toutes les étapes des modes opératoires actuellement mis en œuvre par les laboratoires pourrait conduire à des performances analytiques significativement différentes. Dans l'attente d'un protocole analytique consensuel et partagé, il convient donc que chaque laboratoire puisse caractériser les performances et les limites de sa méthode afin de fixer des critères de validité des résultats d'analyse et statuer sur la recevabilité des résultats obtenus pour un échantillon donné.

En l'absence de donnée issue d'un plan d'expériences visant à identifier et comparer les performances des différentes stratégies analytiques, et en l'absence d'un nombre suffisant de publications, il paraît impossible de dresser des recommandations sur un mode opératoire de référence complet. Une démarche d'évaluation globale pourrait être engagée pour comparer et déterminer les modalités analytiques les plus performantes pour chacune des étapes de préparation de l'échantillon puis d'analyse. Il s'agirait de caractériser une méthode de référence afin de disposer d'éléments en lien avec la répétabilité, la robustesse et le rendement global. Idéalement ces éléments pourraient être évalués par un laboratoire référent puis préciser par le déroulement d'un EIL sous réserve que ce dernier implique un nombre suffisant de participants ($n > 10$). Dans l'attente, ce rapport intègre des préconisations en lien avec les points critiques identifiés. Ces préconisations concernent les différentes étapes de l'analyse ainsi qu'un recensement des informations qu'il serait utile d'indiquer sur les rapports d'analyses afin d'éclairer l'interprétation des résultats concernant la recherche de génome de SARS-CoV-2 dans les boues.

Sigles et abréviations

| | |
|--------------|--|
| ADEME : | Agence de la transition écologique |
| ADN : | Acide désoxyribonucléique |
| ARN : | Acide ribonucléique |
| AQUAREF : | Laboratoire national de référence pour la surveillance des milieux aquatiques |
| BCoV : | Bovine coronavirus |
| BSA : | Bovin serum albumin |
| CE : | Conformité européenne |
| COFRAC : | Comité français d'accréditation |
| COVID-19 : | Coronavirus disease 2019 |
| CRECEP : | Centre de recherche, d'expertise et de contrôle des eaux de Paris |
| CNR : | Centre national de référence |
| DASRI : | Déchet d'activité de soin à risque infectieux, |
| EDP : | Eaux de Paris |
| EIL : | Essais inter-laboratoires |
| FDA : | Food drug administration |
| HAS : | Haute autorité de santé |
| HCoV : | Human coronavirus |
| INRAE : | Institut national de recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement |
| ISO : | International organization for standardization |
| LD : | Limite de détection |
| LHN : | Laboratoire d'hydrologie de Nancy |
| MB : | Matière brute |
| MES : | Matières en suspension |
| MF/SC : | Matières fertiles / Supports de culture |
| MHV : | Murine hepatitis virus |
| MS : | Matière sèche |
| NSB : | Niveau de sécurité biologique |
| PEDV : | Porcine epidemic diarrhea virus |
| PEG : | Polyethylene glycol |
| PBS : | Phosphate buffered saline |
| PCR : | Polymerase chain reaction |
| OFB : | Office français de la biodiversité |
| ORF : | Open reading frame |
| RdrP : | RNA-dependent RNA polymerase |
| RT-PCR : | Reverse transcriptase polymerase chain reaction |
| RT-ddPCR : | Reverse transcriptase droplet digital polymerase chain reaction |
| SARS-CoV-2 : | Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 |
| STEU : | Station d'épuration des eaux usées |
| UG : | Unité génome |
| WBE : | Wastewater based epidemiology |

Liste des tableaux

| | |
|--|------------|
| Tableau 1. Filières de stockage et de traitement des boues suivies dans l'étude du LNE (2020) et nombre de STEU correspondant. Extrait de LNE (2020) | 15 |
| Tableau 2 : Synthèse des filières de traitements/stockage pouvant être retenues sur la base du rapport du LNE (2020) de suivi des bactériophages..... | 23 |
| Tableau 3 : Liste des questions concernant les informations techniques générales, les modalités de prélèvement, et la biosécurité au laboratoire | 116 |
| Tableau 4 : Liste des questions relatives à l'étape de désorption/concentration des particules virales | 117 |
| Tableau 5 : Liste des questions relatives à l'étape d'extraction/purification du génome viral | 117 |
| Tableau 6 : Liste des questions relatives à l'étape d'amplification du génome viral..... | 119 |
| Tableau 7 : Liste des questions concernant les informations relatives à l'étape d'amplification du génome viral..... | 119 |
| Tableau 8 : Liste des questions diverses..... | 119 |
| Tableau 9 : Recommandations en lien avec les points critiques identifiés pour la détection de génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons de boues..... | 153 |
| Tableau 10 : Recensement des modalités retenues par les laboratoires disposant de compétences sur l'ensemble du processus analytique des boues pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues – Etapes de préparation de l'échantillon et d'extraction/purification du génome viral..... | 164 |
| Tableau 11 : Recensement des modalités retenues par les laboratoires disposant de compétences sur l'ensemble du processus analytique des boues pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues – Etapes d'amplification et d'expression des résultats..... | 165 |
| Tableau 12 : Exemples de calculs d'une limite de détection en l'absence d'étapes préalables de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements théoriques à 100 % (configuration 1)..... | 166 |
| Tableau 13 : Exemples de calculs d'une limite de détection en l'absence d'étapes préalables de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements évalués à partir d'une hypothèse non confirmée (configuration 2)..... | 166 |
| Tableau 14 : Exemples de calculs d'une limite de détection en intégrant une étape préalable de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements théoriques à 100 % (configuration 1)..... | 167 |
| Tableau 15 : Exemples de calculs d'une limite de détection en intégrant une étape préalable de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements évalués à partir d'une hypothèse non confirmée (configuration 2)..... | 167 |

Liste des figures

| | |
|---|------------|
| Figure 1. Répartition des STEU selon leur capacité nominale en France en 2016 (source site internet du Ministère chargé de l'écologie - base de données Roseau d'après site internet) et dans l'échantillon de l'étude de LNE (2020) | 14 |
| Figure 2 : Représentation schématique des différentes méthodes applicables pour la concentration des virus (Lu <i>et al.</i> 2020) | 143 |
| Figure 3 : Organisation du génome et structure du SARS-CoV-2 (Yuan <i>et al.</i> 2020) | 146 |

1 Contexte, objet et modalités de réalisation des travaux

1.1 Contexte

Depuis le début de l'épidémie de COVID-19, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'ARN du SARS-COV-2 dans les eaux usées. Cela a conduit l'Etat à interroger l'ANSES sur les risques de propagation du virus *via* l'épandage des boues d'épuration urbaines sur les sols agricoles et les éventuelles mesures à prendre pour limiter ce risque. L'ANSES a rendu un avis le 27 mars 2020 sur ce questionnement. Sur cette base, l'Etat a conditionné, *via* l'arrêté du 30 avril 2020, l'épandage de boues sur les sols agricoles, en forêt ou à des fins de végétalisation ou de reconstitution de sols, à leur hygiénisation préalable. Cette disposition concerne toutes les boues extraites après la date d'entrée en zone d'exposition à risque pour la COVID-19.

Aussi, dans le cadre d'une saisine complémentaire, ont été adressés le 15 mai 2020 par le ministère de la transition écologique, 2 projets de protocoles dans le but d'étudier le taux d'abattement de bactériophages dans les boues dans l'attente d'une méthode reconnue du suivi du SARS-CoV-2. Dans ses conclusions, publiées le 19 juin 2020, l'agence confirmait l'intérêt des protocoles pour valider les indicateurs d'efficacité de traitement d'inactivation virale.

De plus, dans cette même note du 19 juin 2020, l'agence préconisait « en première intention de procéder pour les boues non hygiénisées, à la recherche de génome viral du SARS-CoV-2 directement dans ces boues » en précisant que « l'absence de génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues analysées, dans les conditions de contrôle qualité adaptées, est synonyme d'absence de SARS-CoV-2 infectieux ». Les modalités opérationnelles à respecter pour la réalisation de ces analyses par RT-PCR nécessitent d'être confirmées, et le cas échéant complétées, afin que les résultats obtenus et délivrés par les laboratoires d'analyses soient suffisamment robustes, pour autoriser, en toute sécurité, l'épandage des boues sans hygiénisation.

Par ailleurs, considérant que les dates d'entrée en zone d'exposition à risques ont été définies pour chaque département sur la base du taux d'incidence hebdomadaire de la COVID-19 publié chaque semaine par Santé Publique France, il est apparu envisageable, et cohérent d'utiliser à nouveau cet indicateur pour évaluer la situation épidémique d'un département et déterminer si l'épandage des boues est possible ou non. Cependant des difficultés ont été mises en avant sur l'applicabilité de cet indicateur, défini pour chaque département, à l'échelle d'une station de traitement des eaux usées en raison des éventuelles zones de concentration du virus qui pourraient être masquées à l'échelle départementale mais qui auraient un effet sur la qualité des boues localement. L'ensemble de ces éléments a conduit la Direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, la Direction générale de la prévention des risques et la Direction générale de l'alimentation, à élaborer un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 afin de faire évoluer le cadre réglementaire relatif à l'épandage des boues pendant la crise sanitaire.

S'agissant du prélèvement et de l'analyse du SARS-CoV-2, l'émergence fulgurante de ce virus à l'origine de la pandémie n'a pas permis de mettre en place un travail de standardisation des méthodes appliquées dans le cas des contrôles réglementaires et officiels. Cette standardisation est classiquement réalisée en tenant compte de résultats analytiques obtenus à l'issue d'études de validation par un ou plusieurs laboratoires sur l'ensemble des étapes entre le prélèvement et l'analyse, intégrant des contrôles de qualité et des indicateurs de performance. Dans le domaine de l'eau, la standardisation des méthodes fait intervenir différents acteurs qui sont les laboratoires d'analyses compétents dans le domaine, les laboratoires de référence (le LHN pour la santé et Aquaref pour l'environnement), les experts siégeant dans les commissions de normalisation du domaine considéré, mais aussi des spécificités organisationnelles en lien avec la réalisation de programmes édités par le COFRAC. Ce travail de standardisation prend également en compte en complément des données de validation mentionnées ci-dessus, les résultats des circuits d'intercomparaison et d'aptitudes s'ils sont disponibles et qui peuvent être fournis par des organismes de comparaison interlaboratoires. Le respect de cette organisation, permet de proposer au final aux administrations et aux laboratoires concernés, des méthodes de référence fiables, robustes, comparables, auditables et opposables qui peuvent être portées dans un

second temps à la normalisation française, européenne ou internationale (ISO). Dans le cas du SARS-CoV-2, en l'absence d'un mandat permettant aux laboratoires de référence de mettre en place l'animation scientifique et technique nécessaire, ce travail de standardisation n'a pas pu être initié. Par ailleurs, dans le cadre d'un projet de recherche financé par le MESRI, des laboratoires académiques ont pris l'initiative de constituer un réseau d'échanges et de prélèvements afin de constituer un observatoire épidémiologique de la présence du SARS-CoV-2 dans les eaux usées (réseau « OBEPINE¹⁴ »), en tant qu'indicateur environnemental de propagation de l'épidémie. Plusieurs laboratoires de contrôle ont rejoint ce réseau pour alimenter la collecte d'échantillons, sans travaux d'optimisation ou de standardisation de méthode, mais avec un premier essai d'intercomparaisons sur des eaux résiduaires (non publié).

1.2 Objet de la demande

L'ANSES a été sollicitée pour donner son avis sur le projet d'arrêté et plus particulièrement pour cet appui scientifique et technique, le laboratoire d'hydrologie de Nancy est consulté pour formuler des recommandations concernant l'utilisation de la RT-PCR en lien avec :

- la méthode de préparation des échantillons, la prise d'essai, la méthode d'extraction du virus de la matrice boue et la méthode d'extraction des acides nucléiques qu'il conviendrait de préciser dans le protocole d'échantillonnage et d'analyse du génome du SARS-CoV-2.
- la matrice pour laquelle l'accréditation sur la méthode RT-PCR est requise.

1.3 Modalités de traitement : moyens mis en œuvre et organisation

L'objectif étant de connaître les pratiques développées par les laboratoires de la profession pour rechercher la présence du virus SARS-CoV-2 dans les matrices résiduaires, un questionnaire (Anses 2020d) a été adressé à l'ensemble des laboratoires disposant des agréments environnement sur les eaux résiduaires ou des agréments de microbiologie sur les eaux de consommation. Ce questionnaire avait pour vocation de recueillir des informations concernant le prélèvement, la préparation des échantillons, le descriptif des analyses de recherche du génome par RT-PCR, ainsi que les capacités de confinement des laboratoires, le retraitement des déchets,

Le LHN a complété la démarche en réalisant l'audition de 2 laboratoires identifiés comme ayant acquis un retour d'expérience significatif dans la recherche du génome de SARS-CoV-2 dans les boues liquides et/ou solides. Les compétences des laboratoires du réseau « OBEPINE » concernant l'analyse des boues ont également été examinées. Enfin le LHN s'est rapproché de l'ADEME et du COFRAC pour recueillir des informations permettant de situer le positionnement des méthodes de biologie moléculaire à des fins de recherche et développement ou de surveillance des boues de stations d'épuration et des matrices similaires. Une analyse bibliographique des publications scientifiques récentes a été réalisée pour compléter les données des pratiques professionnelles recueillies auprès des laboratoires.

¹⁴ Présentation du réseau OBEPINE disponible en ligne : <https://www.reseau-obepine.fr/presentation-du-reseau-obepine/>

2 Présentation du questionnaire

Ce questionnaire a été rédigé afin de recueillir les pratiques des laboratoires ayant développé ou acquis des compétences sur l'ensemble du processus analytique, c'est-à-dire depuis le prélèvement jusqu'à la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Il a été diffusé en novembre 2020 dans le prolongement d'un premier questionnaire envoyé en avril 2020, lequel était destiné à dresser un état des lieux des capacités analytiques des laboratoires agréés dans les matrices résiduelles (eaux usées et boues) lors du premier confinement.

2.1 Liste des informations demandées

2.1.1 Informations techniques générales relatives au statut du laboratoire et à son expérience sur des matrices environnementales complexes

Cette rubrique visait à déterminer le retour d'expérience du laboratoire d'une part sur les prélèvements et analyses portant sur les matrices environnementales complexes et d'autre part sur l'analyse par (RT)-PCR de génome viral quelle que soit la matrice. L'organisation concernant la mise en place de la biosécurité en lien avec la réalisation des analyses sur ce type de virus a également été abordée. Concernant le retour d'expérience sur des matrices environnementales complexes, le choix a été fait de cibler les matières fertilisantes et les supports de culture qui à la connaissance du LHN sont celles pour lesquelles les contrôles microbiologiques sont à ce jour les plus nombreux et encadrés. Les questions posées aux laboratoires sont disponibles dans le tableau 1 ci-après.

2.1.2 Informations concernant l'étape de désorption des particules virales des boues et leur concentration

Bien qu'il ne s'agisse pas de virus enveloppés, la quantification des entérovirus cultivables dans les boues destinées à être épandues est l'analyse qui se rapproche actuellement le plus de la détection/quantification du génome du SARS-CoV-2 envisagée dans les boues. Des éléments méthodologiques décrivant la nécessité de réaliser une phase d'extraction/concentration sont mentionnés dans l'arrêté de 1998, qui encadre l'épandage des boues hygiénisées. Il s'agit d'une technique usuelle pour réaliser l'analyse à partir d'une fraction de quelques grammes à quelques dizaines de grammes d'un échantillon de boue. Cette pratique vise à désorber les virus adsorbés aux matières organiques des boues grâce à l'usage d'un tampon d'éluion. Classiquement l'éluât qui en résulte fait l'objet d'une étape complémentaire permettant de concentrer les particules virales dans un faible volume. La combinaison de ces deux étapes offre au final l'opportunité d'accroître la fraction d'échantillon analysée. Les questions posées aux laboratoires relatives à cette étape sont disponibles dans le tableau 2 ci-après.

2.1.3 Informations concernant l'étape d'extraction et purification du génome viral.

La recherche de particules virales par le biais de méthodes moléculaires (typiquement par RT-PCR), nécessite de mettre en place préalablement une étape visant à extraire et isoler le génome du virus. Cette étape est communément nommée « extraction génomique ». Les boues d'origine résiduelle constituent une matrice complexe dont la composition est liée à la nature des eaux traitées. Dans cet environnement, au cours de cette étape d'extraction, les génomes viraux constitués d'ARN sont sujets à un risque de dégradation par le biais de molécules biologiques présentant une activité enzymatique (activité ribonucléasique). Les composants chimiques, d'origine organique ou minérale peuvent altérer cette étape et l'amplification par RT-PCR qui suit du fait de phénomènes d'inhibition de l'amplification. L'enjeu de la phase d'extraction est double : le procédé d'extraction doit permettre de libérer et conserver l'intégrité du génome viral à ARN tout en éliminant les nombreux inhibiteurs de PCR que renferment les boues. La phase d'extraction/purification des génomes à ARN dans la matrice boue revêt un caractère beaucoup plus complexe que dans d'autres échantillons environnementaux qui doit être pris en compte par les laboratoires. Les questions posées aux laboratoires relatives à cette étape sont disponibles dans le tableau 3 ci-après.

Tableau 3 : Liste des questions concernant les informations techniques générales, les modalités de prélèvement, et la biosécurité au laboratoire

| |
|--|
| Nature des agréments du laboratoire : |
| Niveau de sécurité biologique (NSB2...) le plus élevé disponible au laboratoire : |
| Avez-vous une activité en place au laboratoire concernant les analyses microbiologiques des matières fertilisantes (MF) et supports de culture (SC) ? |
| - Si oui, cette activité sur fertilisants ou supports de culture est-elle accréditée ? |
| Disposez-vous d'une accréditation selon la NF EN ISO 17025 concernant la détection ou la quantification de génome viral par (RT)-PCR (quels que soient le virus et la matrice) ? |
| - Si, oui s'agit-il d'une accréditation en portée fixe ou flexible ? |
| <u>Modalités d'échantillonnage :</u> |
| - Activités déjà en place au laboratoire : |
| - Suivez-vous des dispositions particulières pour l'échantillonnage (norme, guide, texte réglementaire, ...) ? |
| - Si oui, précisez le support de référence sur lequel vous vous appuyez : |
| <u>Concernant les boues liquides :</u> |
| - Réalisez-vous des prélèvements sur boues liquides ? |
| - Modalités de prélèvement (prélèvement ponctuel ou multiple, ...) ? |
| - Quel volume de boue est habituellement mis à disposition du laboratoire ? |
| - Déterminez-vous systématiquement la matière sèche sur l'échantillon ? |
| <u>Concernant les boues solides ou pâteuses :</u> |
| - Quelle masse de boue est habituellement mise à disposition du laboratoire ? |
| - Déterminez-vous systématiquement la matière sèche sur l'échantillon ? |
| <u>Concernant la biosécurité :</u> |
| - Avez-vous mis en place des dispositions particulières en termes de biosécurité pour le prélèvement des boues susceptibles de contenir du SARS-CoV-2 ? |
| - Si oui, précisez (ex : EPI spécifiques, flaconnage et conditionnement spécifique, ...) : |

Tableau 4 : Liste des questions relatives à l'étape de désorption/concentration des particules virales

| |
|--|
| Réalisez-vous une étape d'extraction/concentration ? |
| - Si oui précisez brièvement l'étape d'extraction : |
| - Le cas échéant, précisez la méthode de concentration utilisée (ultracentrifugation, précipitation, ...) |
| Indiquez sur quel type de boue ce mode opératoire est appliqué dans votre laboratoire : |
| La prise d'essai est-elle réalisée à partir de la matière brute ou de la matière sèche ? |
| Boues liquides : |
| - Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ? |
| Boues solides ou pâteuses : |
| - Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ? |
| Quel est le volume final disponible suite à cette étape d'extraction/concentration ? |
| Avez-vous des données de validation du mode opératoire d'extraction/concentration ? |
| Quel est le plus haut niveau de sécurité du laboratoire dans lequel ces étapes d'extraction/concentration peuvent être réalisées ? |

Tableau 5 : Liste des questions relatives à l'étape d'extraction/purification du génome viral

| |
|--|
| Cette activité est-elle déjà en place dans votre laboratoire ? |
| - Si oui, précisez sur quel(s) virus et quelle(s) matrice(s) : |
| Disposez-vous d'un mode opératoire d'extraction/purification applicable à la détection/quantification de SARS-CoV-2 ? |
| - Si oui s'agit-il d'un protocole interne ou d'un kit commercial ? |
| Description sommaire du principe du mode opératoire et autres informations utiles : |
| Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ? |
| Utilisez-vous des témoins positifs d'extraction pour vérifier les performances du système d'extraction ? |
| - Si oui, précisez les modalités de mise en œuvre et les critères d'acceptation : |
| Avez-vous des données de validation du mode opératoire d'extraction/purification ? |
| - Si oui précisez : |
| Quel est le plus haut niveau de sécurité du laboratoire dans lequel ces étapes d'extraction génomique peuvent être réalisées ? |

2.1.4 Informations concernant l'étape d'amplification du génome viral par RT-PCR.

La détection/quantification du génome viral se fait par amplification du génome extrait au cours de plusieurs cycles thermiques via le biais d'une enzyme polymérase et de fragments nucléotidiques spécifiques des gènes viraux ciblés. Pour les virus à ARN, il est nécessaire préalablement d'effectuer une étape de rétrotranscription (RT) qui vise à transformer l'ARN en un ADN complémentaire par le biais d'une enzyme de rétrotranscription. Les laboratoires sont susceptibles d'utiliser soit un système de RT-PCR dit qualitatif permettant de statuer sur la présence ou non du génome dans l'échantillon, soit quantitatif qui conduit à déterminer la quantité de génome de SARS-CoV-2 dans l'échantillon en unités génome ou copies de génome par unité de volume ou de masse de boue.

Dans le cas d'un rendu de résultat qualitatif (présence/absence), la limite de détection caractérise la quantité minimale de génome dans l'échantillon susceptible de conduire à une forte probabilité de détection. Pour un même mode opératoire, la limite de détection varie sensiblement en fonction de la prise d'essai initiale de boue et de la fraction d'échantillon analysée. Pour des modes opératoires différents, la limite de détection est liée au système de RT-PCR utilisé (en fonction des gènes ciblés) mais également aux différentes étapes de préparation, d'extraction et de purification qui permettent d'obtenir l'extrait d'ARN. La présence d'inhibiteurs de PCR peut nécessiter que les extraits d'ARN à analyser soient préalablement dilués afin de réduire la concentration des molécules inhibitrices, dans ce cas de figure la limite de détection est affectée par le facteur de dilution. Des exemples de limites de détection sont proposés en annexe 2 afin de souligner qu'il s'agit d'un paramètre étroitement lié au mode opératoire.

Dans le cas d'un rendu de résultat quantitatif (UG / masse ou volume de boue), la quantification doit être établie par rapport à un matériau de référence qui le plus souvent correspond à un ARN étalonné. Le matériau de référence doit présenter une structure en acides nucléiques similaire à celle ciblée pour la quantification du génome viral. La valeur de quantification est directement reliée au matériel de référence utilisé par le laboratoire. En l'absence d'un matériau de référence commun, les valeurs quantifiées dans différents laboratoires sont difficilement comparables. Les questions posées aux laboratoires relatives à cette étape sont disponibles dans le tableau 4.

2.1.5 Informations concernant l'expression des résultats

Les analyses portent sur des échantillons de boues liquides ou solides. La teneur en eau varie en fonction de la nature des boues (liquide ou solide) mais aussi en fonction de différentes boues d'une même nature. Il est possible d'exprimer les résultats par unité de masse ou de volume de boue (matière brute). Une autre possibilité est d'exprimer les résultats par rapport à la quantité de matière sèche. C'est cette solution qui a été retenue dans l'arrêté de 1998 qui préconise que les résultats des analyses microbiologiques soient exprimés pour 10 grammes de matière sèche. Les questions posées aux laboratoires relatives à cette étape sont disponibles dans le tableau 5.

2.1.6 Informations relatives aux capacités analytiques par culture cellulaire et à l'intérêt de participer à un EIL

La RT-PCR permet de statuer sur la présence de génome viral mais n'apporte pas d'informations sur le caractère cultivable et par extension sur le potentiel infectieux des particules virales détectées. A l'inverse, les méthodes de culture cellulaire sont en mesure de statuer sur le caractère infectieux, cependant elles nécessitent des compétences très spécifiques peu répandues dans les laboratoires. Par ailleurs les boues constituent une matrice avec de fortes contraintes en terme de prétraitement car elles sont particulièrement susceptibles d'entraîner des contaminations fongiques ou bactériennes et d'être vecteur d'effets cytotoxiques imputables aux composés chimiques résiduels. Au regard de l'intérêt qu'il pourrait y avoir à confronter certains résultats obtenus par RT-PCR à des résultats de culture cellulaire, le questionnaire a donc été utilisé pour identifier d'éventuels laboratoires en mesure de compléter les analyses de génome par la recherche ou la quantification de particules virales cultivables. Enfin les laboratoires ont également été sondés vis-à-vis de leur intérêt à participer à la réalisation d'EILs afin de déterminer si l'effectif de laboratoires intéressés pourrait être suffisant pour assurer une exploitation robuste des résultats de l'intercomparaison. Les questions qui ont été posées aux laboratoires sont disponibles dans le tableau 6.

Tableau 6 : Liste des questions relatives à l'étape d'amplification du génome viral

| |
|---|
| Cette activité est-elle déjà en place dans votre laboratoire ? |
| - Si oui, précisez sur quel(s) virus et quelle(s) matrice(s) |
| Disposez-vous d'un mode opératoire de RT-PCR applicable à la détection/quantification de SARS-CoV-2 ? |
| - Si oui, s'agit-il d'un protocole interne ou d'un kit commercial ? |
| Informations utiles concernant ce protocole ? |
| Le système de RT-PCR utilisé permet-il de générer des données de détection qualitatives ou quantitatives ? |
| Utilisez-vous un système spécifique visant à réduire les inhibiteurs de PCR ? |
| - Si oui, lequel ? |
| Un contrôle est-il disponible pour évaluer l'inhibition de l'amplification pour chaque extrait analysé ? |
| - Si oui, quels sont les critères d'acceptabilité qui s'appliquent au contrôle d'inhibition ? |
| Avez-vous des données de validation de ce mode opératoire d'amplification ? |
| - Si oui, précisez : |
| Pour les méthodes quantitatives, indiquez la limite de quantification du système de RT-PCR utilisé en UG/réaction |
| Indiquez la limite de détection du système de RT-PCR utilisé en UG/réaction |

Tableau 7 : Liste des questions concernant les informations relatives à l'étape d'amplification du génome viral

| |
|---|
| Pour les systèmes quantitatifs, indiquez la limite de quantification globale de la méthode dans les conditions habituelles d'utilisation pour les échantillons de boues : |
| Indiquez la limite de détection globale de la méthode dans les conditions habituelles d'utilisation pour les échantillons de boues : |
| Modalités d'expression des résultats pour les boues liquides : |
| Modalités d'expression des résultats pour les boues solides ou pâteuses : |
| Le résultat fourni est-il rapporté à une quantité de boue exprimée en matière brute (MB) ou en matière sèche (MS) ? |

Tableau 8 : Liste des questions diverses

| |
|---|
| Avez-vous actuellement en place une capacité analytique pour détecter ou quantifier par culture cellulaire un virus issu d'une boue ? |
| Avez-vous mis en place des dispositions spécifiques concernant l'élimination des reliquats d'échantillons de boues susceptibles de contenir du SARS-CoV-2 ? |
| - Si, oui précisez : |
| Travaillez-vous sous forme de réseau pour le développement de méthodes de détection du SARS-CoV-2 dans les échantillons ? Si oui, précisez |
| Seriez-vous disposé à participer à un EIL sur la détection des SARS-CoV-2 dans des boues ou d'autres matrices ? |
| Informations complémentaires libres |

3 Données brutes des réponses au questionnaire

Le questionnaire a été adressé à la même liste de laboratoires qu'en avril 2020, laquelle a été complétée par quelques laboratoires additionnels, soit 163 envois. La liste de contacts d'avril 2020 avait été établie en relation avec l'OFB qui gère les agréments environnement portant sur les eaux résiduaires. Elle a été complétée à partir des contacts des laboratoires agréés pour la liste des paramètres microbiologiques pris en compte pour l'agrément du contrôle sanitaire des eaux.

Le mail a été adressé aux contacts le 4 novembre avec une demande de retour pour le 12 novembre. Les retours se sont étalés entre le jour même, le 4 novembre jusqu'au 19 novembre.

46 laboratoires ont répondu avec différents niveaux de retour, depuis l'absence de données jusqu'à la totalité des réponses.

Les informations obtenues en retour du questionnaire sont uniquement déclaratives et s'appuient uniquement sur les éléments fournis par les laboratoires.

3.1 Informations techniques générales relatives au statut du laboratoire et à son expérience sur des matrices environnementales complexes

- Agréments du laboratoire :

| | |
|--|----|
| Agréments Environnement et Santé | 25 |
| Agrément Environnement | 2 |
| Pas de retour fichier et d'information | 19 |

- Niveau de sécurité biologique du laboratoire :

| | |
|-------|---|
| NSB2 | 5 |
| NSB2+ | 8 |
| NSB3 | 6 |

- Avez-vous une activité en place au laboratoire concernant les analyses microbiologiques des matières fertilisantes (MF) et supports de culture (SC) ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 5 |
| NON | 33 |
| Pas d'information | 9 |

- Si oui, cette activité sur fertilisants ou supports de culture est-elle accréditée ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 3 |
| NON | 7 |
| Pas d'information | 32 |

- Disposez-vous d'une accréditation selon la NF EN ISO 17025 concernant la détection ou la quantification de génome viral par (RT)-PCR (quels que soient le virus et la matrice) ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 13 |
| NON | 13 |
| Pas d'information | 19 |

- Si, oui s'agit-il d'une accréditation en portée fixe ou flexible ?

| | |
|-------------|----|
| Flexible | 12 |
| Portée fixe | 1 |

- Activités d'échantillonnage déjà en place au laboratoire ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 7 |
| NON | 14 |
| Pas d'information | 26 |

- Suivez-vous des dispositions particulières pour l'échantillonnage (norme, guide, texte réglementaire, ...) ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 4 |
| NON | 6 |
| Pas d'information | 36 |

- Si oui, précisez le support de référence sur lequel vous vous appuyez :

| | |
|--------------------------|----|
| Arrêté du 8 janvier 1998 | 3 |
| Norme NF EN ISO 5667-13 | 1 |
| Non précisé | 41 |

- Réalisez-vous des prélèvements sur boues liquides ?

| | |
|-------------------|----|
| OUI | 5 |
| NON | 18 |
| Pas d'information | 24 |

- Modalités de prélèvement (prélèvement ponctuel ou multiple, ...) :

| | |
|-------------|----|
| Ponctuel | 5 |
| Multiple | 1 |
| Non précisé | 40 |

- Précisions sur les modalités de prélèvement :

| | |
|-----------|---|
| Ponctuel | Prélèvement ponctuel ; Sur la base des temps de séjour dans les décanteurs lamellaires ; Prélèvement après recirculation à raison de 3 prélèvements sur une période de 30 min Non spécifique ; Ponctuel ; |
| Multiples | Prélèvement après recirculation à raison de 3 prélèvements sur une période de 30 min |

- Quel volume de boue est habituellement mis à disposition du laboratoire ?

| | |
|--------|---|
| 250 ml | 1 |
| 500 ml | 1 |
| 1 l | 4 |
| 2 l | 3 |

- Déterminez-vous systématiquement la matière sèche sur l'échantillon ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 11 |
| NON | 1 |
| Non précisé | 40 |

- Réalisez-vous des prélèvements sur boues solides ou pâteuses ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 4 |
| NON | 18 |
| Non précisé | 36 |

- Modalités de prélèvement (prélèvement ponctuel ou multiple, ...) :

| | |
|-------------|----|
| Ponctuel | 3 |
| Multiples | 1 |
| Non précisé | 42 |

- Précisions sur les modalités de prélèvement :

| | |
|-----------|---|
| Ponctuel | Rare |
| Multiples | Prélèvements élémentaires uniformément répartis en différents points et différentes profondeurs du lot de boues destiné à être épandu |

- Quelle masse de boue est habituellement mise à disposition du laboratoire ?

| | |
|-------------|----|
| 250 ml | 1 |
| 500 g | 2 |
| 1 kg | 5 |
| 1 à 2 kg | 1 |
| Non précisé | 38 |

- Déterminez-vous systématiquement la matière sèche sur l'échantillon ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 9 |
| NON | 0 |
| Non précisé | 38 |

- Avez-vous mis en place des dispositions particulières en termes de biosécurité pour le prélèvement des boues susceptibles de contenir du SARS-CoV-2 ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 9 |
| NON | 6 |
| Non précisé | 32 |

- Si oui, précisez (ex : EPI spécifiques, flaconnage et conditionnement spécifique, ...) :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - EPI, désinfection du flaconnage à réception - EPI, flaconnage spécifique - Double emballage - EPI - Double voir triple emballage minimum, désinfection en surface du contenant primaire - Double emballage, masque FFP2, gants - EPI, triple emballage, conditions d'accès sur site : uniquement lorsque les aérateurs sont hors fonctionnement - Masque FFP2, visière, doubles-gants |
| Non précisé | 37 |

3.2 Informations concernant l'étape de désorption des particules virales des boues et leur concentration

- Réalisez-vous une étape d'extraction/concentration ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 9 |
| NON | 10 |
| Non précisé | 26 |

- Si oui, précisez brièvement l'étape d'extraction :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Tampon d'élution glycine/extrait de boeuf - Broyage et élution dans PBS - Réactifs Nuclisens BIOMERIEUX - Pas encore réalisé à ce jour (en cours de développement) extraction sur colonne prévue - Ultracentrifugation selon méthode « OBEPINE » |
| Non précisé | 37 |

- Le cas échéant précisez la méthode de concentration utilisée (ultracentrifugation, précipitation, ...) :

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Boues liquides: Acidification, filtration sur membrane d'ester de cellulose. Introduction de la membrane dans un tampon de lyse. - Boues solides. Broyage avec Fastprep avec du tampon de lyse. - Ultracentrifugation ou centrifugation + PEG NaCl - Ultracentrifugation prévue - Ultracentrifugation selon méthode OBEPINE |
| Non précisé | 39 |

- Indiquez sur quel type de boue ce mode opératoire est appliqué dans votre laboratoire :

| | |
|---------------------------|----|
| Boues solides et liquides | 6 |
| Boues liquides | 3 |
| Non précisé | 36 |

- La prise d'essai est-elle réalisée à partir de la matière brute ou de la matière sèche ?

| | |
|---------------|----|
| Matière brute | 8 |
| Matière sèche | 1 |
| Non précisé | 37 |

- Boues liquides : Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ?

| | |
|--------|---|
| 250 mg | 1 |
| 500 ml | 1 |

| | |
|-------|---|
| 25 ml | 2 |
| 50 ml | 1 |
| 6 g | 1 |
| 11 ml | 1 |

- Boues solides ou pâteuses : Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ?

| | |
|-------------------------------|----|
| Ultracentrifugation : 25 ml | 1 |
| Centrifugation + PEG : 100 ml | |
| Non précisé | 37 |

| | |
|---------------------------|----|
| 250 mg | 1 |
| 10 g matière sèche | 1 |
| 200 mg | 1 |
| 6 g | 1 |
| 1 g | 3 |
| En cours de développement | 1 |
| Non précisé | 39 |

- Quel est le volume final disponible suite à cette étape d'extraction/concentration ?

| | |
|-------------|----|
| 5 ml | 1 |
| 45 ml | 1 |
| 400 µl | 1 |
| 80 µl | 1 |
| 1 ml | 2 |
| Non précisé | 37 |

| | |
|------|---|
| 2 ml | 1 |
|------|---|

- Avez-vous des données de validation du mode opératoire d'extraction/concentration ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 3 |
| NON | 6 |
| Non précisé | 38 |

- Quel est le plus haut niveau de sécurité du laboratoire dans lequel ces étapes d'extraction/concentration peuvent être réalisées ?

| | |
|-------------|----|
| NSB2 | 2 |
| NSB2+ | 4 |
| NSB3 | 2 |
| Non précisé | 38 |

3.3 Informations concernant l'étape d'extraction et purification du génome viral

- Cette activité est-elle déjà en place au laboratoire ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 5 |
| NON | 16 |
| Non précisé | 24 |

- Si oui préciser sur quel(s) virus et quelle(s) matrice(s) :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - SARS-CoV-2 / Boues Hygiénisées - Virus entériques humains et SARS-CoV-2 / eaux et boues liquides - Entérovirus / Boues Hygiénisées (en cours) - Entérovirus / Boues Hygiénisées et SARS-CoV-2 / boues diverses - Entérovirus/ boues - Virus entériques (Norovirus, Rotavirus, Entérovirus, Hépatite A), SARS-CoV-2 / boues liquides - Norovirus, Hépatite A sur eaux - COVID/eau STEP |
| Non précisé | 39 |

- Disposez-vous d'un mode opératoire d'extraction/purification applicable à la détection/quantification de SARS-CoV-2 ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 9 |
| NON | 1 |
| Non précisé | 36 |

- Si oui s'agit-il d'un protocole interne ou d'un kit commercial ?

| | |
|-------------------|----|
| Kit commercial | 7 |
| Protocole interne | 1 |
| Non précisé | 36 |

- Description sommaire du principe du mode opératoire et autres informations utiles :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Lyses chimique et thermique/extraction et purification sur billes magnétiques - Billes magnétiques - Extraction chimique / Purification sur billes magnétiques de silice et passage sur résine pour retrait des inhibiteurs (optionnel) - Extraction chimique et purification sur colonne de silice - Broyage+lyse+extraction sur billes magnétiques + passage sur résine pour retrait des inhibiteurs - Lyse chimique puis extraction/purification sur billes magnétiques de silice - Extraction et purification sur colonne et passage sur résine pour retrait des inhibiteurs - Protocole « OBEPINE » - extraction sur billes magnétiques et passage sur résine (essai sur différents protocoles en cours) |
| Non précisé | 36 |

- Quelle est la prise d'essai utilisée pour débiter l'extraction ?

| | |
|-------------|----|
| 10 g | 1 |
| 100 µl | 2 |
| 200 µl | 2 |
| 25 ml | 1 |
| 45 ml | 1 |
| 6 g | 1 |
| X g | 1 |
| Non précisé | 41 |

- Utilisez-vous des témoins positifs d'extraction pour vérifier les performances du système d'extraction ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 7 |
| NON | 2 |
| Non précisé | 36 |

- Si oui, précisez les modalités de mise en œuvre et les critères d'acceptation :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Non - Rendement d'extraction pour chaque échantillon >1%. - Témoin positif cible, et non cible exogène. - Ajout d'un contrôle exogène : moins de 3 Ct d'écart attendu sur le contrôle avec le témoin négatif d'extraction. - Ajout d'un virus témoin d'extraction. Calcul d'un rendement d'extraction pour valider l'extraction. Un rendement conforme doit être >1% - Réalisé pour chaque échantillon - Rendement d'extraction > X% - IPC Exogène |
| Non précisé | 40 |
| Non | 1 |

- Avez-vous des données de validation du mode opératoire d'extraction/purification ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 6 |
| NON | 2 |
| Non précisé | 38 |

- Si oui, précisez :

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Contrôle interne - Reproductibilité, contrôle interne - Rendement, répétabilité, reproductibilité, contrôle interne - Validation partielle en répétabilité, reproductibilité et contrôle interne - Données de validation ont été réalisées avec rendement processus en Coronavirus bovin, et SARS-CoV-2 (dopage), répétabilité et reproductibilité - Rendement d'extraction - Contrôle interne - Rendement, répétabilité, reproductibilité, contrôle interne - En cours |
| Non précisé | 39 |
| Non | 1 |

- Quel est le plus haut niveau de sécurité du laboratoire dans lequel ces étapes d'extraction génomique peuvent être réalisées ?

| | |
|-------------|----|
| NSB2 | 5 |
| NSB2+ | 3 |
| NSB3 | 1 |
| Non précisé | 38 |

3.4 Informations concernant l'étape de détection/quantification du génome viral par RT-PCR

- Capacités à partir d'échantillons de boues issus de STEP : cette activité est-elle déjà en place au laboratoire ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 7 |
| NON | 15 |
| Non précisé | 24 |

- Si oui, précisez sur quel(s) virus et quelle(s) matrice(s) :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Boues - Virus entériques humains et SARS-CoV-2 / eaux et boues liquides - Entérovirus / Boues hygiénisées, en cours - SARS-CoV-2 / Boues (2X) - Entérovirus / Boues - Virus entériques (Norovirus, Rotavirus, Entérovirus, Hépatite A) SARS-CoV-2 / boues liquides - Norovirus, Hépatite A dans les eaux |
| Non précisé | 39 |
| Non | 1 |

- Disposez-vous d'un mode opératoire de RT-PCR applicable à la détection/quantification de SARS-CoV-2 ?

| | |
|-----|---|
| OUI | 9 |
| NON | 2 |

| | |
|-------------|----|
| Non précisé | 36 |
|-------------|----|

- Si oui, s'agit-il d'un protocole interne ou d'un kit commercial ?

| | |
|-------------------|----|
| Kit commercial | 8 |
| Protocole interne | 1 |
| Non précisé | 37 |

- Informations utiles concernant ce protocole :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Roche + gamme interne pour quantification - Ip4, Ip2 - Eurobio - Fournisseur (3X) - BioSella (2X) - SARS-CoV-2-R-GENE de Biomérieux |
| Non précisé | 39 |
| Non | 1 |

- Le système de RT-PCR utilisé permet-il de générer des données de détection qualitatives ou quantitatives ?

| | |
|-------------|---|
| Qualitative | 6 |
|-------------|---|

| | |
|--------------|----|
| Quantitative | 3 |
| Non précisé | 37 |

- Utilisez-vous un système spécifique visant à réduire les inhibiteurs de PCR ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 3 |
| NON | 7 |
| Non précisé | 36 |

- Si oui, lequel ?

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Nuclisens Easymag Mérieux - Ajout BSA - Nous avons testé le One STEP PCR inhibitor removal kit (Zymo Research) (2X) |
| Non précisé | 43 |

- Un contrôle est-il disponible pour évaluer l'inhibition de l'amplification pour chaque extrait analysé ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 7 |
| NON | 2 |
| Non précisé | 37 |

- Si oui, quels sont les critères d'acceptabilité qui s'appliquent au contrôle d'inhibition ?

| | |
|-----|--|
| OUI | Ceux du kit (6 X) Critères internes |
|-----|--|

| | |
|-------------|---|
| | Le même que le contrôle d'extraction (kit triplex) |
| Non précisé | 39 |

- Avez-vous des données de validation de ce mode opératoire d'amplification ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 7 |
| NON | 3 |
| Non précisé | 37 |

- Si oui, précisez :

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - Contrôle interne - Répétabilité du contrôle interne - Rendement, répétabilité, reproductibilité, contrôle interne - Répétabilité, reproductibilité, contrôle interne - Données de validation ont été réalisées avec rendement processus en coronavirus bovin, et SARS-CoV2 (dopage), répétabilité et reproductibilité - Set spécificité analytique, précision - Rendement, répétabilité, reproductibilité, contrôle interne - En cours |
| Non précisé | 39 |

- Pour les méthodes quantitatives, indiquez la limite de quantification du système de RT-PCR utilisé en UG/réaction :

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - 50 UG/réaction - 60 UG/réaction - Remarque : la quantification serait possible pour nous, mais non pratiquée pour l'instant - 64 UG/réaction - En cours |
| Non précisé | 42 |

- Indiquez la limite de détection du système de RT-PCR utilisé en UG/réaction :

| | |
|-------------|--|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> 5 UG/réaction 6 UG/réaction 20 copies/réaction (gène E) 5 copies/réaction gène (ORF1ab) 12,5 UG/réaction En cours |
| Non précisé | 42 |

3.5 Informations concernant l'expression des résultats

- Pour les systèmes quantitatifs, indiquez la limite de quantification globale

de la méthode dans les conditions habituelles d'utilisation pour les échantillons de boues :

| | |
|-------------|--|
| | 2.10 ³ UG/l LQ = 5 à 10 000 UG/g MB En cours d'évaluation En cours |
| Non précisé | 42 |

| | |
|-----|------------------|
| OUI | 1000 à 2000 UG/g |
|-----|------------------|

- Indiquez la limite de détection globale de la méthode dans les conditions habituelles d'utilisation pour les échantillons de boues :

| | |
|-------------|--|
| OUI | 100 à 200 UG/g 250 UG/l LD=4000 UG/g MB 2 000 copies/gramme En cours |
| Non précisé | 42 |

- Modalités d'expression des résultats pour les boues liquides :

| | |
|-------------|--|
| OUI | Déecté/non déecté avec une LD Présence / Non déecté / x UG/g résidu sec Déecté/Non déecté dans 50 ml n UG/g Présence/Absence dans 1g Génôme déecté /non déecté dans 1g de MB ou Xg de MS dans le cas où la MS est demandée Déecté / non déecté en UG/l Présence/Absence dans X g ou ml et/ou n UG/g (2 X) |
| Non précisé | 38 |

- Modalités d'expression des résultats pour les boues solides ou pâteuses :

| | |
|-------------|---|
| OUI | Déecté/ x UG/g Déecté/Non déecté dans 200 mg n UG/g Présence/Absence dans 1g Génôme déecté /non déecté dans 1 G de MB ou Xg de MS dans le cas où la MS est demandée n UG/g Présence/Absence dans X g et/ou n UG/g Présence/Absence dans X ml |
| Non précisé | 38 |

- Le résultat fourni est-il rapporté à une quantité de boue exprimée en matière brute (MB) ou en matière sèche (MS) ?

| | |
|---------------|----|
| Matière brute | 4 |
| Matière sèche | 3 |
| Non précisé | 40 |

3.6 Informations en lien avec les capacités analytiques par culture cellulaire et avec l'intérêt de participer à un EIL

- Avez-vous actuellement en place une capacité analytique pour détecter ou quantifier par culture cellulaire un virus issu de boue ?

| | |
|-----|---|
| OUI | 1 |
|-----|---|

| | |
|-------------|----|
| NON | 21 |
| Non précisé | 25 |

- Avez-vous mis en place des dispositions spécifiques concernant l'élimination des reliquats d'échantillons de boues susceptibles de contenir du SARS-CoV-2 ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 6 |
| NON | 14 |
| Non précisé | 27 |

- Si, oui préciser

| | |
|-------------|---|
| OUI | <ul style="list-style-type: none"> - DASRI (4 X) - On procède comme avec toute boue traitée dans le P3 - Elimination en DASRI ou inactivation acide/base |
| Non précisé | 41 |

- Travaillez-vous sous forme de réseau pour le développement de méthodes de détection du SARS-CoV-2 dans les échantillons ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 10 |
| NON | 13 |
| Non précisé | 23 |

- Si oui, précisez :

| | |
|-------------|---------------|
| OUI | Obépine (10X) |
| Non | 13 |
| Non précisé | 23 |

- Seriez-vous disposé à participer à un EIL sur la détection du SARS-CoV-2 dans des boues ou d'autres types d'échantillons ?

| | |
|-------------|----|
| OUI | 7 |
| Non | 9 |
| Non précisé | 24 |

- Informations complémentaires libres :

- « Nous réalisons des analyses de recherche de SARS-CoV-2 par RT-PCR sur écouvillons humains actuellement »
- « Depuis mai 2020 : prestation analyses SARS-CoV-2 sur prélèvement écouvillon humain »
- « Le laboratoire dispose de kits et d'une PCR pour analyses sur prélèvements biologiques. Développement d'une méthode pour identifier la présence du SARS-CoV-2 dans les eaux »
- « Nous envisageons de changer de méthode d'extraction des particules. Nous allons réaliser la méthode par ultracentrifugation et nous allons changer de kit d'amplification pour pouvoir rendre un résultat quantitatif »
- « Méthode appliquée sur eaux résiduaires non validée actuellement sur la matrice boue. Des modifications seraient susceptibles d'être apportées pour la matrice boue »
- « Participation au réseau OBEPINE et collaboration SAUR / Université Montpellier avec méthode SARS-CoV-2 en eau résiduaire par ultrafiltration (AMICON 15ML, 10K) »
- « Compléments agrément : plusieurs agréments SANTE ANIMALE dont, par PCR: Aujeszky, FCO, MCE, peste porcine, tuberculose »
- « La méthode quantitative est en cours de validation. Nous avons possibilité d'exprimer le résultat en fonction de la MS (analyse qui est réalisée sous accréditation COFRAC) »
- « Concernant les eaux d'entrée et de sortie de STEP, notre laboratoire a signé un accord de collaboration avec le réseau OBEPINE. Nous sommes en attente d'une confirmation d'intégration à ce réseau »
- « Actuellement, notre laboratoire développe une méthode de traitement et d'extraction des boues solides pour détecter le SARS-CoV-2. Nous mettons en place le système PCR du réseau OBEPINE pour pouvoir quantifier l'ARN de SARS-CoV-2 dans les eaux de STEP, les boues liquides et solides »
- « Les données communiquées concernent l'analyse dans les eaux pour Norovirus et Hépatite, la recherche du SARS-CoV-2 dans les eaux et les boues est en cours de développement, avec le réseau OBEPINE »
- « Notre activité COVID sur écouvillon nasal profond étant importante, beaucoup de développements sur ce sujet sont mis en second plan néanmoins nous travaillons activement sur ce sujet. »

4 Exploitation des données de l'enquête

Les données brutes présentées dans la partie 3 montrent une grande hétérogénéité dans les pratiques sur l'ensemble du processus depuis le prélèvement, la préparation des échantillons, jusqu'à l'extraction et l'étape de détection/quantification du génome qui s'ensuivent. Sept laboratoires ont mis en place la totalité du processus. Par conséquent, leurs données nous serviront de support pour identifier les pratiques partagées, complétées quand c'est possible par les données plus éparses des autres laboratoires. Les éléments des modes opératoires de ces 7 laboratoires sont présentés dans les tableaux 8 et 9 en annexe 1.

4.1 Préparation de l'échantillon par élution et/ou concentration

Sur les 7 laboratoires qui disposent d'une méthode applicable aux boues, 2 ne la réalisent que sur des boues liquides (laboratoires 2 et 6).

La majorité des laboratoires recourt à une méthode d'élution (4/7), cependant les modalités sont différentes d'un laboratoire à l'autre notamment en ce qui concerne la nature de l'éluant utilisé et la réalisation ou non d'un broyage mécanique en complément.

Des méthodes de concentrations sont décrites pour 3 des 7 laboratoires. Elles montrent également une diversité importante : filtration, ultracentrifugation, précipitation au PEG 6000.

Les laboratoires qui pratiquent une étape de désorption et/ou d'élution disposent majoritairement de données de validation sur ces étapes (3 sur 5).

4.2 Extraction et purification du génome viral

Les modes opératoires d'extraction génomique sont variés et reposent majoritairement sur des kits commerciaux. La lyse chimique est systématiquement présente, elle est parfois complétée par une lyse thermique ou mécanique.

L'étape de purification est majoritairement réalisée à l'aide de billes magnétiques de silice et peut être complétée par l'utilisation de colonnes de purification permettant le retrait des inhibiteurs.

Majoritairement les laboratoires disposent d'un suivi des performances du système d'extraction génomique.

L'étendue des données de validation est variable en fonction des laboratoires. Tous s'appuient *a minima* sur un contrôle interne de performance, fréquemment complété par des données de robustesse. Trois laboratoires possèdent des données de rendement d'extraction.

4.3 Amplification du génome viral

Les analyses de RT-PCR sont majoritairement réalisées à l'aide de kits commerciaux et conduisent majoritairement à des résultats qualitatifs. Trois laboratoires proposent néanmoins des analyses quantitatives.

Les laboratoires amplifient tous au moins deux cibles. 5 laboratoires disposent de systèmes RT-PCR ciblant au moins deux régions codantes différentes : la combinaison la plus partagée (5 laboratoires sur 7) consiste en une amplification de la région qui code pour RdRp (ORF1ab) et une autre amplification sur le gène E. L'un des kits commerciaux permet en complément une amplification sur le gène N.

Des contrôles d'inhibition PCR sont systématiquement réalisés. Les données de validation reposent essentiellement sur la robustesse du contrôle interne.

Un laboratoire dispose de valeurs de rendement sur l'ensemble du processus à partir de coronavirus bovin et de SARS-CoV-2. Les valeurs obtenues concernent exclusivement des boues liquides et s'étendent de 2% pour le protocole initial non optimisé (celui initialement appliqué pour les entérovirus), à des valeurs de l'ordre de 20% après optimisation et pouvant atteindre ponctuellement 40%.

Ces valeurs obtenues à partir de contaminations artificielles sont susceptibles d'être surestimées (Cf. § 6.5).

4.4 Expression des résultats

La majorité des résultats sont des résultats qualitatifs. Les limites de détection les plus faibles, de l'ordre de 100 à 250 UG/g correspondent aux laboratoires qui réalisent une étape de désorption/concentration.

Deux laboratoires sont en mesure de produire des résultats quantitatifs. Les limites de quantification, limitées à deux laboratoires, sont issues de modes opératoires qui intègrent une étape de désorption par élution. Elles sont comprises entre 1 000 et 2 000 UG par unité de masse ou volume.

La moitié des laboratoires exprime des résultats rapportés à la quantité de matière sèche, tandis que l'autre moitié exprime les résultats en fonction de la matière brute.

5 Synthèse des informations issues des auditions

En complément des informations transmises en retour du questionnaire, deux laboratoires identifiés comme ayant eu des activités de recherche et développement concernant la détection/quantification de génome de SARS-CoV-2 dans les boues ont été contactés pour approfondir les aspects techniques. Il s'agit de deux laboratoires ciblés par l'enquête dont l'un est membre fondateur du réseau « OBEPINE » développé pour la surveillance des eaux usées. Par ailleurs trois structures compétentes ont été sollicitées :

- le réseau « OBEPINE » au travers de l'un de ces membres coordinateur à savoir le laboratoire d'Eau de Paris,
- le COFRAC, pour les aspects relatifs à l'accréditation des analyses de microbiologie pour la matrice boue et la matrice constituée par les matières fertiles et supports de culture,
- l'ADEME en tant qu'établissement public impliqué dans la réutilisation des boues par épandage, qui a été sollicitée pour évaluer la contribution actuelle des méthodes de biologie moléculaire dans la surveillance de la contamination microbiologique des boues et des matrices similaires (y compris dans les projets de recherche du domaine).

5.1 Laboratoire A

5.1.1 Contexte du retour d'expérience

Depuis le printemps 2020, le laboratoire a réalisé des analyses sur environ 90 échantillons de boues liquides et solides issues d'ouvrages d'assainissement. Les prélèvements ont été réalisés par les exploitants de STEU. Le laboratoire ne possède pas de retour d'expérience en lien avec la réalisation des prélèvements de boues. Dans la mesure où il n'existe pas de méthode normative pour l'analyse de génome viral dans les boues, le laboratoire a mis en œuvre une méthode interne. Les modes opératoires appliqués sur boues liquides et solides ont été intégrés aux tableaux 8 et 9 en annexe 1.

5.1.2 Mode opératoire retenu par le laboratoire et résultats observés

Le mode opératoire utilisé ne comporte pas d'étape de désorption des virus de la matrice boue et débute directement par une extraction/purification du génome contenu dans une faible prise d'essai de boue fraîche. Une extraction automatisée est réalisée à l'aide d'un kit commercial adapté aux selles et autres matrices chargées en matières organiques dont les biosolides. Elle s'appuie sur une lyse mécanique et chimique. La purification est réalisée sur colonnes de silice. Elle est systématiquement complétée par une purification par passage sur une colonne permettant le retrait des inhibiteurs de PCR. Concernant l'étape d'amplification par RT-PCR, le laboratoire utilise un système interne basé sur les mêmes cibles que celles employées pour la surveillance des eaux usées dans le cadre du réseau OBEPINE. Ces systèmes visent le gène E et le gène RdRp (IP4). Une bonne corrélation a été observée avec les deux systèmes de RT-PCR mais il semble que le gène RdRp permette d'être plus sensible. Dans la configuration retenue par le laboratoire, à savoir (i) de faibles prises d'essai, (ii) l'utilisation d'un kit d'extraction spécifique à ce type de matrices, et (iii) l'usage de colonnes de purification dédiées aux retraits des inhibiteurs, les analyses de RT-PCR n'ont pas été affectées par des phénomènes d'inhibition. Les résultats ont été exprimés en unités génome par gramme de matière sèche. Le mode opératoire utilisé a permis d'observer 35 échantillons positifs dont 10 en limite de détection (environ 100 UG/g) sur les 90 testés. Le niveau maximum de contamination qui a été mesuré est de $6,6 \cdot 10^4$ UG/g de MS. A titre de comparaison les concentrations maximales observées dans les eaux usées sont d'environ $1 \cdot 10^6$ UG/l voire ponctuellement $5 \cdot 10^6$ UG/l. Ces valeurs ne font pas l'objet de correction par les rendements de la méthode. Dans cette étude le mode opératoire mis en œuvre a permis de déterminer des abattements à partir de différents échantillons issus de la même filière de traitement.

5.1.3 Limites identifiées lors de l'entretien

La limite de détection est liée à la prise d'essai et au taux de matière sèche de la boue à analyser. Le mode opératoire utilisé pourrait permettre d'atteindre une limite de détection théorique comprise entre 100 et 1 000 UG/g de MS. Ainsi malgré une faible prise d'essai initiale, le laboratoire affiche une faible limite de détection grâce à l'analyse d'un ratio important de l'extrait total d'ARN. Néanmoins cette valeur théorique repose sur l'hypothèse de rendements d'extraction et de purification de 100% qui ne correspondent pas à la réalité de ces échantillons complexes.

La détermination d'un rendement considéré sur l'ensemble du mode opératoire est nécessaire pour une meilleure évaluation des niveaux de contamination et de la limite de détection effective. Afin d'éviter les manipulations en laboratoire NSB3 qu'imposerait l'usage du SARS-CoV-2, le rendement pourrait être évalué à partir de coronavirus bovin. C'est cette démarche qui a déjà été retenue par le laboratoire dans le cadre de l'analyse des eaux usées. La capacité d'adsorption et la présence de nombreux inhibiteurs de PCR font des boues une matrice complexe pour laquelle de faibles rendements ne peuvent être exclus.

En l'absence d'éléments de caractérisation des méthodes, les analyses de génome viral pourraient être interprétées en fonction de l'évolution des niveaux de contamination observés au cours du temps de stockage, ou le cas échéant en fonction des niveaux observés avant et après traitement.

5.2 Laboratoire B

5.2.1 Contexte du retour d'expérience

Depuis le mois d'avril 2020 le laboratoire a réalisé des analyses sur une dizaine d'échantillons « clients » et une cinquantaine d'échantillons très majoritairement issus de deux STEU suivies dans le cadre d'un contrat de recherche visant à vérifier la cinétique de dégradation de l'ARN du SARS-CoV-2 dans les boues liquides. Globalement les développements et les analyses réalisés par le laboratoire concernent donc les boues liquides.

La mise en place d'un contrat de recherche sur le sujet et l'expérience préalable du laboratoire pour la détection/quantification des entérovirus dans les boues a été favorable à l'évaluation des principales étapes analytiques et a permis d'identifier des optimisations par rapport au protocole pris pour référence à savoir celui appliqué pour le dénombrement des entérovirus dans les boues (protocole historique CRECEP / Université de Nancy). Les modes opératoires appliqués sur boues liquides et solides ont été intégrés aux tableaux 8 et 9 en annexe 1.

5.2.2 Mode opératoire retenu par le laboratoire et résultats observés

Le mode opératoire utilisé par ce laboratoire est basé sur la réalisation d'une extraction/purification du génome viral contenu dans une faible prise d'essai de boue fraîche. L'étape d'extraction combine une lyse mécanique et chimique. Elle intègre une purification à partir de billes magnétiques de silice. Elle est systématiquement complétée par une purification par passage sur une colonne permettant le retrait des inhibiteurs de PCR. Le volume d'extrait disponible au terme des étapes de purification est de 80 µl.

La fraction d'échantillon soumise à l'extraction génomique est obtenue à partir d'une prise d'essai d'1 g de boue brute, homogénéisée par broyage dans 10 ml de tampon PBS. Un volume d'un millilitre de la suspension homogénéisée est centrifugé afin d'obtenir un volume final de 100 µl équivalent à 1/10^{ème} de la prise d'essai initiale. C'est ce volume qui est soumis à l'extraction décrite ci-dessus. Le choix de réduire la prise d'essai découle de l'observation d'inhibitions des RT-PCR pour des prises d'essais de masse supérieure. Au terme de l'étape d'extraction/purification du génome une amplification des gènes N1 et N2 est réalisée.

5.2.3 Limites identifiées

- Conservation des échantillons avant analyse :

Le laboratoire suspecte que la conservation des échantillons de boues par congélation favorise la dégradation de l'ARN viral en amont et pendant le protocole d'extraction/purification. Cette dégradation pourrait être le fait de la libération lors de la phase de décongélation, de quantités importantes d'enzymes cellulaires susceptibles de dégrader les acides nucléiques. A l'heure actuelle le laboratoire privilégie la réalisation des analyses à partir d'échantillons conservés au frais mais non congelés.

- Etape de désorption :

Concernant l'étape de désorption, le protocole habituellement utilisé par le laboratoire pour l'analyse d'entérovirus dans les boues repose sur un tampon glycine/extrait de bœuf puis une concentration par précipitation au PEG 6000. Selon les retours d'expérience du laboratoire, ce protocole apparaît inadapté pour l'analyse du SARS-CoV-2 dans les boues liquides : des rendements d'environ 2% ont été mesurés à partir de contaminations artificielles conduites avec un coronavirus bovin. Une optimisation axée sur la modification du pH du tampon glycine/extrait de bœuf a été testée sans succès.

- Etape de concentration :

Par ailleurs, le laboratoire a renoncé à utiliser une étape de concentration d'éluâts qui pourraient être obtenus à partir d'une plus grande quantité de matière fraîche (typiquement 20 g). En effet, les essais faits dans ce sens sur les boues liquides testées, ont montré que l'étape de concentration (typiquement au PEG 6000) conduisait à une co-concentration importante des inhibiteurs de RT-PCR pouvant nécessiter au final une dilution de l'extrait avant analyse de RT-PCR et donc réduisant fortement l'intérêt de l'étape de concentration. Par ailleurs des difficultés de reproductibilité ont également été constatées sur les étapes de concentration au PEG.

- Etape d'amplification

Le laboratoire a constaté que le phénomène de co-concentration du génome viral et des inhibiteurs de RT-PCR limite la possibilité d'analyser des prises d'essais de boues plus importantes qu'un gramme. Parmi les développements qui pourraient être étudiés se trouve la PCR digitale dont le principe analytique pourrait permettre de s'affranchir plus aisément des phénomènes d'inhibition de la RT-PCR.

- Intercalibration :

Le laboratoire souligne l'intérêt qu'il y aurait à ce qu'une structure de référence soit identifiée pour optimiser un mode opératoire applicable à la recherche et à la quantification de SARS-CoV-2 dans les boues et pour organiser des EILs.

5.2.4 Eléments de validation

- Etape d'extraction / purification :

Le protocole d'extraction/purification retenu par le laboratoire provient d'essais comparatifs menés sur différents protocoles d'extraction, et sur la possibilité de maintenir une lyse automatisée. Pour les échantillons analysés par le laboratoire, le passage sur des colonnes visant à réduire la concentration en molécules inhibitrices a montré son intérêt : les contrôles internes d'inhibiteurs pratiqués sur les échantillons n'indiquent pas d'inhibition significative.

- Contrôle d'inhibition :

Le contrôle d'inhibition a initialement été développé avec du génome de coronavirus bovin mais pour des raisons pratiques a progressivement basculé sur un contrôle interne produit au laboratoire et systématiquement ajouté en quantité déterminée d'une part dans un échantillon témoin constitué de PBS et d'autre part dans chacun des échantillons de boues à analyser. Parmi les développements qui pourraient être étudiés se trouvent la PCR digitale dont le principe analytique pourrait permettre de s'affranchir plus aisément des phénomènes d'inhibition de la RT-PCR.

- Rendement :

Des rendements d'extraction basés sur l'utilisation de coronavirus bovin ont été obtenus à différents stades d'optimisation du mode opératoire. Ces rendements sont obtenus par contamination artificielle des échantillons avec du coronavirus bovin et permettent d'évaluer la totalité du mode opératoire. Il est apparu un rendement initial de 2% et une évolution vers des rendements de 20 à 40% (pour les boues liquides testées au laboratoire) après optimisation du mode opératoire. Il est probable que les rendements obtenus sur les échantillons naturellement contaminés soient inférieurs à ces valeurs. La reproductibilité obtenue à partir des prises d'essais d'1 g de matière brute est apparue satisfaisante.

- Transfert de méthode :

Le laboratoire partage ses retours d'expérience avec un autre laboratoire d'analyses qui met actuellement en œuvre un mode opératoire très similaire pour la détection de génome de SARS-CoV-2 dans les boues.

5.3 Réutilisation et surveillance microbiologiques des boues pour épandage, ADEME, Mme Isabelle DEPORTES

A l'heure actuelle, il n'existe pas de normes concernant des méthodes de détection/quantification de micro-organismes par des méthodes de biologie moléculaire dans les boues. A la connaissance de Mme DEPORTES, les laboratoires d'analyses n'apparaissent pas dans des projets de recherche et développement qui viseraient à développer des méthodologies de détection/quantification ciblée de bactéries, virus ou parasites dans les boues. Les structures académiques, et notamment l'INRAE ont développé des analyses basées sur les techniques de biologie moléculaire soit après obtention d'isolat par des méthodes culturales, soit par des méthodes d'extraction et d'étude du génome plus globales. La recherche ciblée de micro-organismes par des méthodes de biologie moléculaire, sans étape préalable de culture, se heurte à des limites de détection généralement élevées de l'ordre de 1000 à 10000 unité par g de matrice. Parmi les équipes académiques qui disposent de compétences se trouve notamment celle de la plateforme Genosol pilotée par l'INRAE de Dijon. Une méthode de préparation des acides nucléiques à partir du sol, développée par l'INRAE a fait l'objet d'une normalisation au niveau de l'ISO : il s'agit de la norme NF EN ISO 11 063.

5.4 Accréditation, COFRAC

Un seul laboratoire est actuellement accrédité pour la quantification d'entérovirus dans les boues par la méthode de culture mais également par biologie moléculaire. A noter que ce laboratoire ne dispose pas d'autres accréditations qui concerneraient des méthodes de biologie moléculaire applicables à la détection ou quantification d'autres micro-organismes dans les boues.

Au niveau de l'accréditation, les matières fertilisantes / supports de culture d'une part et les boues d'autre part ne sont pas inclus dans les mêmes domaines techniques. Les deux programmes concernés à savoir (i) Analyses des matières fertilisantes (MF) et supports de culture (SC) et (ii) Analyses microbiologiques des boues ne sont pas gérés par les mêmes pôles. Le premier est géré par le pôle Biologie/Agroalimentaire, le second par le pôle Chimie/Environnement. Il n'existe pas de guide technique d'accréditation pour ces programmes. Le programme concernant les MF/SC inclut des paramètres microbiologiques dont les analyses se limitent à des techniques classiques d'ensemencement (méthodes culturales). Actuellement pour ces matrices, aucun laboratoire ne dispose d'une accréditation liée à des méthodes de PCR ou RT-PCR (temps réel). Concernant l'analyse microbiologique des boues, un seul laboratoire est accrédité à ce jour. Cette accréditation concerne le prétraitement des échantillons (homogénéisation), ainsi que le dénombrement des entérovirus cultivables (culture cellulaire en microplaque ou par plage de lyse) mais également la détection des virus entériques à ARN (portée flexible). Ce laboratoire dispose actuellement d'une accréditation pour la détection de génome d'entérovirus selon une méthode interne basée sur une RT-PCR en temps réel (qualitative). Le nombre d'auditeurs techniques pour le programme « analyses microbiologiques sur boue » est très restreint. Etant donné l'absence actuelle de normes analytiques dédiées à l'analyse des paramètres microbiologiques par PCR ou RT-PCR dans la matrice boue, les laboratoires sont dans l'obligation de se faire accréditer selon des méthodes internes. Du retour d'expérience disponible du fait de la demande d'accréditation récente formulée par un seul laboratoire, il apparaît que l'étape de préparation de l'échantillon est une étape critique qui doit être parfaitement documentée. En l'occurrence le COFRAC et le laboratoire se sont appuyés sur les éléments disponibles dans l'arrêté de 1998 qui encadre l'épandage des boues et sur le décret associé de 1997.

Qu'il s'agisse des MF/SC ou des boues, en dehors du laboratoire mentionné ci-dessus, l'état actuel des accréditations ne permet pas d'identifier des laboratoires disposant de compétences analytiques par biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) pour les paramètres microbiologiques sur ces matrices. Tenant compte de cette configuration, il serait difficile et long d'aboutir à l'accréditation de laboratoires pour la détection/quantification spécifique du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Une stratégie alternative pourrait être d'identifier les laboratoires disposant d'une bonne connaissance des matrices boues et MF/SC du point de vue des analyses microbiologiques conventionnelles et qui par ailleurs disposeraient d'accréditations en PCR ou RT-PCR sur d'autres matrices. Les laboratoires qui disposent en plus de leur activité MF/SC, d'activités en lien avec la santé animale ou végétale pourraient correspondre à ce profil.

A noter qu'au niveau des laboratoires de biologie médicale qui assurent la réalisation des tests de diagnostic humain, ces derniers doivent être préalablement accrédités ou en démarche d'accréditation et disposer d'une portée incluant la technique de RT-PCR (arrêté du 12 mai 2020).

La compétence de base sur laquelle pourrait être demandée une accréditation est la détermination de la matière sèche à partir de la norme applicable pour les boues à savoir la NF EN 12 880.

5.5 Réseau OBEPINE, M. Laurent MOULIN

Le nombre de laboratoires du réseau OBEPINE en mesure de réaliser des analyses de biologie moléculaire sur boue est *a priori* très restreint. Il n'existe actuellement pas de mode opératoire partagé ni de partage des retours d'expérience entre les laboratoires de ce réseau pour ce qui concerne la matrice boue.

6 Analyse critique des contraintes analytiques et des données bibliographiques associées

6.1 Préambule

La norme NF T90-451 est la seule méthode normalisée concernant la détection/quantification de particules virales (entérovirus) applicable à une matrice résiduaire (eaux usées). Une révision de cette norme vient tout juste d'être publiée. Le mode opératoire actualisé propose de vérifier la présence de génome d'entérovirus par RT-PCR pour que seuls les échantillons positifs soient orientés vers une quantification des entérovirus cultivables. Cette stratégie analytique a pour objet de limiter le nombre d'analyses par culture cellulaire qui constitue une méthode longue, coûteuse et fastidieuse. Concernant les boues d'origine résiduaire, l'arrêté de 1998 fixe les seuils autorisés pour les entérovirus cultivables dans les boues hygiénisées et destinées à être épandues sur des sols agricoles. Aussi, bien que non normée, la quantification d'entérovirus cultivables est actuellement réalisée par quelques laboratoires. Sans décrire précisément la méthode analytique, l'arrêté de 1998 précise que la quantification des entérovirus doit être réalisée après que l'échantillon ait fait l'objet au préalable d'une étape « d'extraction-concentration au PEG 6000 ». Cette étape permet notamment d'accroître la prise d'essai de l'échantillon de boue pour atteindre un niveau de sensibilité et de représentativité compatible avec les seuils attendus qui sont exprimés pour 10 g de MS. Au regard de ces éléments, il apparaît que les entérovirus sont les virus pour lesquels les méthodes de détection/quantification dans les matrices résiduaires sont les mieux décrites. Les dernières évolutions techniques disponibles normativement ont fait évoluer les méthodes initialement basées uniquement sur la culture cellulaire vers l'introduction d'une étape préalable de tri par RT-PCR des échantillons contaminés par du génome viral. En première approche la démarche peut donc sembler comparable à la proposition actuelle qui est de trier les échantillons de boues potentiellement contaminées en génome de SARS-CoV-2 sur la base d'analyses par RT-PCR. Avant d'évaluer la faisabilité de cette stratégie, il convient de considérer plusieurs points techniques importants d'une part pour le dénombrement des entérovirus et d'autre part pour celui du SARS-CoV-2.

Concernant la surveillance des entérovirus, il doit être souligné que la norme NF T90-451 introduit de manière novatrice la méthode de RT-PCR dans les eaux y compris les eaux résiduaires, mais elle décrit uniquement une méthode de détection (présence/absence) et non pas une méthode de quantification du génome. Par ailleurs elle préconise toujours pour les échantillons renfermant du génome d'Entérovirus, de déterminer la charge en particules virales cultivables par culture cellulaire. Dans la matrice boue, les pratiques analytiques actuelles introduisent une étape de désorption puis de concentration nécessaires pour atteindre les niveaux de sensibilité et de représentativité attendus qui sont exprimés pour 10 g de MS.

Concernant les capacités actuelles de surveillance du SARS-CoV-2, comme en atteste les réponses au questionnaire préalablement présentées, les méthodes de culture cellulaire ne sont pas disponibles dans les laboratoires d'analyses. Les méthodes de diagnostic pratiquées sur les échantillons cliniques et environnementaux privilégient la détection/quantification par RT-PCR. Le réseau « OBEPINE » qui regroupe des laboratoires académiques en relation avec quelques laboratoires d'analyses d'échantillons environnementaux, dispose de modes opératoires adaptés aux eaux usées. Cependant les protocoles ne sont que partiellement harmonisés entre les différents membres du réseau et ne sont pas directement transposables à la matrice boue. Ces derniers mois, de nombreuses méthodes de concentration du génome de SARS-CoV-2 ont été décrites pour concentrer le SARS-CoV-2 à partir des eaux usées (Barril *et al.* 2021; Foladori *et al.* 2020; Lu *et al.* 2020). Quelques publications traitent également de la détection/quantification du génome dans les boues liquides ou solides (Patrick M. D'Aoust *et al.* 2021; Graham *et al.* 2021; Kaplan *et al.* 2020). Si les données en lien avec les laboratoires de recherche sont disponibles, en revanche il n'existe actuellement pas de méthodes reconnues et faisant consensus permettant la détection des particules virales de SARS-CoV-2 dans les échantillons de boues, ni même dans les eaux usées.

Concernant l'état des lieux des compétences analytiques disponibles pour la détection/quantification de micro-organismes dans la matrice boue par des méthodes de PCR ou de RT-PCR il apparaît après échange avec le COFRAC, qu'actuellement un seul et même laboratoire dispose d'une accréditation selon des méthodes internes pour la quantification des entérovirus cultivables et pour la détection de leur génome. Par ailleurs, au-delà de ce paramètre, aucun autre laboratoire ne semble disposer d'accréditations pour des méthodes de biologie moléculaire applicables à la matrice boue, qu'il s'agisse de virus, de bactéries ou de parasites. Il en est de même pour le programme d'accréditation en lien avec les matières fertilisantes et les supports de culture. Des informations recueillies après échange avec l'ADEME, il s'avère que les méthodes de biologie moléculaire sur boues sont appliquées par des laboratoires académiques et notamment l'INRAE, mais qu'elles ne sont pas orientées vers la détection/quantification ciblée de micro-organismes mais plutôt vers l'étude de la diversité et des caractéristiques des populations microbiennes en présence pour une matrice considérée. Les compétences en termes de mise en œuvre des méthodes de PCR ou de RT-PCR pour la matrice boue dans les laboratoires agréés apparaissent donc limitées. Des compétences pour ces méthodes existent dans ces laboratoires mais pour d'autres matrices (domaine vétérinaire, alimentaire ou santé des végétaux).

Comme en attestent les échanges intervenus avec le COFRAC et l'ADEME, les compétences analytiques de PCR et RT-PCR pour la matrice boue, et par extension pour les matières fertilisantes et les supports de culture sont très réduites dans les laboratoires agréés qui appliquent ces méthodes dans d'autres domaines (santé végétale et animale, alimentaire) mais qui ne maîtrisent pas nécessairement les spécificités de la matrice boue particulièrement complexe à analyser par les méthodes de biologie moléculaire.

A partir de ce qui est actuellement le plus éprouvé, à savoir la surveillance des entérovirus dans les eaux usées, il apparaît nécessaire de réaliser une analyse critique des différentes étapes analytiques qui pourraient s'avérer nécessaires pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Les données fournies par les laboratoires ainsi que les données bibliographiques peuvent être utilisées pour conduire cette analyse.

6.2 Désorption et concentration des particules virales

Les virus sont des particules colloïdales qui présentent des charges de surface, ainsi que des composants structuraux plus ou moins hydrophobes selon leurs compositions. Le pH du milieu, la nature et la concentration de molécules ioniques conditionnent l'adsorption des particules virales sur les matières en suspension. Ces processus sont régis par des principes physico-chimiques complexes mais sont aussi dépendant du type de virus considéré (enveloppé ou non enveloppé par exemple). Les méthodes de concentration ont été initialement développées dans l'objectif de détecter ou quantifier les virus non enveloppés. Les propriétés de surface des virus enveloppés sont influencées par la structure de l'enveloppe de nature lipidique. Pour des modalités analytiques similaires, les rendements de désorption et de concentration des virus enveloppés pourraient être plus faibles que ceux des virus enveloppés (Gundy, Gerba et Pepper 2008; Lu *et al.* 2020; Yinyin Ye *et al.* 2016b). Certains travaux suggèrent d'ailleurs de privilégier la recherche de génome de SARS-CoV-2 dans les boues primaires plutôt que dans les eaux usées, pour mettre à profit cette capacité d'adsorption (Balboa *et al.* 2020; Graham *et al.* 2021; Kaplan *et al.* 2020; Jordan Peccia, Zulli, Brackney, Grubaugh, Kaplan, Casanovas-Massana, Ko, Malik, Wang, Wang, Warren, Weinberger, Arnold, *et al.* 2020).

Dans les échantillons riches en matières en suspension tels que les boues, une phase de désorption des particules virales s'avère nécessaire. Elle est réalisée à partir d'une prise d'essai représentative (typiquement de 1 à 50 g de matière brute) remise en suspension dans un tampon d'élution dont les propriétés physico-chimiques et notamment de pH doivent être adaptées aux caractéristiques de surface du virus recherché. La remise en suspension peut être réalisée par agitation ou par un broyage. Il en résulte un éluât qui peut faire l'objet d'une étape de concentration mécanique (ultra-centrifugation, ultrafiltration) ou chimique (floculation ou précipitation, adsorption/élution sur un support) afin de réduire le volume et ainsi faciliter la mise en analyse d'une fraction importante de

l'échantillon (Belguith, Hassen et Aouni 2006). Les rendements de désorption mesurés sur des virus entériques sont connus pour être très variables du fait de l'hétérogénéité des boues utilisées ou des caractéristiques de surface et de la structure du virus considéré (Belguith, Hassen et Aouni 2006; Cadiergues 2000). Ainsi les rendements pourront varier selon un genre considéré voire entre espèces appartenant au même genre. Il n'existe pas de protocole de désorption et/ou de concentration universel applicable à l'ensemble des virus. Seule l'évaluation de l'étape de désorption et de concentration peut permettre de préconiser une méthodologie adaptée. Les méthodes basées sur la précipitation au PEG, l'adsorption/élution sur support filtrant et l'ultrafiltration sont les plus employées (Lu *et al.* 2020). Des travaux portant sur l'évaluation de différentes méthodes de désorption et de concentration ont montré l'impact potentiellement significatif de ces étapes sur les performances des méthodes de détection/quantification du SARS-CoV-2 (Ahmed, Bertsch, Angel, *et al.* 2020).

Pour les entérovirus et de manière générale pour les virus entériques, de très nombreux protocoles de désorption applicables aux boues ont été proposés. L'évaluation de ces protocoles a été réalisée par la détermination de rendements établis en culture cellulaire ou par RT-PCR. Malgré les nombreux documents scientifiques publiés depuis plus de 40 ans, il n'a pas été trouvé de réel consensus quant à la méthodologie à appliquer (Belguith, Hassen et Aouni 2006; Cadiergues 2000; Monpoeho *et al.* 2001).



Figure 2 : Représentation schématique des différentes méthodes applicables pour la concentration des virus (Lu *et al.* 2020)

En l'absence d'un mode opératoire robuste dont les rendements de désorption et de concentration auraient été évalués, une alternative pourrait être de s'affranchir de cette première étape en réduisant la prise d'essai de boue à un volume ou une masse permettant de réaliser directement l'étape d'extraction et de purification de l'ARN viral. Cette stratégie a déjà été retenue par au moins 3 des 7 laboratoires (Cf. tableau 8 disponible en annexe 1). Cette pratique présente cependant des limites d'une part car elle réduit la représentativité du résultat qui sera obtenu à partir d'une faible prise d'essai (typiquement comprise entre 0,1 et 1 g de MB), d'autre part car elle néglige potentiellement la fraction des particules virales adsorbées aux matières en suspension en particulier si la totalité de la prise d'essai n'est pas totalement soumise à l'extraction génomique ou si l'analyse est réalisée uniquement à partir de l'eau interstitielle. La réduction de la prise d'essai du fait de l'absence d'une étape de désorption et de concentration pourrait donc conduire à altérer la représentativité des résultats, et à entraîner une sous-estimation du niveau de contamination en négligeant tout ou partie de la fraction des virus adsorbés aux MES. A l'inverse, il doit être pris en compte que le gain de représentativité et de sensibilité attendu en ayant recours aux étapes de désorption et de concentration utilisées pour permettre le traitement d'une prise d'essai importante (typiquement de 1 à 50 g de MB), pourrait être fortement réduit par de faibles valeurs de rendement et par la co-concentration d'inhibiteurs de RT-PCR. C'est ce qui a été constaté par l'un des laboratoires auditionnés qui en a conclu que l'analyse d'une fraction d'1 g de matière brute constituait le meilleur compromis. Dans les deux cas il est clair que les rendements d'élution et de concentration ne peuvent être considérés comme proche de 100 %. Ce point est abordé dans la suite du document (Cf. § 6.5).

Au regard de son impact particulièrement critique, il conviendrait que le choix de retenir ou non une étape de désorption/concentration fasse l'objet d'une étude de validation, permettant de définir le niveau de prise d'essai le plus adapté ainsi que les caractéristiques de la solution éluante et les modalités de remise en suspension, d'élution et de concentration des particules virales de SARS-CoV-2 à partir des boues liquides et des boues solides.

Dans la mesure où une démarche similaire a été engagée depuis de nombreuses années sans succès pour la détection/quantification des entérovirus dans les boues, il est probable que

des difficultés similaires soient rencontrées pour identifier une méthode de détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Néanmoins il reste possible de caractériser une méthode de référence afin de disposer d'éléments en lien avec la répétabilité, la robustesse et le rendement global. Idéalement ces éléments pourraient être évalués par un laboratoire référent puis préciser par le déroulement d'un EIL sous réserve que ce dernier implique un nombre suffisant de participants (n>10).

Concernant les résultats analytiques actuellement produits par les laboratoires d'analyses, afin d'assurer l'interprétation des données, il conviendrait *a minima* que les résultats de RT-PCR soient accompagnés d'informations techniques telles que la prise d'essai initiale de boue, la réalisation ou non d'une étape de désorption et de concentration des éluâts.

6.3 Extraction et purification de l'ARN viral

Les étapes d'extraction et de purification sont réalisées consécutivement et sans délai afin de conserver l'intégrité de l'ARN viral extrait. Des méthodes dites internes peuvent être employées mais pour des raisons pratiques, de reproductibilité et d'automatisation, les laboratoires utilisent largement des kits commerciaux qui permettent d'obtenir un ARN purifié. D'après les retours issus du questionnaire, 6 laboratoires sur 7 utilisent des kits commerciaux et un seul une méthode interne (tableau 9 en annexe 1).

L'extraction de l'ARN viral peut être réalisée soit à partir du concentrat de l'éluât obtenu lors de la phase de désorption/concentration, soit directement à partir d'une faible prise d'essai de l'échantillon à analyser. La phase d'extraction débute par une lyse des particules virales qui est classiquement assurée par voie chimique mais peut être complétée par des procédés mécaniques (par exemple à l'aide d'un broyeur à billes) ou thermiques. Le procédé d'extraction est choisi en fonction de la nature du micro-organisme ciblé et de la matrice concernée. En présence d'une matrice solide ou riche en matières organiques, une phase de broyage pourrait faciliter l'extraction des particules virales adsorbées. Parmi les laboratoires ayant répondu à l'enquête 2 sur 7 utilisent ce type d'extraction mécanique (tableau 8 en annexe 1). La norme NF EN ISO 11 063 qui traite de l'extraction d'ADN à partir du sol propose par exemple de débiter l'extraction par un broyage.

L'étape de purification vise à préserver l'ARN viral et à éliminer les autres molécules biologiques ainsi que les molécules inhibitrices de RT-PCR qui ont potentiellement étaient concentrées lors des phases préalables de préparation de l'échantillon. L'ARN est purifié par un mécanisme d'adsorption/élution à la surface de particules de silice conditionnées soit sous forme de colonnes, soit sous forme de billes magnétiques. Le conditionnement sous formes de billes magnétiques de silice s'adapte plus facilement au traitement de prises d'essai plus importantes et pourrait permettre de contourner des problématiques de saturation ou de colmatage qui peuvent être rencontrées avec les colonnes de silice. Deux des 7 laboratoires ayant répondu à l'enquête n'utilisent pas une purification à partir de billes magnétiques de silice (tableau 8 en annexe 1).

Les boues constituent une matrice spécifique de part leur richesse en matières organiques et en composés chimiques. Elles contiennent potentiellement de nombreux composés inhibiteurs susceptibles de réduire ou de supprimer les activités enzymatiques impliquées dans le mécanisme d'amplification propre à la (RT)-PCR. Il s'agit notamment des acides humiques et fulviques, des composés polyphénoliques, des métaux, (Schrader *et al.* 2012). Certains kits d'extraction proposent des formulations favorisant l'élimination des composés inhibiteurs en ajoutant par exemple des résines chélatantes. C'est le cas des kits commerciaux dédiés à l'extraction dans des sols, dans des fèces et des biosolides. Des colonnes de retrait des inhibiteurs permettant d'accroître la pureté de l'ARN viral sont également commercialisées, et peuvent être utilisées en complément des étapes initiales de purification. Le fournisseur mentionné par 4 laboratoires revendique des rendements de 50 à 90 % pour les colonnes de retrait d'inhibiteurs utilisées.

Dans la mesure où la présence résiduelle de composés inhibiteurs pourrait conduire à une sous-estimation ou à la déclaration de faux négatifs lors de l'utilisation des méthodes de RT-PCR, il convient d'introduire des contrôles permettant de vérifier le rendement de la méthode d'extraction et le bon déroulement des étapes d'amplification. Des contrôles internes d'extraction et d'inhibition doivent être réalisés par les laboratoires.

Les pratiques des laboratoires sont en cohérence avec les contraintes techniques qu'imposent les spécificités de la matrice boue. La majorité des laboratoires utilise des kits commerciaux d'extraction. La purification est majoritairement réalisée à partir de billes magnétiques de silice. Néanmoins un constat d'hétérogénéité peut à nouveau être dressé concernant la variété des techniques d'extraction utilisées, qu'il s'agisse de la combinaison des catégories de lyse (chimique, mécanique ou thermique), de la nature des kits commerciaux ou des méthodes internes employées ainsi que de l'utilisation de méthodes complémentaires de purification. Des travaux récents sur les coronavirus révèlent la variabilité des rendements d'extraction : pour deux kits d'extraction/purification testés, l'étude de Graham *et al.* (2021) indique que le rendement médian d'un 1^{er} kit commercial est de 4% tandis que celui d'un second est de 16%, avec des valeurs s'étalant de 0 à 33% selon les échantillons. Ces mêmes auteurs soulignent que la congélation des échantillons pourrait avoir un impact négatif sur l'ARN viral lors de la phase de décongélation, ce qui rejoint les commentaires de l'un des laboratoires auditionnés. Une étude à paraître indique également la variabilité des rendements d'extraction à partir d'un contrôle interne d'extraction réalisé avec du bactériophage MS2 (Balboa *et al.* 2020).

Concernant l'étape d'extraction/purification il conviendrait *a minima* de s'accorder sur la nécessité d'intégrer en début de protocole une étape de lyse mécanique (broyage par billes), et en fin de protocole l'emploi de colonnes de retraits des inhibiteurs. La question se pose d'imposer ces étapes déjà mises en place par certains laboratoires et qui pourraient présenter un intérêt étant donné les caractéristiques de la matrice boue (richesse en matières organiques, en matières en suspension et en composés inhibiteurs de RT-PCR).

Par ailleurs, au regard de la variabilité des échantillons de boues, il faut souligner l'importance de disposer d'un contrôle interne d'extraction permettant de s'assurer du maintien d'un niveau de performance minimal du procédé d'extraction/purification sélectionné.

6.4 Amplification de l'ARN viral

Les coronavirus sont des virus enveloppés à ARN. Une représentation du génome de SARS-CoV-2 se trouve dans la figure 2 ci-contre (Yuan *et al.* 2020). L'ARN viral permet notamment l'expression des protéines de structure E, M, N et S impliquées respectivement dans la formation de l'enveloppe, de la membrane, de la capsid et des spicules. La protéine RdRp qui assure la réplication et la transcription est codée au niveau du gène ORF1ab. L'ARN viral peut être amplifié par une technique de transcription inverse suivie d'une amplification (RT-PCR ou RT-ddPCR).

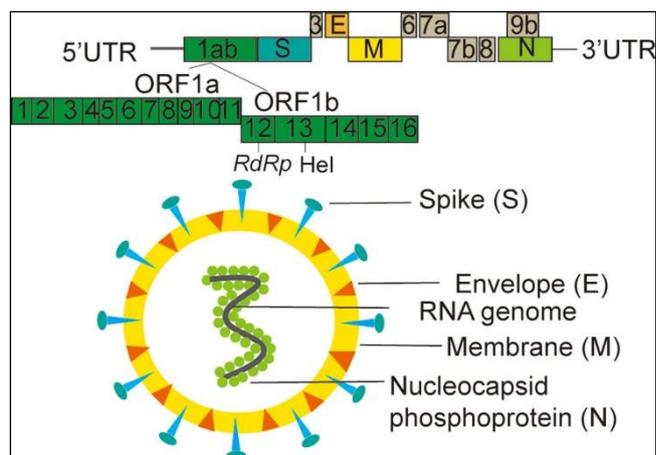


Figure 3 : Organisation du génome et structure du SARS-CoV-2 (Yuan *et al.* 2020)

Différents systèmes de RT-PCR ont été développés afin de permettre la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons cliniques¹⁵. Les réponses au questionnaire adressé aux laboratoires indiquent que les systèmes de RT-PCR utilisés par les laboratoires disposant d'une expérience sur la matrice boue, ciblent majoritairement la zone ORF1ab/RdRp et le gène E et mineure le gène N (tableau 9 en annexe 1). Pour 5 des 7 laboratoires, des cibles appartenant à la zone ORF1ab/RdRp et le gène E sont amplifiées en parallèle. L'un de ces laboratoires amplifie également une troisième cible au niveau du gène N. Concernant les deux autres laboratoires, le premier amplifie deux cibles distinctes dans la zone codant pour RdRp et le second, deux cibles distinctes du gène N. Dans la bibliographie en lien avec l'analyse du génome de SARS-CoV-2 dans les boues, les mêmes cibles ont été amplifiées mais à partir de systèmes internes (Ahmed, Bertsch, Angel, *et al.* 2020; Patrick M. D'Aoust *et al.* 2021; Graham *et al.* 2021; Jordan Peccia, Zulli, Brackney, Grubaugh, Kaplan, Casanovas-Massana, Ko, Malik, Wang, Wang, Warren, Weinberger, Arnold, *et al.* 2020). Plusieurs systèmes de PCR ont été proposés pour une même région. Par exemple concernant le gène N, chacune des portions N1, N2 et N3 dispose d'un système d'amplification¹⁶.

Qu'il s'agisse de kit commerciaux ou de systèmes de RT-PCR internes aux laboratoires, on constate que les analyses de RT-PCR sont toujours réalisées à partir d'au moins deux cibles distinctes voire trois. Cette stratégie a été retenue afin d'accroître la fiabilité des analyses vis-à-vis des risques de faux positifs, ou de sensibilité analytique insuffisante. En effet, la spécificité des systèmes de RT-PCR, leurs limites de détection et leurs sensibilités aux inhibiteurs de PCR peuvent varier d'un système de RT-PCR à un autre (Balboa *et al.* 2020). La multiplicité des cibles constitue également une garantie pour la détection du génome de SARS-CoV-2 en cas de mutations. Ainsi, dans le contexte de diagnostic clinique, la Haute Autorité de Santé préconise que le test comporte au moins deux cibles et précise qu'en cas de résultats discordants entre les différentes cibles, une nouvelle analyse doit être réalisée sur un nouveau prélèvement (avis de la HAS du 6 mars 2020). Dans la continuité, l'arrêté du 12 mai 2020, précise que « le dispositif médical de diagnostic *in vitro* utilisé doit avoir été préalablement validé par le Centre National de Référence des virus des infections respiratoires (dont la grippe) ou disposer d'un marquage CE. Dans tous les cas, le test utilisé doit détecter au moins deux séquences virales et doit être mentionné dans le compte rendu ». De fait les kits commerciaux employés par les laboratoires satisfont très majoritairement à l'exigence de cibles multiples.

L'exploitation des données du questionnaire indique que 3 laboratoires sur 7 disposent de systèmes de RT-PCR quantitatifs, les 4 autres emploient des systèmes qualitatifs (tableau 9 en annexe 1). Comme discuté ci-dessus, la cohérence des résultats obtenus à partir des 2 ou 3 cibles amplifiées doit être vérifiée. Dans le cas de résultats qualitatifs la concordance sera facilement vérifiable d'une

¹⁵ https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/whoinhouseassays.pdf?sfvrsn=de3a76aa_2

¹⁶ <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>

cible à une autre et éventuellement d'un laboratoire à un autre sous réserve que leurs limites de détection soient similaires. En revanche, dans le cas de résultats quantitatifs, en l'absence d'un matériau de référence permettant de standardiser le dénombrement des unités génomes des différentes cibles la comparaison des résultats pourrait s'avérer délicate. Dans ce contexte, l'utilisation de la PCR digitale pourrait être explorée. Des kits cliniques de PCR digitale sont disponibles mais aucun laboratoire de l'enquête n'a utilisé cette technique pour la matrice boue. Certains travaux récents soulignent cependant l'intérêt de cette méthode qui apparait comme moins sensible aux inhibiteurs de PCR (Dingle *et al.* 2013; Graham *et al.* 2021). Quelques publications de surveillance des niveaux de contamination du génome de SARS-CoV-2 dans les matrices résiduelles y compris des boues s'appuient sur cette méthode (Ahmed, Bertsch, Angel, *et al.* 2020; Patrick M. D'Aoust *et al.* 2021; Gonzalez *et al.* 2020).

Concernant l'étape d'amplification, la pratique actuelle qui semble découler des exigences posées dans le domaine clinique et qui consiste en l'analyse d'un minimum de deux cibles devrait être maintenue et exigée.

Les zones du génome ORF1ab/RdRp et le gène E sont actuellement majoritairement ciblées dans les modes opératoires des laboratoires consultés. Il conviendrait cependant d'évaluer les performances analytiques des cibles localisées sur le gène N décrites dans la bibliographie pour préciser leur intérêt et définir *a minima* la nature des 2 voire 3 zones codantes à cibler et surtout plus précisément les séquences des systèmes de RT-PCR de référence.

Il conviendrait de comparer les performances relatives des différents systèmes sur la base des résultats qualitatifs avant d'envisager une comparaison sur une base quantitative. La spécificité analytique (capacité à ne détecter que le coronavirus SARS-CoV-2) et la sensibilité analytique (limite de détection) seraient retenues comme critères d'une première sélection, d'un premier tri.

Les informations concernant la nature du mode opératoire utilisé (méthode interne, kits commerciaux), le cas échéant le kit fournisseur utilisé, la nature des cibles amplifiées, le résultat de RT-PCR de chacune et une conclusion sur l'analyse d'un point de vue qualitatif (présence/absence) ou quantitatif, devraient figurer sur les rapports d'analyses.

6.5 Validation des méthodes

La détermination de chaque étape du protocole d'analyse entre les prétraitements de l'échantillon et l'obtention des résultats peut être associée à une caractérisation des performances de la méthode globale. Il existe plusieurs références de méthodes de validation selon les secteurs d'activités. A titre d'information, il est rappelé que l'ANSES dispose d'un référentiel de validation de méthodes (ANSES, 2015).

6.5.1 Spécificité analytique

La spécificité des zones de génome ciblées lors de la RT-PCR est fondamentale pour éviter toute erreur de détection ou de quantification qui pourrait être induite par la survenue de réactions croisées avec le génome d'autres micro-organismes notamment avec d'autres virus respiratoires (Corman *et al.* 2020). De ce point de vue l'utilisation de kits commerciaux pourrait présenter un avantage car leur commercialisation suppose que des données soient disponibles du fait des marquages CE, FDA et/ou de la validation par le CNR des virus respiratoires. Néanmoins il doit être retenu que les risques d'amplification non spécifiques pourraient être plus importants lors de l'analyse de boue de STEU du fait d'une diversité microbienne plus importante que celles des prélèvements cliniques. Par exemple, la présence de différents coronavirus a été observée dans des boues primaires de STEU (Bibby et Peccia 2013; Graham *et al.* 2021; Jordan Peccia, Zulli, Brackney, Grubaugh, Kaplan, Casanovas-Massana, Ko, Malik, Wang, Wang, Warren, Weinberger, Arnold, *et al.* 2020). La réalisation d'amplification sur au moins deux cibles distinctes et la prise en compte de la cohérence des résultats obtenus sur les différentes cibles apparait également comme une garantie vis-à-vis des risques d'aspécificité.

6.5.2 Limite de détection

Même s'il existe un lien direct entre la limite de détection du système de RT-PCR et celle de la méthode d'analyse considérée dans son ensemble, les deux doivent être clairement dissociées. La limite de détection globale prenant en compte l'ensemble du mode opératoire sera nécessairement plus élevée (tableaux 10 à 13 en annexe 2). Le niveau de limite de détection atteint est relié à la capacité des modes opératoires à concentrer, isoler et purifier l'ARN car la présence d'inhibiteurs de RT-PCR en quantité trop importante dans les extraits à analyser implique de réaliser des dilutions de ces extraits en amont des RT-PCR. Les niveaux de dilution pratiqués sont classiquement de l'ordre d'un facteur 10, néanmoins des dilutions d'un facteur 50 sont parfois nécessaires voire insuffisantes pour certains échantillons (Graham *et al.* 2021). La limite de détection est alors augmentée proportionnellement au facteur de dilution appliqué.

6.5.3 Rendement

Etant donné la complexité d'accéder aux micro-organismes et notamment aux virus dans les boues liquides et solides, l'évaluation des rendements de désorption et de concentration, et idéalement de l'ensemble de la méthode en incluant les étapes d'extraction et de purification des ARN viraux, apparaît comme une nécessité. Il s'agit en effet d'un paramètre important pour mieux évaluer la limite de détection dans ces matrices.

Il est possible de déterminer un rendement de l'ensemble du mode opératoire à partir de boues artificiellement contaminées grâce à une suspension de SARS-CoV-2 ou de coronavirus bovin (souche vaccinale) ou MHV utilisés comme modèles et dont la manipulation est moins contraignante puisqu'elle ne nécessite pas de disposer d'un laboratoire NSB3 (Gonzalez *et al.* 2020; Graham *et al.* 2021). Dans ce cas de figure, les virus sont obtenus en laboratoire à partir d'une culture cellulaire. Il est ainsi possible d'accéder à des suspensions de particules virales de fortes concentrations permettant de contaminer des échantillons avec des niveaux élevés de charges virales ce qui facilite la détermination du rendement des méthodes à évaluer. Il est cependant difficile de reproduire le comportement des particules virales naturellement présentes dans les boues à partir des suspensions de virus. Lors de la phase de contamination artificielle, l'adsorption aux matières en suspension des virus produits en laboratoire pourrait être moindre que celle qui caractérise les boues naturellement contaminées, favorisant ainsi la surestimation des rendements de désorption et de concentration obtenus à partir des éluats. Cette surestimation pourrait être accentuée du fait des forts niveaux de contamination classiquement mis en œuvre lors des contaminations artificielles. De la même manière, les rendements des étapes d'extraction et de purification pourraient également être surestimés. Par ailleurs, il doit être souligné que l'efficacité de la phase d'homogénéisation consécutive à l'ajout de la suspension virale peut être affectée par la nature et la texture de la boue. Les rendements doivent donc être confirmés sur différentes prises d'essais.

Afin de contourner ces difficultés et d'accroître la représentativité des rendements évalués, il est préférable si possible de comparer les différentes méthodes à une méthode de référence au travers de rendements relatifs. Les limites sont alors la disponibilité d'échantillons naturellement contaminés à des niveaux de concentration suffisamment élevés et la nécessité de vérifier l'homogénéité du niveau de contamination dans la boue et *a fortiori* dans les différentes prises d'essai qui seront réalisées pour évaluer les méthodes entre elles. Si l'utilisation de boues naturellement contaminées est à favoriser, elle pose tout de même le problème d'une part de la connaissance de la charge virale réelle de l'échantillon, d'autre part de l'évaluation de la robustesse des méthodes qui devront être évaluées sur un panel de boues très hétérogènes en termes de composition et de texture.

Au travers des réponses obtenues à partir du questionnaire, il est apparu que peu de laboratoires connaissent le rendement du mode opératoire qu'ils appliquent ou qui est en cours de développement. Les rendements disponibles, ont été obtenus par contamination artificielle à partir de coronavirus bovin et pour une diversité réduite d'échantillons. Un laboratoire de l'enquête dispose de valeurs de rendement établies après contamination artificielle d'échantillons de boues liquides après optimisation du protocole : des rendements de 20 à 40% pour l'ensemble de la méthode ont été déterminés à partir de boues liquides issues de deux STEU distinctes. Comme précédent expliqué il est probable que ces valeurs surestiment les rendements qui pourraient être obtenus sur ces

mêmes échantillons naturellement contaminés. Les valeurs de rendement ainsi obtenus doivent être considérées comme des valeurs hautes difficilement transposables aux échantillons naturellement contaminés.

Peu de données sur le rendement sont disponibles et celles qui le sont proviennent d'essais réalisés avec du coronavirus bovin utilisé comme modèle afin de s'affranchir de manipulations en laboratoire NSB3. La quasi absence de caractérisation des méthodes sur un panel représentatif de boues liquide et solide ne permet pas actuellement d'accéder à des valeurs de rendements fiables.

Les boues sont des matrices très complexes pour lesquelles il peut être difficile d'obtenir un échantillon homogène et pour lesquelles des dopages artificiels ne garantissent pas un comportement similaire à ce qui pourrait être observé avec des échantillons naturellement contaminés. L'efficacité des méthodes de désorption et de concentration pourrait être significativement différente avec des boues naturellement contaminées et des boues artificiellement contaminées

Il serait nécessaire de déterminer une méthode de référence afin de pouvoir comparer les performances des méthodes entre elles sur la base de rendements relatifs et de caractériser le matériau soumis à EIL.

La caractérisation des méthodes de détection/quantification du génome dans les boues constitue donc une étape critique car en l'absence d'informations sur les rendements de la méthode, il apparaît difficile de se prononcer sur le niveau réel de concentration du génome viral dans les boues.

6.6 Expression des résultats

Dans la matrice boue, les pratiques analytiques actuelles introduisent une étape de désorption puis de concentration nécessaires pour atteindre les niveaux de sensibilité et de représentativité attendus qui sont exprimés pour 10 g de MS.

Les publications en lien avec la détermination de génome de SARS-CoV-2 ou d'autre virus, tendent également à exprimer les résultats en Unités Génome ou Copies de génome en fonction de la matière sèche (Graham *et al.* 2021; Viau *et al.* 2011).

Ce mode d'expression permet la comparaison des quantifications de génome notamment dans les processus visant à mesurer des abattements.

En l'absence d'un matériau de référence consensuel et partagé, des écarts conséquents de quantification sont susceptibles d'être observés pour un même extrait quantifié dans différents laboratoires. Les niveaux de quantification obtenus au sein d'un même laboratoire sont comparables entre eux, par exemple au sein d'une filière de traitement ou dans le cadre de l'évaluation d'une cinétique de dégradation. En revanche, en l'absence d'essais interlaboratoires il semble prématuré de comparer les concentrations d'échantillons qui seraient analysés dans des laboratoires distincts. Pour cette raison il apparaît préférable que les résultats soient exprimés de manière qualitative.

La capacité d'un laboratoire à détecter la présence de génome dans un échantillon est liée à la limite de détection du mode opératoire employé, de sorte que pour les échantillons les moins contaminés notamment, il ne peut être exclu que différents laboratoires aboutissent à des résultats divergents. Pour ces raisons il semble indispensable que les laboratoires accompagnent les résultats qualitatifs de la limite de détection correspondante.

Un premier élément d'harmonisation pourrait être que les résultats soient exprimés sous forme d'UG/g de MS.

Dans l'attente d'évaluer les capacités de quantification des laboratoires par des EILs, il apparaît prématuré d'exprimer les résultats de manière quantitative, il serait préférable que les résultats soient exprimés de manière qualitative.

De plus il apparait important que les laboratoires puissent accompagner le résultat d'éléments d'information concernant les volumes de prises d'essais, le pourcentage de matière sèche de la boue et la limite de détection théorique qui en découle.

6.7 Synthèse méthodologique

L'excrétion de SARS-CoV-2 dans les selles des personnes infectées symptomatiques ou asymptomatiques a été relayée par plusieurs études (Elsamadony *et al.* 2021; Foladori *et al.* 2020; Gonzalez *et al.* 2020). Le SARS-CoV-2 semble en mesure de se multiplier dans des cellules du tractus gastro-intestinal (Fei Xiao, Tang, *et al.* 2020). Néanmoins, le potentiel infectieux initial des virus excrétés et son maintien dans le milieu environnemental restent à préciser notamment dans les matrices résiduelles (Sara Giordana Rimoldi, Stefani, Gigantiello, Polesello, Comandatore, Mileto, Maresca, Longobardi, Mancon, Romeri, Pagani, Cappelli, *et al.* 2020) voire le sol (Núñez-Delgado 2020). L'excrétion fécale des personnes infectées constitue une opportunité de disposer d'un indicateur du niveau de contamination d'une population donnée par la surveillance des eaux usées et potentiellement par celle des boues primaires des stations d'épuration. L'excrétion fécale du SARS-CoV-2 interroge également sur les risques de contamination des individus à partir des boues. Dans ce contexte la surveillance des niveaux de contamination des boues destinées à être épandues se pose. Deux stratégies ont été proposées, l'une s'appuie sur le suivi d'indicateurs de traitement que constituent les bactériophages cultivables, l'autre repose sur la détection du génome de SARS-CoV-2 qui pourrait permettre de distinguer les boues contaminées de celles caractérisées par une absence de détection. Les méthodes de culture des bactériophages sont connues et normalisées, ce qui n'est pas le cas des méthodes de détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les matrices environnementales complexes telles que les boues d'origine résiduelle.

Les méthodes de diagnostic humain permettant de détecter l'ARN viral du SARS-CoV-2 à partir d'échantillons cliniques sont majoritairement réalisées par RT-PCR à l'aide de kits commerciaux ayant fait l'objet d'une certification (CE ou FDA) et/ou d'une évaluation par le CNR des virus respiratoires. L'utilisation de la RT-PCR pour des échantillons environnementaux et notamment les matrices résiduelles, nécessite des adaptations pour répondre aux spécificités de ces échantillons dont la charge virale est diluée dans un milieu complexe, riche en composés inhibiteurs de RT-PCR et propice à l'adsorption sur les matières en suspension. Des méthodes de désorption, de concentration, et de purification doivent donc s'ajouter à l'étape d'extraction génomique qui est l'unique étape qui s'applique généralement aux échantillons cliniques.

La première étape de prétraitement applicable aux échantillons de boues est une étape de désorption puis de concentration de l'éluât obtenu. Les éléments bibliographiques disponibles sont en faveur d'une adsorption plus importante des virus enveloppés (dont le SARS-CoV-2) aux matières en suspension par rapport aux virus non enveloppés (Yinyin Ye *et al.* 2016b). Cette étape apparait donc comme particulièrement critique pour le SARS-CoV-2 (Lu *et al.* 2020). Les données bibliographiques indiquent que les rendements de désorption et de concentration sont fortement dépendant de la méthode utilisée et de la nature du virus recherché. Les valeurs de rendement obtenues à partir de virus modèle n'excèdent pas 40 %, et le recours à la contamination artificielle d'échantillons utilisée pour les déterminer, est susceptible de surestimer les performances de récupération des virus. Par ailleurs, les étapes de désorption et de concentration pourraient co-concentrer des inhibiteurs de PCR. Certains laboratoires considérant la faiblesse des rendements de récupération, leur variabilité en fonction des échantillons et les risques accrus d'inhibition de la RT-PCR, ont fait le choix de s'affranchir des étapes de désorption et de concentration en réalisant les analyses à partir de faibles prises d'essai typiquement inférieures à 1 g de matière brute. Cette modalité pose néanmoins la question de la représentativité des résultats obtenus, notamment lorsqu'on la confronte aux pratiques actuelles de rendu des résultats des analyses microbiologiques des boues pour épandage dont les seuils réglementaires sont exprimés pour 10 g de matière sèche. Il semblerait préférable de réaliser une étape de désorption et concentration permettant de traiter des prises d'essais représentatives cependant il n'existe pas à l'heure actuelle de mode opératoire consensuel, ni parmi les participants à notre enquête, ni dans la bibliographie. Avant de se prononcer sur un mode opératoire

qui pourrait être partagé, il apparaît nécessaire de conduire une étude visant à comparer différents protocoles de désorption et de concentration sur un panel de boues liquides et solides afin d'en évaluer les performances en termes de rendement et de retrait des inhibiteurs de RT-PCR. Les performances de désorption et de concentration des particules virales enveloppées devraient être évaluées parallèlement sur des échantillons naturellement et artificiellement contaminés avec un ou des virus modèles présents chez l'animal (ex : PEDV, BCoV), voire chez l'humain (Ex : HCoV-229E, faiblement pathogène) – (Gundy, Gerba et Pepper 2008; Rusiñol *et al.* 2020). L'intégration d'une phase d'homogénéisation par broyage lors de l'étape de désorption devrait notamment être évaluée.

Consécutivement à l'étape de désorption et de concentration, une étape d'extraction et de purification de l'ARN viral est réalisée. Comme discuté précédemment elle peut aussi être engagée directement à partir d'une faible prise d'essai de l'échantillon. Des kits commerciaux d'extraction et de purification adaptés à des matrices complexes telles que les selles, les sols, les biosolides, sont disponibles. Ils proposent des adaptations qui peuvent concerner l'ajout d'une extraction mécanique (broyeur à billes) voire d'une extraction thermique en complément de l'extraction chimique. Ces kits mettent également à disposition des procédés complémentaires de purification de l'ARN qui permettent le piégeage de certains inhibiteurs de RT-PCR. En dernier lieu des colonnes de retrait des inhibiteurs peuvent être utilisées pour compléter l'étape de purification. Pour répondre à la grande diversité des échantillons de boues et aux interférences associées, des contrôles internes d'extraction et d'inhibition sont systématiquement nécessaires pour vérifier le maintien des performances des phases d'extraction et de purification. Les laboratoires de l'enquête et les données bibliographiques montrent que les kits commerciaux adaptés aux matrices complexes sont largement utilisés, néanmoins la diversité des solutions retenues doit être soulignée. Par ailleurs, malgré la mise en œuvre de ces adaptations certains laboratoires de l'enquête, tout comme la bibliographie du domaine, alertent sur la persistance de phénomènes d'inhibition dans certaines boues. Le maintien d'inhibiteurs dans l'extrait d'ARN viral est susceptible de dégrader les limites de détection de la RT-PCR. Une évaluation des méthodes d'extraction et de purification de l'ARN viral devrait être réalisée en prenant en compte les différentes combinaisons de lyse, les différentes solutions de purification et notamment l'utilisation de colonnes de silice ou de billes magnétiques de silice, les procédés de piégeage d'inhibiteurs en solution ou sur colonne. La capacité d'automatisation du procédé d'extraction devrait également être considérée car elle pourrait présenter un avantage en termes de robustesse de la méthode. Comme pour l'étape de désorption/concentration, les critères d'évaluation devraient porter prioritairement sur les rendements d'extraction et la capacité à éliminer les inhibiteurs de RT-PCR, aussi bien à partir d'échantillons naturellement contaminés qu'artificiellement contaminés par des virus modèles des virus enveloppés.

L'amplification de l'ARN viral est réalisée à partir d'une prise d'essai de l'extrait d'ARN. La majorité des laboratoires d'analyses ayant répondu à l'enquête utilise des kits commerciaux, ce qui n'est pas le cas dans les travaux décrits par les publications du domaine. En effet, les laboratoires académiques s'appuient majoritairement sur des systèmes de PCR internes. Dans les deux cas, 2 cibles parfois 3 sont suivies en parallèle. Les amplifications ciblent majoritairement la région ORF1ab et notamment le gène RdRp, le gène E, mais aussi le gène N (Ahmed, Bertsch, Angel, *et al.* 2020; Balboa *et al.* 2020; Graham *et al.* 2021; Jordan Peccia, Zulli, Brackney, Grubaugh, Kaplan, Casanovas-Massana, Ko, Malik, Wang, Wang, Warren, Weinberger, Arnold, *et al.* 2020). De nombreux systèmes RT-PCR sont disponibles. L'ensemble des laboratoires de l'enquête ayant répondu utilise une amplification par RT-PCR temps réel, qui est également largement employée dans les travaux publiés. La multiplicité des cibles potentielles pose la question de leur choix car des divergences de sensibilité analytique ont été observées en fonction des systèmes de RT-PCR utilisés (Balboa *et al.* 2020). L'étude de la bibliographie indique que la méthode de ddRT-PCR semble faire l'objet d'un intérêt croissant car elle permettrait d'accroître la reproductibilité des résultats notamment en limitant l'impact des inhibiteurs de PCR. (Graham *et al.* 2021). Les nombreuses combinaisons potentielles entre les régions ciblées, les systèmes de RT-PCR eux-mêmes (amorces et sondes), et la méthodologie d'amplification employée (RT-PCR temps réel ou RT-ddPCR), pourraient entraîner des différences de performances importantes qu'il conviendrait d'évaluer sur des extraits issus de matrices complexes telles que les boues.

Au terme de l'amplification, le laboratoire exprime un résultat relatif à la présence de génome de SARS-CoV-2 dans l'échantillon analysé qui sera exprimé en unités génome ou copies de génome par unité de masse. Comme évoqué précédemment, l'analyse de génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons environnementaux complexes tels que les boues impliquent différentes étapes de préparation de l'échantillon dont les performances peuvent être très variables en fonction de la nature de l'échantillon et du virus. Qu'il s'agisse de l'étape de désorption/concentration, de l'étape d'extraction/purification de l'ARN viral, ou de l'amplification, l'incertitude associée à un résultat fourni pour un échantillon donné apparaît importante. La multiplicité des modes opératoires actuellement employés par les laboratoires d'analyses est une source supplémentaire d'hétérogénéité qui rend difficilement comparables les résultats obtenus d'un laboratoire à un autre.

En l'absence d'un matériau de référence consensuel et partagé, pour un même extrait quantifié des écarts conséquents de quantification sont susceptibles d'être observés dans différents laboratoires. Les quantifications réalisées au sein d'un même laboratoire sont comparables entre elles, par exemple au sein d'une filière de traitement ou dans le cadre de l'évaluation d'une cinétique de dégradation. En revanche, en l'absence d'essais interlaboratoires il semble prématuré de comparer les concentrations d'échantillons qui seraient analysés dans différents laboratoires. La capacité d'un laboratoire à détecter la présence de génome dans un échantillon est liée à la limite de détection du mode opératoire employé, de sorte que pour les échantillons les moins contaminés notamment, il ne peut être exclu que différents laboratoires aboutissent à des résultats divergents. Pour ces raisons il semble indispensable que les laboratoires accompagnent les résultats qualitatifs d'informations contextuelles et notamment de la limite de détection correspondante à l'analyse en particulier en cas de non détection.

7 Recommandations en lien avec les points critiques identifiés

En l'absence de donnée issue d'un plan d'expériences visant à identifier et comparer les performances des différentes stratégies analytiques, et en l'absence d'un nombre suffisant de publications, il paraît impossible de dresser des recommandations sur un mode opératoire complet. Néanmoins des préconisations en lien avec les points critiques identifiés sont proposées ci-dessous dans le tableau 7.

Tableau 9 : Recommandations en lien avec les points critiques identifiés pour la détection de génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons de boues.

| ETAPES ANALYTIQUES | PRECONISATIONS | OBJECTIFS |
|---|---|--|
| <u>CONSERVATION DES ECHANTILLONS.</u> | Privilégier l'analyse d'échantillons frais (non congelés), conservés à 5±3°C et analysés le plus rapidement possible dans les deux jours suivants le prélèvement. | Limiter les risques de dégradation de l'ARN lors de la décongélation et/ou la conservation des échantillons. |
| <u>DETERMINATION DE LA MATIERE SECHE DE L'ECHANTILLON</u> | Déterminer la matière sèche selon la norme NF EN 12 880, idéalement sous accréditation. | Ce type d'expression est nécessaire pour permettre une comparaison des résultats obtenus d'un laboratoire à un autre ou d'un échantillon à un autre. Assurer une continuité par rapport à l'arrêté de 1998 concernant l'épandage des boues, et dans lequel les limites de concentration applicables aux paramètres microbiologiques sont exprimées en unité pour 10 grammes de matière sèche. |
| <u>DESORPTION / CONCENTRATION</u> | | |
| <p>Faute d'informations suffisantes sur les performances des méthodes de désorption et de concentration, applicables au SARS-CoV-2 dans les boues, aucune préconisation ne peut être faite à ce stade concernant cette étape. Néanmoins, l'attention est attirée :</p> <ul style="list-style-type: none"> - sur l'importance de disposer <i>a minima</i> au laboratoire d'une étape d'homogénéisation décrite par écrit pour les échantillons de boues liquides et pour ceux de boues solides, - sur la faible représentativité des analyses réalisées à partir de prises d'essais réduites (< 1 g de MB). | | |

Tableau 7 (suite) : Recommandations en lien avec les points critiques identifiés pour la détection de génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons de boues.

| | | |
|-----------------------------------|---|--|
| EXTRACTION GÉNO- MIQUE | Utiliser un kit d'extraction dédié à l'analyse de matrices complexes (fèces, sols, boues, biosolides). Vérifier le domaine d'application des kits utilisés. | Prise en compte des spécificités propres aux échantillons de boues (texture, inhibiteurs de RT-PCR, ...). |
| | Inclure systématiquement une étape de purification de l'ARN, complémentaire à celles déjà disponibles au niveau des kits d'extraction. Utiliser une colonne de retrait des inhibiteurs (ex : « Colonne One Step inhibitors removal » ¹⁷ ou tout autre système affichant des performances équivalentes). | Optimisation et harmonisation des étapes de retrait des inhibiteurs de RT-PCR en prenant en compte les risques accrus d'inhibition sur la matrice boue |
| | Inclure un contrôle interne positif d'extraction. Utiliser un virus modèle des virus enveloppés si possible proche du genre Coronavirus, et adapté au niveau de sécurité biologique du laboratoire. | Vérifier le maintien des performances du procédé d'extraction pour les différents types d'échantillons de boues analysés. |
| | <u>Optionnel :</u> Réaliser deux extractions indépendantes sur deux prises d'essai distinctes et de masse ou volume similaires. | Compenser le manque de robustesse des modes opératoires et/ou le manque d'homogénéité de l'échantillon. |
| AMPLIFICATION (RT-PCR) | Utiliser un kit d'amplification certifié et/ou validé disposant de contrôles internes d'inhibition : CE, FDA et/ou validation du CNR des virus respiratoires. | Utiliser des kits d'amplification multicibles et ayant fait l'objet d'une étude de sensibilité et de spécificité vis-à-vis notamment des autres virus respiratoires. |
| | Amplification multicibles : réaliser l'analyse en s'appuyant sur l'amplification <i>a minima</i> de deux cibles (gène ORF1ab/RdrP, gène E, gène N). | |
| | Contrôle de cohérence sur le résultat obtenu pour au moins deux cibles amplifiées à partir du même extrait. En cas d'incohérence entre les résultats obtenus pour les différentes cibles, réaliser une nouvelle amplification. | |
| | <u>Optionnel :</u> Réaliser l'amplification multicibles à partir de deux extraits distincts. | |

¹⁷ Consommable commercialisé par ZYMO research

Tableau 7 (suite) : Recommandations en lien avec les points critiques identifiés pour la détection de génome de SARS-CoV-2 dans les échantillons de boues.

| | | |
|--|--|--|
| <u>EXPRESSION DES RESULTATS</u> | Indiquer sur le rapport d'analyses la prise d'essai initiale d'échantillon utilisée pour l'analyse en matière brute et en matière sèche. | Evaluer la représentativité de la prise d'essai. |
| | Indiquer sur le rapport d'analyses le pourcentage de MS de l'échantillon. | Permettre l'expression des résultats en fonction de la matière sèche afin de les rendre facilement comparables d'un échantillon à un autre. |
| | Fournir un résultat qualitatif de type présence/absence de génome de SARS-CoV-2 par unité de masse exprimée en matière sèche. | En l'absence de matériau de référence et d'EILs permettant de vérifier l'intercalibration des laboratoires pour des résultats quantitatifs, se limiter à une expression des résultats « présence/absence » accompagnés de la limite de détection correspondant aux modalités d'analyses. |
| | Indiquer sur le rapport d'analyses les cibles utilisées pour l'amplification ainsi que les résultats associés : si disponible la concentration en UG par unité de matière sèche et à défaut la valeur de Ct. | Affichage et vérification de la cohérence des résultats obtenus pour les différentes cibles. |
| | Indiquer sur le rapport d'analyses le niveau de dilution de l'ARN viral extrait avant amplification. | Associer aux résultats qualitatifs la limite de détection applicable à l'échantillon analysé. |
| | Indiquer sur le rapport d'analyses la limite de détection correspondant à l'analyse de l'échantillon en fonction des modalités d'analyses (prise d'essai, dilutions de l'extrait, ...). | |
| | En cas d'inhibition non levée, indiquer « Ininterprétable » en résultat et préciser en commentaire la présence d'inhibiteurs de RT-PCR. | Faire apparaître clairement l'impossibilité de lever l'inhibition, sur le rapport d'analyses |

Par ailleurs il est rappelé à l'attention des laboratoires d'analyses qu'un référentiel de validation intégrant les méthodes de RT-PCR est accessible en ligne (Anses 2015).

8 Mode opératoire de référence

Pour la plupart des paramètres microbiologiques, les résultats sont dépendants de la méthode utilisée, c'est pourquoi il convient de définir et de caractériser les performances d'une méthode de référence. Cette méthode fait actuellement défaut pour la détection du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Dans cet objectif, à l'issue de l'analyse des retours d'expérience disponibles, plusieurs questions méthodologiques se posent et nécessiteraient la réalisation d'une validation selon un plan d'expériences qui permettrait de valider les points suivants :

- modalités de conservation des échantillons et durée : congélation ou conservation au frais car risque de dégradation accrue des ARN viraux pendant la phase de décongélation,
- développement d'un mode opératoire de désorption/concentration présentant un rendement élevé, évitant la co-concentration des inhibiteurs de PCR, et efficace sur de nombreux types de boues différentes (solides et liquides).
- sélection d'un mode opératoire d'extraction/purification du génome viral,
- choix d'un (ou plusieurs) virus modèle(s) pour évaluer ces différents points,
- intérêt de la RT-ddPCR encore peu explorée et qui pourrait être avantageuse pour améliorer la robustesse analytique notamment en limitant l'impact des inhibiteurs de RT-PCR.

9 Conclusions

Ce rapport d'appui scientifique et technique apporte des données et des connaissances scientifiques et techniques en lien avec deux points particuliers de la saisine du MTEL qui vise à préciser les modalités d'épandage des boues issues du traitement des eaux usées pendant la crise de COVID-19. Le premier point concerne les modalités d'analyse du SARS-CoV-2 dans les boues, le second est en lien avec la méthode de RT-PCR pour laquelle étaient attendus des recommandations sur la méthode de préparation, la prise d'essai, la méthode d'extraction du virus de la matrice boue, la méthode d'extraction des acides nucléiques et la matrice appropriée pour l'accréditation de la méthode RT-PCR.

Compte tenu de l'apparition récente de l'épidémie de COVID-19, il n'existe pas de méthode reconnue et faisant consensus pour la recherche ou la quantification de SARS-CoV-2 dans les boues ni même dans les eaux usées. Il n'existe pas non plus de laboratoire national de référence sur les matrices résiduelles compétent en microbiologie qui aurait pu engager des travaux de standardisation et de validation d'une méthode d'analyse pouvant avoir le statut de référence. Aussi, afin de disposer d'un état des lieux des compétences des laboratoires analytiques agréés sur les matrices résiduelles, un questionnaire a été diffusé par le LHN pour recueillir leurs pratiques. Parallèlement à l'analyse des réponses au questionnaire, des auditions ont été menées par le LHN pour obtenir des informations plus spécifiques en lien avec les retours d'expérience de laboratoires identifiés comme ayant réalisé des volumes conséquents d'analyses de boues lors de ces derniers mois. Le contexte relatif à l'accréditation des analyses microbiologiques et le positionnement des analyses de biologie moléculaire appliquées à l'analyse des boues au niveau des projets de recherche ont également été explorés au travers de ces auditions.

Dans le domaine des eaux usées, également sans référentiel normatif, un réseau de laboratoires académiques compétent sur cette matrice s'est formé à la faveur d'un projet de recherche (OBEPINE) et a été rejoint par quelques laboratoires d'analyses. Les informations recueillies, indiquent que le regroupement des compétences disponibles dans le réseau OBEPINE a permis de partager le retour d'expérience acquis sur les pratiques analytiques appliquées aux eaux usées. Ceci a permis d'engager une réflexion d'homogénéisation des modes opératoires, notamment par la mise en place d'EILs restreints car uniquement réalisés par les équipes de recherche à l'origine des différents protocoles actuellement utilisés pour la surveillance des eaux usées. La matrice boue n'a pas été prise en compte dans ces travaux.

Aucune structure normative, académique ou de référence n'est actuellement en mesure de proposer une méthode de référence. Par conséquent les laboratoires qui ont analysé des échantillons de boues pour rechercher du génome de SARS-CoV-2, se sont basés sur leur propre expérience et leur propre développement, ce qui explique le constat d'hétérogénéité qui se dégage des retours du questionnaire adressé aux laboratoires et des auditions. La diversité constatée dans les pratiques analytiques des laboratoires à toutes les étapes des modes opératoires, pourrait conduire à des performances significativement différentes. Une évaluation des performances des laboratoires serait donc particulièrement utile mais actuellement, un seul laboratoire dispose d'une accréditation dans le domaine de la microbiologie des boues, et elle ne concerne que la recherche des entérovirus cultivables et de leur génome par RT-PCR. Qu'il s'agisse des MF/SC ou des boues, en dehors du laboratoire mentionné ci-dessus, l'état actuel des accréditations ne permet donc pas d'identifier de structures disposant de compétences analytiques par biologie moléculaire (PCR ou RT-PCR) pour les paramètres microbiologiques sur ces matrices. Tenant compte de cette configuration, il serait difficile et long d'aboutir à l'accréditation de laboratoires pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues. Une stratégie alternative pourrait être de privilégier les laboratoires disposant d'une bonne connaissance des matrices boues et MF/SC du point de vue des analyses microbiologiques conventionnelles et qui par ailleurs disposeraient de compétences en PCR ou RT-PCR sur d'autres matrices. Les laboratoires qui en plus de leur activité MF/SC, sont présents dans les activités en lien avec la santé animale ou végétale pourraient correspondre à ce profil.

Dans l'attente d'un protocole analytique consensuel et partagé, il convient que chaque laboratoire puisse caractériser les performances et les limites de sa méthode afin de fixer des critères d'acceptation des résultats d'analyse et statuer sur la recevabilité des résultats obtenus pour un échantillon donné. A cet effet, des recommandations sur les points critiques identifiés sont proposés dans ce rapport afin d'améliorer la robustesse des résultats qui peuvent être actuellement produits par certains laboratoires. Associés à un protocole de validation de méthode pour caractériser l'ensemble du processus d'extraction et d'analyse, ces éléments pourraient apporter des garanties utiles aux démarches d'accréditation. Ces éléments restent cependant insuffisants pour garantir totalement la fiabilité et la comparaison des résultats produits dans différents laboratoires : seule l'utilisation d'un protocole harmonisé et validé pourrait le permettre.

En l'absence de donnée issue d'un plan d'expériences visant à identifier et comparer les performances des différentes stratégies analytiques possibles, et en l'absence d'un nombre suffisant de publications, il paraît actuellement impossible de dresser des recommandations sur un mode opératoire de référence complet. Une démarche d'évaluation globale pourrait être engagée pour comparer et déterminer les modalités analytiques les plus performantes pour chacune des étapes clés de préparation de l'échantillon puis d'analyse. Il s'agirait d'obtenir des éléments en lien avec la répétabilité, la robustesse et le rendement global des méthodes à comparer. Idéalement ces éléments pourraient être évalués par un laboratoire référent puis préciser par le déroulement d'un EIL sous réserve que ce dernier implique un nombre suffisant de participants ($n > 10$).

Date de validation du rapport : le 12 janvier 2021.

10 Bibliographie

10.1 Publications

- Ahmed, Warish, Paul M Bertsch, Nicola Angel, Kyle Bibby, Aaron Bivins, Leanne Dierens, Janette Edson, John Ehret, Pradip Gyawali, Kerry A Hamilton, Ian Hosegood, Philip Hugenholtz, Guangming Jiang, Masaaki Kitajima, Homa T Sichani, Jiahua Shi, Katja M Shimko, Stuart L Simpson, Wendy J M Smith, Erin M Symonds, Kevin V Thomas, Rory Verhagen, Julian Zaugg, and Jochen F Mueller. 2020. "Detection of SARS-CoV-2 RNA in commercial passenger aircraft and cruise ship wastewater: a surveillance tool for assessing the presence of COVID-19 infected travellers." *Journal of Travel Medicine* 27 (5). doi: <https://doi.org/10.1093/jtm/taaa116>.
- Anses. 2015. Guide de validation des méthodes d'analyses. Maisons-Alfort : Anses.
- Anses. 2020. Etat des lieux des capacités analytiques des laboratoires (mesures directes et indirectes) concernant le SARS-CoV-2, dans les matrices résiduelles. Maisons-Alfort: Anses.
- Balboa, Sabela, Miguel Mauricio-Iglesias, Santiago Rodriguez, Lucía Martínez-Lamas, Francisco J. Vasallo, Benito Regueiro, and Juan M. Lema. 2020. "The fate of SARS-CoV-2 in WWTPs points out the sludge line as a suitable spot for monitoring." medRxiv:2020.05.25.20112706. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.25.20112706>.
- Barril, Patricia Angélica, Luis Alfredo Pinciola, Melina Mazzeo, María Julia Ousset, María Virginia Jauregui-berry, Mauricio Alessandrello, Gloria Sánchez, and Juan Martín Oteiza. 2021. "Evaluation of viral concentration methods for SARS-CoV-2 recovery from wastewaters." *Science of The Total Environment* 756:144105. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144105>.
- Belguith, Khaoula, Abdennaceur Hassen, and Mahjoub Aouni. 2006. "Comparative study of four extraction methods for enterovirus recovery from wastewater and sewage sludge." *Bioresource Technology* 97 (3):414-419. doi: <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.03.022>.
- Bibby, Kyle, and Jordan Peccia. 2013. "Identification of viral pathogen diversity in sewage sludge by metagenome analysis." *Environmental science & technology* 47 (4):1945-1951. doi: 10.1021/es305181x.
- Cadiergues, Bérangère. 2000. "Boues d'épuration et micro-organismes pathogènes : influence de différents traitements et du stockage." Université Henri Poincaré - Nancy 1.
- Corman, Victor M, Olfert Landt, Marco Kaiser, Richard Molenkamp, Adam Meijer, Daniel KW Chu, Tobias Bleicker, Sebastian Brünink, Julia Schneider, Marie Luisa Schmidt, Daphne GJC Mulders, Bart L Haagmans, Bas van der Veer, Sharon van den Brink, Lisa Wijsman, Gabriel Goderski, Jean-Louis Romette, Joanna Ellis, Maria Zambon, Malik Peiris, Herman Goossens, Chantal Reusken, Marion PG Koopmans, and Christian Drost. 2020. "Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR." *Eurosurveillance* 25 (3):2000045. doi: <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045>.
- D'Aoust, Patrick M., Elisabeth Mercier, Danika Montpetit, Jian-Jun Jia, Ilya Alexandrov, Nafisa Neault, Aiman Tariq Baig, Janice Mayne, Xu Zhang, Tommy Alain, Marc-André Langlois, Mark R. Servos, Malcolm MacKenzie, Daniel Figeys, Alex E. MacKenzie, Tyson E. Graber, and Robert Delatolla. 2021. "Quantitative analysis of SARS-CoV-2 RNA from wastewater solids in communities with low COVID-19 incidence and prevalence." *Water Research* 188:116560. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116560>.
- Dingle, Tanis C, Ruth Hall Sedlak, Linda Cook, and Keith R Jerome. 2013. "Tolerance of Droplet-Digital PCR vs Real-Time Quantitative PCR to Inhibitory Substances." *Clinical Chemistry* 59 (11):1670-1672. doi: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2013.211045>.
- Elsamadony, Mohamed, Manabu Fujii, Takayuki Miura, and Toru Watanabe. 2021. "Possible transmission of viruses from contaminated human feces and sewage: Implications for SARS-CoV-2." *Science of The Total Environment* 755:142575. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142575>.
- Foladori, Paola, Francesca Cutrupi, Nicola Segata, Serena Manara, Federica Pinto, Francesca Malpei, Laura Bruni, and Giuseppina La Rosa. 2020. "SARS-CoV-2 from faeces to wastewater treatment: What do we know? A review." *Science of The Total Environment* 743:140444. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140444>.
- Gonzalez, Raul, Kyle Curtis, Aaron Bivins, Kyle Bibby, Mark H. Weir, Kathleen Yetka, Hannah Thompson, David Keeling, Jamie Mitchell, and Dana Gonzalez. 2020. "COVID-19 surveillance in Southeastern Virginia using wastewater-based epidemiology." *Water Research* 186:116296. doi: <https://doi.org/10.1016/j.watres.2020.116296>.
- Graham, Katherine E., Stephanie K. Loeb, Marlene K. Wolfe, David Catoe, Nasa Sinnott-Armstrong, Sooyeol Kim, Kevan M. Yamahara, Lauren M. Sassoubre, Lorelay M. Mendoza Grijalva, Laura Roldan-Hernandez, Kathryn Langenfeld, Krista R. Wigginton, and Alexandria B. Boehm. 2021. "SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids Is Associated with COVID-19 Cases in a Large Urban Sewershed." *Environmental Science & Technology* 55 (1):488-498. doi: <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c06191>.

- Gundy, Patricia M., Charles P. Gerba, and Ian L. Pepper. 2008. "Survival of Coronaviruses in Water and Wastewater." *Food and Environmental Virology* 1 (1):10. doi: 10.1007/s12560-008-9001-6.
- Kaplan, Edward H., Dennis Wang, Mike Wang, Aryn A. Malik, Alessandro Zulli, and Jordan Peccia. 2020. "Aligning SARS-CoV-2 indicators via an epidemic model: application to hospital admissions and RNA detection in sewage sludge." *Health Care Management Science* in press. doi: <https://doi.org/10.1007/s10729-020-09525-1>.
- Lu, Dingnan, Zhuangrong Huang, Jiayue Luo, Xiaoqi Zhang, and Sha Sha. 2020. "Primary concentration – The critical step in implementing the wastewater based epidemiology for the COVID-19 pandemic: A mini-review." *Science of The Total Environment* 747:141245. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141245>.
- Monpoeho, S., A. Maul, B. Mignotte-Cadiergues, L. Schwartzbrod, S. Billaudel, and V. Ferré. 2001. "Best Viral Elution Method Available for Quantification of Enteroviruses in Sludge by Both Cell Culture and Reverse Transcription-PCR." *Applied and Environmental Microbiology* 67 (6):2484. doi: <https://doi.org/10.1128/AEM.67.6.2484-2488.2001>.
- Núñez-Delgado, Avelino. 2020. "SARS-CoV-2 in soils." *Environmental Research* 190:110045. doi: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110045>.
- Peccia, Jordan, Alessandro Zulli, Doug E. Brackney, Nathan D. Grubaugh, Edward H. Kaplan, Arnau Casanovas-Massana, Albert I. Ko, Aryn A. Malik, Dennis Wang, Mike Wang, Joshua L. Warren, Daniel M. Weinberger, Wyatt Arnold, and Saad B. Omer. 2020. "Measurement of SARS-CoV-2 RNA in wastewater tracks community infection dynamics." *Nature Biotechnology* 38 (10):1164-1167. doi: 10.1038/s41587-020-0684-z.
- Rimoldi, Sara Giordana, Fabrizio Stefani, Anna Gigantiello, Stefano Polesello, Francesco Comandatore, Davide Mileto, Mafalda Maresca, Concetta Longobardi, Alessandro Mancon, Francesca Romeri, Cristina Pagani, Francesca Cappelli, Claudio Roscioli, Lorenzo Moja, Maria Rita Gismondo, and Franco Salerno. 2020. "Presence and infectivity of SARS-CoV-2 virus in wastewaters and rivers." *Science of The Total Environment* 744:140911. doi: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140911>.
- Rusiñol, Marta, Sandra Martínez-Puchol, Eva Forés, Marta Itarte, Rosina Girones, and Silvia Bofill-Mas. 2020. "Concentration methods for the quantification of coronavirus and other potentially pandemic enveloped virus from wastewater." *Current Opinion in Environmental Science & Health* 17:21-28. doi: <https://doi.org/10.1016/j.coesh.2020.08.002>.
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek, and R. John. 2012. "PCR inhibitors – occurrence, properties and removal." *Journal of Applied Microbiology* 113 (5):1014-1026. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>.
- Viau, Emily, Kyle Bibby, Tania Paez-Rubio, and Jordan Peccia. 2011. "Toward a Consensus View on the Infectious Risks Associated with Land Application of Sewage Sludge." *Environmental Science & Technology* 45 (13):5459-5469. doi: 10.1021/es200566f.
- Xiao, Fei, Meiwen Tang, Xiaobin Zheng, Ye Liu, Xiaofeng Li, and Hong Shan. 2020. "Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2." *Gastroenterology* 158 (6):1831-1833.e3. doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.02.055>.
- Ye, Yinyin, Robert M. Ellenberg, Katherine E. Graham, and Krista R. Wigginton. 2016. "Survivability, Partitioning, and Recovery of Enveloped Viruses in Untreated Municipal Wastewater." *Environmental Science & Technology* 50 (10):5077-5085. doi: 10.1021/acs.est.6b00876.
- Yuan, Xi, Chengming Yang, Qian He, Junhu Chen, Dongmei Yu, Jie Li, Shiyao Zhai, Zhifeng Qin, Ke Du, Zhenhai Chu, and Peiwu Qin. 2020. "Current and Perspective Diagnostic Techniques for COVID-19." *ACS Infectious Diseases* 6 (8):1998-2016. doi: 10.1021/acsinfecdis.0c00365.

Centers for Disease Control and Prevention. (2020). 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-time rRT-PCR Panel. En ligne <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panel-primer-probes.pdf>>, consulté le 11 janvier 2021.

Réseau Obépine. (2020). Présentation du réseau OBEPINE. En ligne <<https://www.reseau-obepine.fr/presentation-du-reseau-obepine/>> consulté le 11 janvier 2021.

10.2 Normes

NF EN 12 880 (novembre 2000) Caractérisation des boues – Détermination de la matière sèche et de la teneur en eau. AFNOR (indice de classement X 33-005).

NF EN ISO 11 063 (octobre 2020) Qualité du sol - Extraction directe de l'ADN du sol (Tirage 2). AFNOR (indice de classement X 31-263).

NF EN ISO 17 025 (Décembre 2017) Exigences générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnages et d'essais (Tirage 2). AFNOR (indice de classement X50-061).

NF EN ISO 5667-13 (2011) Qualité de l'eau - Échantillonnage - Partie 13 : lignes directrices pour l'échantillonnage de boues. AFNOR (indice de classement T 90-511-13).

NF T90-451 (décembre 2020) Essais des eaux - Recherche des entérovirus - Méthode par concentration sur laine de verre et détection par RT-qPCR, et/ou par culture cellulaire. AFNOR (indice de classement T 90-451).

NF X 50-110 (mai 2003) Qualité en expertise – Prescriptions générales de compétence pour une expertise. AFNOR (indice de classement X 50-110).

10.3 Législation et réglementation

MINISTERE DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE ET DE L'ENVIRONNEMENT ; MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE. Décret no 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal officiel n°286, du 10 décembre 1997. En ligne < <https://www.legifrance.gouv.fr/jorf/id/JORFTEXT000000739355?r=fQQKyQJAhZ> >

MINISTERE DE L'INTERIEUR, MINISTERE DE L'AGRICULTURE ET DE LA PECHE, MINISTERE DE L'AMENAGEMENT DU TERRITOIRE ET DE L'ENVIRONNEMENT, MINISTERE DE LA FONCTION PUBLIQUE, DE LA REFORME DE L'ETAT ET DE LA DECENTRALISATION ET SECRETARIAT D'ETAT A LA SANTE. Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Journal officiel n°26 du 31 janvier 1998. En ligne < <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000000570287/2020-12-09/> >

MINISTERE DE LA SOLIDARITE ET DE LA SANTE. Arrêté du 12 mai 2020 portant modification de la liste des actes et prestations mentionnée à l'article L. 162-1-7 du code de la sécurité sociale (inscription de la détection du génome du SARS-CoV-2 par RT PCR). Journal officiel n°117 du 13 mai 2020. En ligne < <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000041869967/2020-12-14/> >

ANNEXES

Annexe 1 : Données communiquées par les laboratoires en mesure de réaliser l'ensemble du processus analytique pour la détection / quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues

Tableau 10 : Recensement des modalités retenues par les laboratoires disposant de compétences sur l'ensemble du processus analytique des boues pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues – Etapes de préparation de l'échantillon et d'extraction/purification du génome viral.

| 6 laboratoires indiquent réaliser une préparation des échantillons en vue de réaliser une extraction/purification du génome de SARS-CoV-2, puis sa détection/quantification par RT-PCR. | | Prise d'essai | | | Désorption du virus de la boue | | Etape de concentration | Volume final de concentrat (ml) | Disponibilité de données de validation pour cette étape | Commentaires LHN |
|---|---|---|-----------------------------|---|--|--|--|--|--|--|
| | | Boue liquide | Boue solide | Ajout d'un éluant | Broyage | | | | | |
| Laboratoire 1 | (1) - PREPARATION DE L'ECHANTILLON PAR DESORPTION ET/OU CONCENTRATION | 1 | 500 ml | Equivalent de 10 g de MS | Oui : Tampon Borate | Non | Précipitation du surnageant au PEG 6000 et centrifugation | 5 | Non | Sur les 7 laboratoires qui disposent d'une méthode applicable aux boues, 2 ne la réalisent que sur des boues liquides (laboratoires 2 et 6). |
| Laboratoire 2 | | 2 | 25 ml | Non réalisé | Oui : Tampon Glycine/Extrait de bœuf | Non | Non renseignée | 45 | Oui | La majorité des laboratoires a recours à une méthode d'éluant (4/7), cependant les modalités sont différentes d'un laboratoire à l'autre notamment en ce qui concerne la nature de l'éluant utilisé et la réalisation ou non d'un broyage mécanique en complément. |
| Laboratoire 3 | | 3 | 1g | 1g | Oui : éluant non précisé | Oui | Pas de concentration | 1 | Non | |
| Laboratoire 4 | | 4 | 1g | 1g | Oui : Tampon PBS (10 ml) | Oui | Non | 0,1 | Oui | Des méthodes de concentrations sont décrites pour 3 des 7 laboratoires. Elles montrent également une diversité importante : filtration, ultracentrifugation, précipitation au PEG 6000. |
| Laboratoire 5 | | 5 | 50 ml | 200 mg | Non | Oui sur boues solides | Boues solides : Pas de concentration Boues liquides : Filtration sur membrane en ester de cellulose après acidification | Non renseigné | Oui | Les laboratoires qui pratiquent une étape de désorption et/ou d'éluant disposent majoritairement de données de validation sur ces étapes (3 sur 5). |
| Laboratoire 6 | | 6 | 25 ou 100 ml | Non réalisé | Non | Non | Ultracentrifugation sur 25 ml ou précipitation au PEG NaCl sur 100 ml | 1 | Non renseigné | |
| Laboratoire 7 | | 7 | 200 µl d'eau interstitielle | De 0,1 à 1 g | Non | Non | Non | Sans objet | Sans objet | |
| Modalités d'extraction et de purification du génome viral à partir de l'éluat ou du concentrat. | | Prise d'essai de l'éluat ou du concentrat pour débiter l'extraction | | Extraction | Support de purification des acides nucléiques | Mise en œuvre d'un témoin positif d'extraction | Volume final d'extrait (µl) | Disponibilité de données de validation pour cette étape | Commentaires LHN | |
| Laboratoire 1 | (2) - EXTRACTION ET PURIFICATION DE GENOME VIRAL | 1 | Non renseigné | Kit commercial : Lyse chimique et thermique | Billes magnétiques de silice | Oui | Non disponible | Oui : Contrôle interne | Les modes opératoires d'extraction génomique sont variés et reposent majoritairement sur des kits commerciaux. La lyse chimique est systématiquement présente, elle est parfois complétée par une lyse thermique ou mécanique. | |
| Laboratoire 2 | | 2 | Non renseigné | Non renseigné | Billes magnétiques de silice | Non renseigné | | Oui : Contrôle interne, Reproductibilité | L'étape de purification est majoritairement réalisée à l'aide de billes magnétiques de silice. Elle est complétée par l'utilisation de colonnes permettant le retrait des inhibiteurs par la majorité des laboratoires. | |
| Laboratoire 3 | | 3 | 100 µl | Kit commercial : Lyse chimique | Colonne de silice | Oui | | Oui : Contrôle interne, Reproductibilité, Répétabilité | Majoritairement les laboratoires disposent d'un suivi des performances du système d'extraction génomique. | |
| Laboratoire 4 | | 4 | 100 µl | Kit commercial : Lyse mécanique et chimique | Billes magnétiques de silice et colonne de retrait des inhibiteurs | Oui | 80 | Oui : Contrôle interne, Reproductibilité, Répétabilité, Rendement d'extraction | L'étendue des données de validation est variable en fonction des laboratoires. Tous s'appuient <i>a minima</i> sur un contrôle interne de performance, fréquemment complété par des données de robustesse. Trois laboratoires possèdent des données de rendement d'extraction. | |
| Laboratoire 5 | | 5 | 200 µl | Kit commercial : Lyse chimique | Billes magnétiques de silice et colonne de retrait des inhibiteurs | Oui | Non disponible | Oui : Contrôle interne, Reproductibilité, Répétabilité, Rendement d'extraction | | |
| Laboratoire 6 | | 6 | 200 µl | Kit commercial : Lyse chimique | Billes magnétiques de silice et colonne de retrait des inhibiteurs | Oui | 50 | Oui : Contrôle interne, Rendement d'extraction | | |
| Laboratoire 7 | | 7 | Non renseigné | Kit commercial : Lyse mécanique et chimique | Colonne de silice et colonne de retrait des inhibiteurs | Oui | 50 | | | |

Tableau 11 : Recensement des modalités retenues par les laboratoires disposant de compétences sur l'ensemble du processus analytique des boues pour la détection/quantification du génome de SARS-CoV-2 dans les boues – Etapes d'amplification et d'expression des résultats.

| Modalités d'amplification du génome viral à partir de l'extrait d'ARN purifié. | | Prise d'essai de l'extrait pour l'amplification | Amplification (RT-PCR) et cibles | Type d'amplification | Mise en œuvre d'un suivi des inhibitions de la RT-PCR | Limite de détection du système de RT-PCR (UG/réaction) | Disponibilité de données de validation | Commentaires LHN |
|--|--|---|--|---|--|---|--|--|
| Laboratoire 1 | (3) - AMPLIFICATION DU GÉNOME VIRAL | 1 | Non disponible | Kit commercial : Roche - ORF1a et gène E | Boues liquides : Qualitative Boues solides : Quantitative | Oui (celui du kit d'amplification) | 5 | Oui : Contrôle interne (répétabilité) |
| Laboratoire 2 | | 2 | | Système interne : RdRp (IP4 et IP2) | Quantitative | Oui (développé en interne) | 6 | Oui : Contrôle interne (répétabilité) |
| Laboratoire 3 | | 3 | | Kit commercial modifié *: Biosellal (*Ajout de BSA pour réduire l'inhibition PCR) - ORF1a et gène E | Qualitative | Oui (celui du kit d'amplification) | 5 (gène ORF1a) 20 (gène E) | Oui : Contrôle interne (répétabilité) |
| Laboratoire 4 | | 4 | | Kit commercial : Gènes N1 et N2 | Qualitative | Oui (celui du kit d'amplification) | 12,5 | Oui : Répétabilité et reproductibilité. Détermination de rendement sur l'ensemble du processus avec Coronavirus bovin et SARS-CoV-2 |
| Laboratoire 5 | | 5 | | Kit commercial : Eurobio RdRp et gène E | Qualitative | Oui (celui du kit d'amplification) | Non renseigné | Oui : Répétabilité et reproductibilité, contrôle interne, Rendement. |
| Laboratoire 6 | | 6 | | Kit Commercial : Biomérieux RdRp, Gène N et gène E | Qualitative | Oui (celui du kit d'amplification) | Non renseigné | Sensibilité, Spécificité, |
| Laboratoire 7 | | 7 | 10 µl | 2 systèmes internes en parallèle : (I) Gène E, (II) RdRp (IP4 et IP2) | Quantitative | Oui (développé en interne) | 3 | Oui : Contrôle interne (répétabilité) |
| Modalités d'expression des résultats | | | Expression des résultats pour les BOUES LIQUIDES | Expression des résultats pour les BOUES SOLIDES | Limite de quantification globale déclarée par le laboratoire | Limite de détection globale déclarée par le laboratoire | Unité retenue pour exprimer les résultats par rapport à la masse de boue | Commentaires LHN |
| Laboratoire 1 | (4) - EXPRESSION DES RESULTATS | 1 | Qualitatif : Détecté / Non Détecté | Quantitatif : Détecté (x UG/g) / Non détecté | 1000 à 2000 UG/g | 100 à 200 UG/g | Matière brute | La majorité des résultats sont des résultats qualitatifs. Les limites de détection les plus faibles, de l'ordre de 100 à 250 UG/g correspondent aux laboratoires qui réalisent une étape d'éluion. |
| Laboratoire 2 | | 2 | Quantitatif : Présence (x UG/g) / Non détecté | / | 2000 UG/l (Pas d'information en g) | 250 UG/l (Pas d'information en g) | Matière Sèche | |
| Laboratoire 3 | | 3 | Qualitatif : Présence / Absence | Qualitatif : Présence / Absence | / | 4000 UG/g | Matière Sèche | Deux laboratoires sont en mesure de produire des résultats quantitatifs. Les limites des quantifications, limitées à deux laboratoires sont issues de modes opératoires qui intègre une étape de désorption par éluion. Elles sont comprises entre 1000 et 2000 UG. La moitié des laboratoires exprime des résultats rapportés à la quantité de matière sèche, tandis que l'autre moitié exprime les résultats en fonction de la matière brute. |
| Laboratoire 4 | | 4 | Qualitatif : Présence / Absence | Qualitatif : Présence / Absence | / | 2000 UG/g | Matière brute | |
| Laboratoire 5 | | 5 | Qualitatif : Détecté / Non Détecté | Qualitatif : Détecté / Non Détecté | / | Non renseignée | Matière brute | |
| Laboratoire 6 | | 6 | Qualitatif : Détecté / Non Détecté | / | / | Non renseignée | Matière Sèche | |
| Laboratoire 7 | | 7 | Quantitatif : Présence (x UG/g) / Non détecté | Quantitatif : Détecté (x UG/g) / Non détecté | / | 100 à 1000 UG/g | Matière brute pour les boues liquides Matière Sèche pour la boue solide | |

Annexe 2 : Eléments de calculs concernant la détermination de la limite de détection de génome de SARS-CoV-2 dans les boues.

Tableau 12 : Exemples de calculs d'une limite de détection en l'absence d'étapes préalables de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements théoriques à 100 % (configuration 1).

| LIMITE DE DETECTION EN L'ABSENCE D'ETAPE PREALABLE DE DESORPTION ET DE CONCENTRATION DES PARTICULES VIRALES (RENDEMENT THEORIQUE) | | |
|---|---|---|
| Faibles prises d'essais comprises entre 100 et 700 mg de matières brutes - Proportion d'extrait importante dans le volume réactionnel | | |
| Limite de détection déterminée par réaction de RT-PCR | 3 | UG |
| Vol. extrait utilisé par réaction | 10 | µL |
| Vol. final extrait total obtenu pour la prise d'essai (après passage sur colonne Zymo) | 50 | µL |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée au volume d'extrait total | 15 | UG |
| Rendement de l'étape d'éluat (Taux de récupération des virus adsorbés à la boue) | 100% | Etapes non prises en compte dans cette version de protocole |
| Rendement de l'étape de concentration de l'éluat (réduction du volume d'éluat avant l'extraction génomique) | 100% | |
| Rendement d'extraction génomique (prise d'essai partielle pour le Kit d'extraction, ...) | 100% | Prise en compte de rendements théoriques à 100% |
| Rendement de purification génomique (kit d'extraction et passage sur colonne de levé d'inhibition) | 100% | |
| Quantité minimale détectable ramenée au volume d'extrait total corrigé par le rendement global | 15 | UG |
| Exemple de calcul de détermination de la limite de détection pour une configuration donnée : | | |
| Prise d'essai de Matière Brute | 700 | mg |
| Matière sèche | 20% | siccité |
| Prise d'essai calculée exprimée en MS | 140,0 | mg |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS | 15 | UG |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS en tenant compte du rendement | 15 | UG |
| Limite de détection globale du mode opératoire | 110 | UG/g de MS |
| | | Soit |
| | <i>pour 700 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>110 UG/g de MS</i> |
| | <i>pour 200 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>380 UG/g de MS</i> |
| | <i>pour 100 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>750 UG/g de MS</i> |

Tableau 13 : Exemples de calculs d'une limite de détection en l'absence d'étapes préalables de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements évalués à partir d'une hypothèse non confirmée (configuration 2).

| LIMITE DE DETECTION EN L'ABSENCE D'ETAPE PREALABLE DE DESORPTION ET DE CONCENTRATION DES PARTICULES VIRALES (RENDEMENT EVALUE - hypothèse de travail non vérifiée) | | |
|---|--|---|
| Faibles prises d'essais comprises entre 100 et 700 mg de matières brutes - Proportion d'extrait importante dans le volume réactionnel | | |
| Limite de détection déterminée par réaction de RT-PCR | 3 | UG |
| Vol. extrait utilisé par réaction | 10 | µL |
| Vol. final extrait total obtenu pour la prise d'essai (après passage sur colonne Zymo) | 50 | µL |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée au volume d'extrait total | 15 | UG |
| Rendement de l'étape d'éluat (Taux de récupération des virus adsorbés à la boue) | 100% | Etapes non prises en compte dans cette version de protocole |
| Rendement de l'étape de concentration de l'éluat (réduction du volume d'éluat avant l'extraction génomique) | 100% | |
| Rendement d'extraction génomique (prise d'essai partielle pour le Kit d'extraction, ...) | 30% | Prise en compte de rendements estimés (hypothèses) |
| Rendement de purification génomique (kit d'extraction et passage sur colonne de levé d'inhibition) | 80% | |
| Quantité minimale détectable ramenée au volume d'extrait total corrigé par le rendement global | 63 | UG |
| Exemple de calcul de détermination de la limite de détection pour une configuration donnée : | | |
| Prise d'essai de Matière Brute | 700 | mg |
| Matière sèche | 20% | siccité |
| Prise d'essai calculée exprimée en MS | 140 | mg |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS | 15 | UG |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS en tenant compte du rendement | 63 | UG |
| Limite de détection globale du mode opératoire | 450 | UG / g de MS |
| | | soit |
| | <i>pour 700 mg de MB à 20% de MS une hypothèse de limite de détection de</i> | <i>450 UG/g de MS</i> |
| | <i>pour 200 mg de MB à 20% de MS une hypothèse de limite de détection de</i> | <i>1600 UG/g de MS</i> |
| | <i>pour 100 mg de MB à 20% de MS une hypothèse de limite de détection de</i> | <i>3100 UG/g de MS</i> |

Tableau 14 : Exemples de calculs d'une limite de détection en intégrant une étape préalable de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements théoriques à 100 % (configuration 1).

| LIMITE DE DETECTION EN CONSIDERANT UNE ETAPE PREALABLE DE DESORPTION ET DE CONCENTRATION DES PARTICULES VIRALES (RENDEMENT THEORIQUE) | |
|---|-----------------------|
| Prises d'essais importantes de l'ordre de 1 à 50 g de matières brutes- Proportion d'extrait réduite dans le volume réactionnel | |
| Limite de détection déterminée par réaction de RT-PCR | 5 UG |
| Vol. extrait utilisé par réaction | 2,5 µL |
| Vol. final extrait total obtenu pour la prise d'essai (après passage sur colonne Zymo) | 50 µL |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée au volume d'extrait total | 100 UG |
| Rendement de l'étape d'élution (Taux de récupération des virus adsorbés à la boue) | 100% |
| Rendement de l'étape de concentration de l'éluat (réduction du volume d'éluat avant l'extraction génomique) | 100% |
| Rendement d'extraction génomique (prise d'essai partielle pour le Kit d'extraction, ...) | 100% |
| Rendement de purification génomique (kit d'extraction et passage sur colonne de levé d'inhibition) | 100% |
| Quantité minimale détectable ramenée au volume d'extrait total corrigé par le rendement global | 100 UG |
| Exemple de calcul de détermination de la limite de détection pour une configuration donnée : | |
| Prise d'essai de Matière Brute | 50000 mg |
| Matière sèche | 20% siccité |
| Prise d'essai calculée exprimée en MS | 10000,0 mg |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS | 100 UG |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS en tenant compte du rendement | 100 UG |
| Limite de détection globale du mode opératoire | 10 UG/g de MS |
| | Soit |
| <i>pour 50000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>10 UG/g de MS</i> |
| <i>pour 10000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>50 UG/g de MS</i> |
| <i>pour 1000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>500 UG/g de MS</i> |

Tableau 15 : Exemples de calculs d'une limite de détection en intégrant une étape préalable de désorption et de concentration des particules virales : prise en compte de rendements évalués à partir d'une hypothèse non confirmée (configuration 2).

| LIMITE DE DETECTION EN CONSIDERANT UNE ETAPE PREALABLE DE DESORPTION ET DE CONCENTRATION DES PARTICULES VIRALES (RENDEMENT EVALUE - hypothèse de travail non vérifiée) | |
|--|-------------------------|
| Prises d'essais importantes de l'ordre de 1 à 50 g de matières brutes- Proportion d'extrait réduite dans le volume réactionnel | |
| Limite de détection déterminée par réaction de RT-PCR | 3 UG |
| Vol. extrait utilisé par réaction | 2,5 µL |
| Vol. final extrait total obtenu pour la prise d'essai (après passage sur colonne Zymo) | 50 µL |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée au volume d'extrait total | 60 UG |
| Rendement de l'étape d'élution (Taux de récupération des virus adsorbés à la boue) | 10% |
| Rendement de l'étape de concentration de l'éluat (réduction du volume d'éluat avant l'extraction génomique) | 60% |
| Rendement d'extraction génomique (prise d'essai partielle pour le Kit d'extraction, ...) | 30% |
| Rendement de purification génomique (kit d'extraction et passage sur colonne de levé d'inhibition) | 80% |
| Quantité minimale détectable ramenée au volume d'extrait total corrigé par le rendement global | 4167 UG |
| Exemple de calcul de détermination de la limite de détection pour une configuration donnée : | |
| Prise d'essai de Matière Brute | 50000 mg |
| Matière sèche | 20% siccité |
| Prise d'essai calculée exprimée en MS | 10000 mg |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS | 60 UG |
| Quantité minimale détectable théorique ramenée à la prise d'essai en MS en tenant compte du rendement | 4167 UG |
| Limite de détection globale du mode opératoire | 420 UG / g de MS |
| | Soit |
| <i>pour 50000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>420 UG/g de MS</i> |
| <i>pour 10000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>2100 UG/g de MS</i> |
| <i>pour 1000 mg de MB à 20% de MS une limite de détection théorique de</i> | <i>21000 UG/g de MS</i> |

Annexe 3 : Lettre de la demande



**MINISTÈRE
DE LA TRANSITION
ÉCOLOGIQUE**

*Liberté
Égalité
Fraternité*

**Direction générale de l'aménagement,
du logement et de la nature**

Direction de l'eau et de la biodiversité

Paris, le **13 OCT. 2020**

*Sous-direction de la protection et de la gestion de l'eau,
des ressources minérales et des écosystèmes aquatiques*

*Bureau de la lutte contre les pollutions domestiques et
industrielles*

**La directrice générale de l'aménagement du
logement et de la nature**

à

Monsieur le Directeur général
Agence nationale de sécurité sanitaire de
l'alimentation, de l'environnement et du travail

Nos réf. : 2020 457 EARM4 LM Lettre de saisine de l'ANSES projet
d'arrêté modifiant l'arrêté boues covid

Affaire suivie par : lucile.marsollier@developpement-durable.gouv.fr

Tél. : 01 40 81 35 08

**Objet : demande d'avis sur le projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités
d'épandage de boues issues du traitement des eaux usées urbaines pendant la crise de covid-19**

PJ :

- projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 précisant les modalités d'épandage de boues pendant la crise sanitaire
- rapport d'étude relatif à l'abattement des bactériophages dans les boues de stations de traitement des eaux usées

Depuis le début de l'épidémie de covid-19, plusieurs études ont mis en évidence la présence d'ARN viral du SARS-COV 2 dans les eaux usées. Cela a conduit l'Etat à interroger l'ANSES sur les risques de propagation du virus via l'épandage des boues d'épuration urbaines sur les sols agricoles et les éventuelles mesures à prendre pour limiter ce risque. L'ANSES a rendu son avis le 27 mars 2020. Sur cette base, l'Etat a conditionné, via l'arrêté du 30 avril 2020, l'épandage de boues sur les sols agricoles, en forêt ou à des fins de végétalisation ou de reconstitution de sols à leur hygiénisation préalable. Cette disposition concerne toutes les boues extraites après la date d'entrée en zone d'exposition à risque pour le COVID-19.

Ces nouvelles exigences posent des difficultés aux collectivités du fait des dépenses imprévues et parfois élevées qu'elles occasionnent, en fonctionnement et/ou en investissement. Face à cette situation et considérant que cette crise sanitaire pourrait perdurer, il nous faut envisager des pratiques plus adaptées au contexte local.

Aussi, dans le cadre d'une saisine complémentaire de notre part, mes services vous ont adressé le 15 mai 2020 deux projets de protocoles dans le but d'étudier le taux d'abattement de bactériophages dans les boues dans l'attente d'une méthode normalisée du suivi du SARS-CoV-2. Dans ses conclusions, publiées le 19 juin 2020, l'agence confirmait l'intérêt des protocoles pour valider les indicateurs d'efficacité de traitements d'inactivation virale. Sur la base des commentaires et recommandations émis dans cette note d'appui technique, nous vous adressons en pièce jointe, le rapport d'étude présentant les résultats de la mise en œuvre de ces deux protocoles.

De plus, dans cette même note du 19 juin 2020, l'agence préconisait « en première intention de procéder pour les boues non hygiénisées, à la recherche de génome viral du SARS-CoV-2 directement dans ces boues » en

précisant que « l'absence de génome viral de SARS-CoV-2 dans les boues analysées, dans les conditions de contrôle qualité adaptée, est synonyme d'absence de SARS-CoV-2 infectieux ». Des échanges entre nos services ont permis de préciser quelques modalités opérationnelles à respecter et à suivre pour la réalisation des ces analyses PCR. Ces modalités mériteraient d'être confirmées et, le cas échéant complétées, par l'Agence afin que les résultats obtenus soient suffisamment robustes, pour autoriser, en tout sécurité, l'épandage des boues sans hygiénisation.

Par ailleurs, considérant que les dates d'entrée en zone d'exposition à risques pour le covid-19 ont été définies pour chaque département sur la base du taux d'incidence hebdomadaire du COVID-19 publié chaque semaine par Santé publique France, il est apparu envisageable et cohérent d'utiliser à nouveau cet indicateur pour évaluer la situation épidémique d'un département et déterminer si l'épandage des boues est possible ou non. Cependant des difficultés ont été mises en avant sur l'applicabilité de cet indicateur, défini pour chaque département, à l'échelle d'une station de traitement des eaux usées en raison des éventuelles zones de concentration du virus qui pourraient être masquées à l'échelle départementale mais qui auraient un effet sur la qualité des boues localement.

L'ensemble de ces éléments a conduit la direction générale de l'aménagement, du logement et de la nature, la direction générale de la prévention des risques et la direction générale de l'alimentation, à élaborer un projet d'arrêté modifiant l'arrêté du 30 avril 2020 afin de faire évoluer le cadre réglementaire relatif à l'épandage des boues pendant la crise sanitaire.

Aussi, nous sollicitons votre avis sur le projet d'arrêté ci-joint, et particulièrement sur les éléments suivants :

- la pertinence d'appliquer le taux d'incidence hebdomadaire du covid-19 d'un département pour déterminer la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées provenant d'une station de ce département et le cas échéant la pertinence du seuil de 10/100 000 habitants envisagé.
- les modalités d'échantillonnage et d'analyse du génome du SARS-COV-2 prévues au 3° de l'article 1 du projet d'arrêté. Ces dispositions ont été définies sur la base des échanges avec vos services et à partir des modalités d'échantillonnage et d'analyse décrites dans l'arrêté du 8 janvier 1998.
- la possibilité d'épandre des boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) dès lors qu'elles ont fait l'objet d'un des traitements suivants, dans les conditions qui ont permis de montrer un taux d'abattement suffisant des bactériophages, à savoir :
 - o les boues ayant fait l'objet d'un chaulage avec un taux d'incorporation minimum de chaux de 30% équivalent CaO/MS puis d'un stockage d'une durée minimale de 3 mois.
 - o les boues ayant fait l'objet d'un séchage solaire avec plancher chauffant permettant d'atteindre une siccité minimale de 80%.
- la possibilité d'épandre des lots de boues non hygiénisées (au sens de l'arrêté du 8 janvier 1998) à l'issue d'une analyse par lot confirmant un taux abattement en coliphages somatiques supérieur ou égal à 4 log, dès lors qu'ils ont fait l'objet d'un des traitements suivants :
 - o un séchage sur lit puis un stockage d'une durée minimale de 1.5 mois.
 - o une digestion anaérobie mésophile puis un stockage d'une durée minimale de 4 mois.

Par ailleurs, nous vous remercions de bien vouloir formuler des recommandations concernant l'utilisation de la RT-PCR:

- la ou les fréquences minimales d'analyse du génome du SARS-CoV-2 qu'il conviendrait de faire figurer dans le futur arrêté ;
- la méthode de préparation des échantillons, la prise d'essai, la méthode d'extraction du virus de la matrice boue ainsi que la méthode d'extraction des acides nucléiques qu'il conviendrait de préciser dans le protocole d'échantillonnage et d'analyse du génome sur SARS-CoV-2 ;
- la matrice pour laquelle l'accréditation sur la méthode RT-PCR est requise.

L'avis de votre agence sur ces questions est attendu au plus tard le 18 décembre 2020. Cet avis tiendra compte de l'évolution des connaissances disponibles sur l'infectiosité du SARS-CoV-2 dans les selles humaines, les eaux usées et les boues d'épuration urbaines.

Nos services se tiennent à votre disposition pour vous apporter toute information complémentaire.

La directrice générale de l'aménagement, du logement et de
la nature

Stéphanie DUPUY-LYON



Copie :

-le directeur général de la prévention des risques

-le directeur général de l'alimentation

Avis de l'Anses

Saisine n°2020-SA-0137

**Saisine(s) liée(s) n°2020-SA-0037, 2020-SA-0043, 2020-SA-0056,
2020-SA-0058, 2020-SA-0068 et 2020-SA-0069**

Notes
