

GRAND PROGRAMME QUALITE EPURATION DES EAUX

III - DETECTION DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES STATIONS D'EPURATION PAR PCR

S. LE GUYADER, E. DUBOIS, D. MENARD

SOMMAIRE

III - DETECTION DES VIRUS ENTERIQUES DANS LES STATIONS D'EPURATION PAR PCR.....	100
INTRODUCTION.....	101
DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ROTAVIRUS	
I - CARACTERISTIQUES GENERALES DES ROTAVIRUS.....	102
1. Historique et classification.....	102
2. Structure du virion	102
3. Structure du génome.....	102
4. Epidémiologie des rotavirus	103
5. Transmission des infections à rotavirus.....	104
II - SURVIE DES ROTAVIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT	105
1. Propriétés physico-chimiques des rotavirus.....	105
2. Contamination de l'air et des surfaces par les rotavirus	105
3. Contamination de l'eau et des coquillages par les rotavirus	106
III - RECHERCHE DES ROTAVIRUS PAR AMPLIFICATION GENIQUE.....	107
1. Amplification du génome des rotavirus du groupe A.....	107
2. Amplification du génome des rotavirus des groupes B et C.....	108
3. Sensibilité de la technique d'amplification génique.....	108
MATERIEL ET METHODE	109
I - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE RECHERCHE DES ROTAVIRUS	109
1. Souches virales	109
2. Extraction des acides nucléiques	109
3. RT-SN-PCR	109
3.1 choix des amorces	109
3.2 Retrotranscription.....	111
3.3 SN-PCR.....	111
II - PRESENTATION DU SITE DE L'ETUDE.....	111
III - TRAITEMENT DES ECHANTILLONS	112
1. Elution concentration des particules virales	112
2. Extraction des acides nucléiques	112
3. Purification.....	113

4. Amplification génique	113
4.1 <i>Amorces</i>	113
4.2 <i>RT</i>	114
4.3 <i>SN-PCR</i>	114
5. Révélation et identification des produits amplifiés	114
RESULTATS	115
I - DETECTION DES ROTAVIRUS	115
1. Vérification des fragments amplifiés	115
2. Comparaison des deux techniques de dénaturation	115
3. Etude de la sensibilité	115
II - DETECTION DES EV	115
III - RESULTATS OBTENUS SUR LES ECHANTILLONS	117
DISCUSSION	117
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	119

INTRODUCTION

Les virus susceptibles d'être retrouvés dans les stations d'épuration soit au niveau des eaux brutes ou épurées ou au niveau des boues sont essentiellement les virus entériques. En effet, de part leur cycle pathologique dans l'organisme ils se retrouvent en grande quantité dans les fèces mais également leur propriétés physico-chimiques leur permettent de résister aux principales techniques d'épuration. Il a été démontré que plus de 130 virus pathogènes appartenant à plusieurs familles et genres peuvent être éliminés dans les fèces humaines. Les plus fréquemment rencontrés font partie de la famille des Picornaviridae (genre Enterovirus, Hépatovirus), des Reoviridae (genre Reovirus, Rotavirus), des Caliciviridae ou Adenoviridae. Parmi ces virus le risque associé à la contamination est variable. Ainsi par exemple le genre entérovirus (EV) comprend les poliovirus dont les infections sont inapparentes dans 90 % des cas, cependant des épidémies de poliomyélite apparaissent épisodiquement. Le virus de l'hépatite A (VHA) (genre Hépatovirus) est un agent pathogène ubiquitaire. Si la transmission oro-fécale est réalisée dès l'enfance dans les régions à bas niveau socio-économique, dans les pays industrialisés, les progrès de l'hygiène publique ont entraîné un abaissement du niveau de l'immunité collective contre ce virus. Cette réceptivité croissante augmente le risque de développer une hépatite grave et le risque épidémique au plan collectif. Le vaccin, récemment mis sur le marché, en raison de son prix élevé ne pourra pas prévenir tous les risques dans un avenir immédiat. Les Rotavirus (RV) sont considérés comme les agents majeurs des gastro-entérites aiguës sporadiques chez les jeunes enfants. Les données épidémiologiques ne permettent pas à l'heure actuelle de définir le rôle exact de l'environnement dans la transmission de ce virus. L'absence de méthode de mise en évidence de ces virus (dont la plupart sont difficilement cultivables) peut expliquer le peu de données disponibles sur la contamination du milieu extérieur.

Ce rapport décrit dans un premier temps, après un bref rappel bibliographique la mise au point d'un protocole expérimental permettant la caractérisation des acides nucléiques des rotavirus puis dans un second temps l'application à la détection de ces virus ainsi que du VHA et des entérovirus dans des prélèvements de station d'épuration.

DONNÉES BIBLIOGRAPHIQUES SUR LES ROTAVIRUS

I - CARACTERISTIQUES GENERALES DES ROTAVIRUS

1. Historique et classification

C'est en recherchant l'agent responsable des gastro-entérites infantiles que Bishop et ses collaborateurs (1973) découvrirent des particules virales dont l'aspect en microscope électronique leur rappelle celui d'une roue. Ils donnèrent à ces nouveaux virus le nom de rotavirus du latin "rota" signifiant roue.

Leurs propriétés morphologiques et leurs caractéristiques biochimiques ont permis de les classer parmi la famille des Reoviridae, virus à ARN possédant une double capsidie à symétrie cubique, dépourvus de péplos. Le genre Rotavirus présente une grande diversité de souches qui ont pu être classées par réactions croisées à l'aide d'anticorps polyclonaux en groupes ou sérogroupes. Sept groupes différents de A à G ont été décrits à ce jour. Les virus du groupe A, B ou C infecteraient l'homme et les animaux, alors que les virus du groupe D, E, F ou G seraient retrouvés uniquement chez les animaux (ESTES, 1990 ; ESTES et COHEN, 1989). A l'intérieur du groupe A les virus peuvent être différenciés en fonction de leur réactivité vis-à-vis d'anticorps monoclonaux et des sérotypes sont établis à partir de différences antigéniques des deux protéines de la capsidie externe : la protéine VP4 définit les types P, la protéine VP7 définit les types G (ESTES et COHEN, 1989 ; HUANG *et al.*, 1992). Le nombre de ces sérotypes est en constante évolution. Une troisième protéine, la protéine VP6 qui constitue la couche interne de la capsidie permet de classer les rotavirus en sous groupe (I et II) en fonction de la présence ou non de deux épitopes (ESTES et COHEN, 1989 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990 ; KOHLI *et al.*, 1992).

2. Structure du virion

Le genre Rotavirus présente des morphologies communes. Le virion a une taille de 76,5 nm de diamètre (ESTES et COHEN, 1989). La particule est constituée d'une double capsidie icosaédrique et comprend 6 protéines structurales : les protéines VP4 et VP7 (portant les antigènes reconnus par les anticorps neutralisants) constituent la capsidie externe et la protéine VP6 est l'unique constituant de la couche interne de la capsidie. A l'intérieur de cette double capsidie, on trouve le corps composé des protéines VP1, VP2 et VP3 et renfermant le génome viral.

3. Structure du génome

Les rotavirus sont les seuls virus de mammifères et d'oiseaux à posséder un génome à ARN double brin (ARN db) fractionné en onze segments (ESTES et COHEN, 1989). Le génome des rotavirus code pour la synthèse d'au moins onze protéines. Six d'entre elles constituent les protéines structurales, les cinq autres sont nécessaires à la réplication du virus (protéines non structurales) (ESTES et COHEN, 1989 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). Ce génome n'est pas infectieux par lui-même car il nécessite la présence d'une ARN polymérase ARN dépendante (protéine virale) pour pouvoir transcrire chaque segment en ARN messagers (COHEN, 1977).

Le génome fragmenté des rotavirus représente au total 18 522 paires de bases, tous les segments sont riches en base A et T (A + T représentent de 58 à 67 %) (ESTES et COHEN, 1989). Chaque segment commence par une guanidine en 5' suivie d'une séquence conservée qui représente une partie de l'extrémité non codante, puis d'un cadre de lecture ouvert. La plupart des segments portent un seul cadre de lecture excepté les gènes 7, 9 et 11, mais pour ces gènes un seul cadre de lecture serait utilisé. Le segment se termine par une seconde partie non codante qui contient différentes séquences conservées. Le dernier nucléotide à l'extrémité 3' est toujours une cytidine. La taille des séquences non codante en 3' et 5' varie d'un segment à l'autre, mais la longueur est conservée pour chaque segment d'une souche à une autre à l'exception de l'extrémité 3' du segment 7 et 10. On ne retrouve pas de signal de polyadénylation à l'extrémité 3' des gènes. Par contre, les séquences conservées contiennent des signaux qui seraient nécessaires à la transcription, réplication et probablement à l'encapsidation du génome (ESTES et COHEN, 1989).

Les possibilités de modification de la constitution du génome sont principalement de deux natures : des réassortiments et des réarrangements.

Les réassortiments dérivent d'une coinfection de cellules par deux virus ou plus de types différents. Au cours de la réplication des virus, les segments de génome peuvent être encapsidés de façon plus ou moins aléatoire et conduire à l'introduction d'un fragment d'origine différente dans le virion (BALLARD *et al.*, 1992 ; KOOL *et al.*, 1992 ; MIDTHUN *et al.*, 1986, 1987).

Les réarrangements chez les rotavirus ont été décrits chez de nombreux animaux et également chez l'homme. A quelques exceptions près les cadres de lecture sont conservés et ce serait les séquences non codante en 3' des gènes qui représenteraient des duplications de quelques nucléotides. Les mécanismes moléculaires de ces réarrangements impliqueraient l'ARN polymérase ARN dépendante (ESTES et COHEN, 1989). Lors de la réplication, cette enzyme ferait des retours en arrière dupliquant ainsi certaines séquences, préférentiellement situées après le codon stop. Cette localisation peut s'expliquer par l'action d'une pression de sélection qui s'exercerait sur d'autres régions du segment, ou par la présence de site de fixation de l'ARN polymérase dans l'extrémité 5' favorisant un retour en arrière de l'enzyme lors de la transcription. La conséquence de cette modification génétique est une augmentation de la taille d'un fragment réarrangé (caractérisable par électrophorèse) (STREET *et al.*, 1982). Comme pour les réassortiments, les réarrangements modifieraient l'immunogénicité ou la pathogénicité des rotavirus, mais par un mécanisme qui reste inconnu (ESTES et COHEN, 1989).

4. Epidémiologie des rotavirus

Depuis leur découverte, les rotavirus ont été associés à la plupart des gastro-entérites infantiles. Ainsi, plus de 90 % des enfants entre 0 et 3 ans font une infection à rotavirus (KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). A travers le monde c'est 9 millions de cas de diarrhées sévères, entraînant la mort de 873 000 enfants par an (INSTITUTE OF MEDECINE, 1986). Les décès observés sont en rapport avec l'importance de la déshydratation initiale et le retard à y porter remède, ceci principalement dans les pays démunis. Ces rotavirus contaminent principalement les enfants âgés de 6 mois à 2 ans (protection par les anticorps maternels durant les 6 premiers mois) (KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). Au-delà de 2 ans, les cas d'infection à rotavirus sont de moins en moins fréquents. C'est l'immunité acquise dès le plus jeune âge qui persiste et protège l'individu d'une nouvelle maladie (DE CHAMPS *et al.*, 1991).

Les infections à rotavirus sont retrouvées dans toutes les régions du globe (KAPIKIAN et CHANOCK, 1990), la gravité de la maladie dépendant de la souche infectante. Une étude sur plusieurs milliers d'enfants infectés par des rotavirus au Bengladesh montre, après typage des différentes souches, que certains types étaient responsables de déshydratations plus importantes que d'autres (BERN *et al.*, 1992). Toutefois la dominance d'une souche dans les infections varie dans l'espace (d'une région à une autre) mais aussi dans le temps (d'une année à une autre) (NOEL *et al.*, 1991 ; ZHENG *et al.*, 1989). Par ailleurs les complications sont surtout dépendantes des soins prodigués aux enfants.

Les rotavirus peuvent également provoquer des troubles chez les adultes, lorsqu'un sujet est atteint par une nouvelle souche (absence d'anticorps protecteurs) (DE CHAMPS *et al.*, 1991 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). Par exemple en Chine, des souches du groupe B particulièrement virulentes, provoquent des diarrhées importantes chez les adultes (FANG *et al.*, 1989). En général, ce serait seulement 40 % des adultes en contact avec un rotavirus qui ferait une infection symptomatique contre 70 % chez les enfants (KAPIKIAN et CHANOCK, 1990).

Si les rotavirus sont présents dans le monde entier, le caractère épidémique des gastro-entérites à rotavirus est étroitement lié aux conditions climatiques des régions étudiées. En Occident, les infections à rotavirus se développent principalement lors des mois secs et les plus froids, ce qui correspond au mois d'hivers. Pendant cette période, les infections à rotavirus sont responsables de plus de 50 % des hospitalisations pour une gastro-entérite infantile. Alors qu'en juillet ou août ce taux tombe entre 0 et 5 % (GUIGUET *et al.*, 1992 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990 ; NOEL *et al.*, 1991 ; VALETTE et NICOLAS, 1990). Dans les pays tropicaux la saisonnalité est moins marquée, mais là encore les épidémies seraient plus nombreuses lors des périodes sèches (KAPIKIAN et CHANOCK, 1990).

Des études ont tenté d'expliquer cette saisonnalité des infections à rotavirus. Il semblerait qu'une plus grande persistance dans l'environnement des rotavirus lors des mois les plus froids soit à l'origine de ces forts taux d'infection en Occident. Par contre pour les pays tropicaux, l'interprétation ne serait pas en terme de résistance, mais plutôt dans le mode de transmission de ces infections qui se ferait via l'eau de boisson contaminée par de nombreux germes entériques (ANSARI *et al.*, 1991 ; PINFOLD *et al.*, 1991).

5. Transmission des infections à rotavirus

Le mode de transmission le plus important est la transmission féco-orale (ATMAR *et al.*, 1993 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). Le passage peut se faire d'un enfant à un autre, mais aussi d'un adulte à un enfant ou inversement (GAGGERO *et al.*, 1992 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). Cette dernière voie de transmission n'a pas été clairement établie car le plus souvent les infections chez les adultes sont asymptomatiques. Une étude faite en Chine sur des virus atteignant les adultes conclut pourtant à la possibilité de transmission via des sujets revenant de régions où sévit la maladie (FANG *et al.*, 1989).

Peu de travaux ont porté sur la transmission de rotavirus de l'animal à l'homme. Il serait possible que les barrières de spécificité d'espèce initialement admises pour les rotavirus puissent être franchies. Pour appuyer cette théorie, des recherches d'homologie ont été faites entre une souche ayant infecté un enfant fréquemment au contact de chats et des virus d'origine humaine ou animale. Les auteurs montrent par hybridation ARN/ARN une étroite similitude entre le génome du virus de l'enfant et celui d'une souche d'origine féline. Cette ressemblance est bien plus importante que celle qui existerait avec d'autres souches d'origine humaine

(NAKAGOMI *et al.*, 1990). Divers travaux faits sur les souches de différentes espèces par hybridation ou par comparaison de séquences semblent indiquer que des transmissions interspécifiques puissent exister ou auraient existé chez les rotavirus au cours de leur évolution (BRÜSSOW *et al.*, 1992 ; GERNA *et al.*, 1992 ; MINAMOTO *et al.*, 1991 ; NAKAGOMI *et al.*, 1991 ; NAKAGOMI et NAKAGOMI, 1991).

La dose minimale infectieuse est très faible et dans l'absolu on estime qu'une particule virale peut être suffisante pour déclencher une maladie (ANSARI *et al.*, 1991). Il est donc très probable que les particules virales qui persisteraient dans le milieu extérieur puissent contaminer l'homme. L'environnement pourrait aussi jouer un rôle dans la transmission des rotavirus. Ce constat a d'abord été fait en milieu hospitalier avec le développement de maladies nosocomiales (GAGGERO *et al.*, 1992) et semble confirmé par des études sur les propriétés physico-chimiques des rotavirus et sur leur aptitude à survivre dans le milieu extérieur.

II - SURVIE DES ROTAVIRUS DANS L'ENVIRONNEMENT

1. Propriétés physico-chimiques des rotavirus

Tous les désinfectants ne sont pas efficaces sur les rotavirus (PIRTLE *et al.*, 1991). Des traitements à base de chlore peuvent inactiver les particules virales si les concentrations sont suffisantes et si le temps de contact ainsi que les conditions de pH sont bien respectées. Le temps d'inactivation du virus SA11 purifié est de 1,4 min à pH 10 contre 0,25 min à pH 6 (BERMAN et HOFF, 1984). Ces résultats permettent d'expliquer l'inefficacité des chlorations sur les effluents de station d'épuration, car bien souvent le temps de contact est trop bref et les modifications des composés chlorés sont très importantes. Par ailleurs, les rotavirus présentent une résistance à un grand nombre de procédés chimiques et physiques comme les traitements à l'éther ou chloroforme, à la congélation et décongélation, et à la sonication (ESTES, 1990 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990).

En revanche, les virus sont efficacement inactivés en présence d'éthanol à 95 %, de phénol et de formaldéhyde. Ces composés peuvent être utilisés comme désinfectants de contact. Le virion est également sensible aux sels tels que $MgCl_2$, $CaCl_2$ et $NaCl$, à une concentration de 2 mM (ESTES, 1990 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990).

2. Contamination de l'air et des surfaces par les rotavirus

Les rotavirus sont des virus nus, comme la plupart des virus retrouvés dans l'environnement (BOHER, 1991).

L'air a souvent été suspecté comme vecteur de rotavirus. La principale relation établie entre l'atmosphère et les épidémies repose sur la saisonnalité des diarrhées à rotavirus. L'hygrométrie de l'atmosphère conditionnant l'aptitude d'une particule virale à persister dans l'environnement. Les surfaces ou les aliments peuvent être contaminés par manipulation lorsque les conditions d'hygiène ne sont pas satisfaisantes. Ainsi il a été montré que les rotavirus pouvaient persister durant un mois dans des selles à température ambiante et plus de deux jours sur des surfaces inertes (ANSARI *et al.*, 1991). C'est certainement par ce mode de transmission que se développent les gastro-entérites dans les pays en voie de développement, ou qu'une épidémie nosocomiale peut se déclarer (GAGGERO *et al.*, 1992).

3. Contamination de l'eau et des coquillages par les rotavirus

Le nombre de rotavirus présents dans les selles de malades est très important, entre 10^8 et 10^{12} particules par millilitre de selles (ANSARI *et al.*, 1991 ; XU *et al.*, 1990). Ces virus se retrouvent massivement dans les eaux usées lors d'une épidémie. Ils peuvent persister jusque dans les effluents d'eau d'épuration même après traitement (floculation ou chloration) (DEETZ *et al.*, 1984). Ces rejets sont alors la principale origine de contamination des eaux douces ou marines (BOHER, 1991). Ces eaux peuvent à leur tour transmettre les virus jusqu'à l'homme à travers l'alimentation ou par ingestion de virus présents sur des ustensiles souillés (ANSARI *et al.*, 1991).

Les principales études ont été menées sur des contaminations expérimentales d'eau douce ou marine. Ainsi la survie du rotavirus SA11 dans l'eau distillée est estimée à 30 jours à 26 °C et de 400 jours à 8 °C. Ce virus persiste également durant plusieurs semaines en eau de rivière ou d'estuaire. La salinité ne semble pas jouer de rôle dans la stabilité du virus. Le rotavirus résisterait mieux que le poliovirus en eau polluée (riche en coliformes fécaux) (HURST et GERBA, 1980).

Les raisons de cette stabilité sont parfois attribuées à la possibilité qu'ont les virus de s'absorber aux particules en suspension ou entre virus (PANCORBO *et al.*, 1987). Lors de rejet naturel une protection accrue pourrait être due à une gangue de débris cellulaires et d'anticorps qui se serait formée autour du virus (ANSARI *et al.*, 1991). Cet enrobage pourrait prolonger la survie des virus qui sont naturellement libérés, par rapport aux modèles expérimentaux. Ainsi des rotavirus ont été retrouvés dans l'eau des effluents, dans l'eau de mer, ou dans l'eau de distribution (ANSARI *et al.*, 1991 ; DEETZ *et al.*, 1984 ; DE LEON et GERBA, 1991 ; RAO *et al.*, 1984 ; SMITH *et al.*, 1982). L'infectiosité de ces virus a été montrée par culture cellulaire. Mais dans le milieu extérieur ce pouvoir infectieux diminue plus rapidement que le nombre de particules (PANCORBO *et al.*, 1987). Ce pouvoir infectieux des rotavirus dépend essentiellement de l'intégrité de la couche externe de leur capsid (ESTES et COHEN, 1989). La protéine VP4 joue un rôle important dans le maintien du pouvoir pathogène. Lorsque cette protéine est coupée par la trypsine, formant ainsi deux peptides appelés VP5 et VP8, le pouvoir infectieux du virus est augmenté (ESTES, 1990 ; ESTES et COHEN, 1989 ; KAPIKIAN et CHANOCK, 1990). D'autre part, des rotavirus traités avec des chélateurs d'ions calcium tels l'EDTA ou l'EGTA, qui déstabilisent la couche externe de la capsid, ne sont plus infectieux (ESTES, 1990). Ce mécanisme d'inactivation se produirait également dans l'eau de distribution contenant du chlore (PANCORBO *et al.*, 1987).

Le rôle important que joue l'eau dans le mode de transmission des diarrhées à rotavirus est la conséquence de cette survie des rotavirus dans le milieu aquatique. Bon nombre d'épidémies ont été associées à l'eau de boisson contaminée par des germes entériques et notamment des rotavirus (ANSARI *et al.*, 1991 ; DEETZ *et al.*, 1984 ; PINFOLD *et al.*, 1991). Cependant, il n'existe pas de relation entre la contamination en bactérie fécale d'une eau et sa teneur en rotavirus. Des eaux déclarées salubres d'un point de vue bactériologique peuvent véhiculer des rotavirus. De même la présence ou l'absence d'entérovirus comme le poliovirus ne présage pas d'une contamination ou non en rotavirus (ANSARI *et al.*, 1991 ; DEETZ *et al.*, 1984). Les raisons de cette non corrélation avec le niveau de contamination des différents germes entériques peuvent être rattachées à une meilleure résistance du rotavirus au traitement physico-chimique des effluents, une persistance supérieure dans le milieu, ou un apport initial beaucoup plus important notamment en période hivernale.

III - RECHERCHE DES ROTAVIRUS PAR AMPLIFICATION GENIQUE

Les techniques de biologie moléculaire ajoutent à leur spécificité et sensibilité, la rapidité et la facilité de mise en oeuvre par rapport aux techniques immunologiques, à l'électrophorèse du génome des virus, ou à la culture cellulaire. Cependant les premières études réalisées à l'aide de sondes génomique ont montré un manque de sensibilité pour l'application à des échantillons du milieu extérieur (GENTSCH *et al.*, 1992).

La technique d'amplification génique n'a été appliquée que récemment au diagnostic médical et pour le typage des souches (GOUVEA *et al.*, 1991). Les travaux réalisés par diverses équipes ont permis de développer un outil sensible, spécifique et reproductible. L'objectif de ces études est de réaliser le suivi épidémiologique des infections à rotavirus, nécessaire avant la mise au point d'un vaccin. Mais c'est aussi ces premières applications qui permettront de développer les futurs protocoles d'identification des rotavirus dans l'environnement.

1. Amplification du génome des rotavirus du groupe A

Différentes stratégies jouant principalement sur la nature des amorces ont été développées de façon à mettre en évidence une infection à rotavirus mais aussi de caractériser le serotype de la souche. Les gènes codant pour les protéines de la capsid externe des rotavirus, VP7 et VP4 sont les plus appropriés à l'amplification génique. Leur séquence est connue pour un grand nombre de souches de rotavirus (TANIGUCHI *et al.*, 1989). La comparaison de ces séquences permet de définir des régions conservées à l'intérieur d'un groupe ou d'un type et de synthétiser les amorces correspondantes.

Ainsi, pour le gène de la protéine VP7 un couple d'amorce reconnaît les deux extrémités du segment 9 (ou 8 selon les souches) (GOUVEA *et al.*, 1990 ; NAGAKOMI *et al.*, 1991 ; XU *et al.*, 1990). Ces extrémités font partie de la séquence non codante du gène et apparaissent conservées à l'intérieur du groupe A des rotavirus. Pour le gène de la protéine VP4 les amorces choisies hybrident dans la partie codante du gène mais également conservées au sein du groupe A de rotavirus (GENTSCH *et al.*, 1992). Ces deux couples d'amorces utilisés sur des souches de rotavirus de différents sérotypes permettent d'amplifier le gène de la protéine VP7 en entier ou un fragment de gènes de la protéine VP4.

Ces séquences amplifiées servent au typage des souches grâce à la présence de région hypervariables impliquées dans l'antigénicité des protéines. Ainsi, pour préciser le type des particules virales Gouvéa et ses collaborateurs (GOUVEA *et al.*, 1990) utilisent six amorces, chacune complémentaire d'une séquence variable, d'un sérotype à un autre mais conservée à l'intérieur d'un même sérotype. L'utilisation de ces amorces lors d'un second cycle d'amplification permet de définir, d'après la taille du fragment amplifié, le sérotype (G type) de la souche. Gentsch et ses collaborateurs (GENTSCH *et al.*, 1992) reproduisent cette expérience sur le fragment amplifié du gène de la protéine VP4 en utilisant quatre amorces spécifiques des quatre sérotypes (P types). Ces deux expériences donnent des résultats parfaitement concordants avec les résultats fournis par réaction immunologique (anticorps monoclonaux). Toutefois, ce typage qui joue sur une simple homologie de séquence ne tient pas compte du fait que l'antigénicité d'une protéine dépend aussi de la conformité de l'épitope qui peut être composé de régions éloignées sur une séquence mais proches au niveau structural de la protéine (GREEN *et al.*, 1988 ; HUANG *et al.*, 1992 ; MATTION *et al.*, 1992). Ces souches de même sérotype ne signifient donc pas qu'elles soient de même nature antigéniques et donc pas forcément deux souches identiques.

Un troisième segment de génome a été amplifié pour mettre en évidence des rotavirus du groupe A présents dans les selles de malades. Ce segment code pour la protéine VP6, la protéine la plus importante en quantité dans le virion et qui constitue la couche interne de la capsid. La séquence des amorces a été choisie pour permettre l'amplification spécifique d'un segment de 259 pb en amont du gène dans une région conservée au sein du groupe A (WILDE *et al.*, 1990).

2. Amplification du génome des rotavirus des groupes B et C

Le développement des connaissances sur les rotavirus non A a permis de mettre au point la technique d'amplification sur les virus du groupe B ou C. Ainsi deux couples d'amorces l'un spécifique du gène 3 (souche murine du groupe B), l'autre du gène 11 (souche humaine du groupe B) ont permis de mettre spécifiquement en évidence différentes souches virales du groupe B et d'établir des diagnostics (EIDEN *et al.*, 1991). Toutefois les souches humaines analysées sont reconnues spécifiquement par des amorces déduites du génome d'un rotavirus humain alors que la souche bovine testée ne réagit qu'en présence des amorces sélectionnées à partir du génome du rotavirus de rat. Les souches murines réagissent en présence des deux couples d'amorces. Ces amorces hybrident certainement avec des séquences situées dans des régions moyennement conservées à l'intérieur du groupe B et ne sont pas spécifiques de tous les virus de ce groupe. La spécificité des groupes se situe peut-être au niveau des séquences codant pour des régions conservées de la protéine. Ainsi la protéine NSP5 codée par le gène 11 semble posséder deux régions conservées, l'une entre les acides aminés 41 et 87 et l'autre entre les acides aminés 113 et 175 (ESTES, 1990). Quant à la protéine VP3 (codée par le gène 3), le peu d'information existant sur la présence de séquences conservées ne permet pas de déduire de nouvelles séquences spécifiques du groupe B. Le gène 8 peut être également utilisé pour permettre la recherche de virus de ce groupe et pour la caractérisation de certaines souches animales et humaines, grâce aux amorces choisis dans une région conservée à l'intérieur du groupe B (GOUVEA *et al.*, 1991). Les difficultés rencontrées pour trouver des amorces conservées sont certainement liées à l'importance de l'hétérogénéité génétique des souches du groupe B (PETRIC *et al.*, 1991).

L'amplification génique a été aussi appliquée à la recherche de virus du groupe C. L'amplification d'une séquence en amont du gène codant pour la protéine VP6 avait permis de rechercher les virus du groupe A. Il existe également une séquence conservée en aval qui a été amplifiée grâce aux amorces spécifiques de séquence du gène 6 de virus du groupe C (GOUVEA *et al.*, 1991).

3. Sensibilité de la technique d'amplification génique

La sensibilité de cette technique est très importante, elle permet d'identifier selon les couples d'amorces choisis et les conditions appliquées, de 10 à 4 000 virus présents dans le mélange réactionnel. Cette sensibilité dépend de la spécificité des amorces et de la présence ou non d'inhibiteurs de réaction enzymatique dans les échantillons (EIDEN *et al.*, 1991). Ces inhibiteurs peuvent être éliminés en purifiant les ARN sur cellulose et les conditions d'extraction peuvent améliorer le rendement (GENSTCH *et al.*, 1992). La rétrotranscription est une étape limitante pas absolument résolue. Cette étape conduit à une diminution de sensibilité d'un facteur dix (XU *et al.*, 1990). Malgré cela, la méthode d'amplification reste de 500 à 50 000 fois plus efficace que les techniques immunologiques, de 200 à 20 000 fois plus que l'hybridation moléculaire et 100 000 fois plus sensible que l'analyse par électrophorèse du génome virale (EIDEN *et al.*, 1992 ; GENTSCH *et al.*, 1992 ; XU *et al.*, 1990). Cette

technique paraît donc être l'outil de choix pour la recherche de virus dans l'environnement naturel ou dans des aliments. L'amplification génique trouve d'autres applications dans la synthèse de sondes (FLORES *et al.*, 1990 ; LARRALDE *et al.*, 1992 ; PARWANI *et al.*, 1992 ; ROSEN *et al.*, 1992), dans le clonage et le séquençage de gène (BALLARD *et al.*, 1992 ; PETRIC *et al.*, 1991 ; TOSSER *et al.*, 1992), ou encore dans l'expression de gène (EIDEN *et al.*, 1992). Ces travaux fournissent des renseignements sur la nature des amorces utilisées et sur leur application potentielle pour la recherche de rotavirus par amplification génique.

MATERIEL ET METHODE

I - MISE AU POINT DE LA TECHNIQUE DE RECHERCHE DES ROTAVIRUS

1. Souches virales

Deux types de souches ont été principalement utilisées :

- une souche simienne (souche ATCC VR 899) fournie par le Pr Schwartzbrod (Nancy) titrant $7 \cdot 10^8$ ff/ml ;
- une souche bovine fournie par le Dr Cohen (Jouy en Josas) purifiée en gradient de chlorure de césium (densité $1,38 \text{ g/cm}^3$ correspondant à des particules simples capsides).

2. Extraction des acides nucléiques.

La lyse des capsides virales est effectuée par action de la protéinase K (200 µg/ml) en présence de Tris HCl 0,1M - EDTA 5 mM - SDS 1 % (P/V) pendant 1 h à 56 °C. Puis les acides nucléiques sont purifiés par une extraction au phenol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) et une précipitation par l'éthanol absolu. Après centrifugation les culots d'acides nucléiques sont repris dans 50 µl d'eau distillée stérile traitée au diethylpyrocarbonate (eau-DEPC).

3. RT-SN-PCR

3.1 choix des amorces

Différents couples d'amorces amplifiant la totalité ou une partie du gène de la protéine VP7 ont été essayés : les amorces Beg9 et End9 ; Beg9 et R0 ; Beg9 et R1 ainsi que R1 et R2. Les différentes séquences et leur localisation sur le génome sont données figure 1 et tableau 1.

Figure 1: Localisation des amorces utilisées sur le gène codant pour VP7 (brin+).

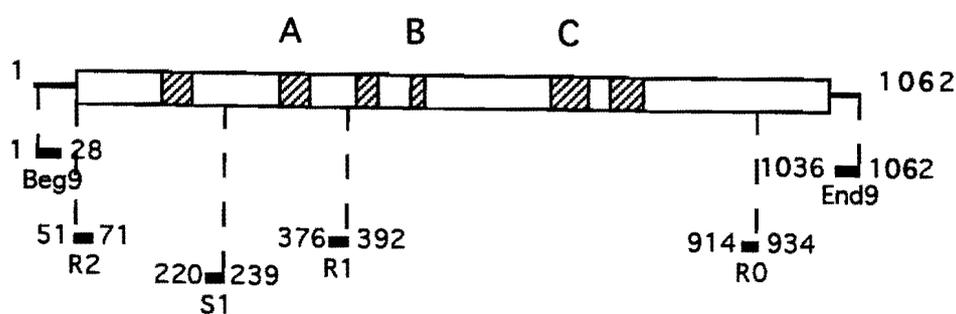


Tableau 1: Séquences des amorces et de la sonde utilisée .

Oligonucléotide	Séquence 5'-3'	Localisation	Référence
Beg9	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCGTCTGG	1-28	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
End9	GGTCACATCATAACAATTCTAATCTAAG	1062-1036	GOUVEA <i>et al.</i> , 1990
R0	ATACTTGCCACCACCTTTTTC	934-914	
R1	GATCCTGTTGGCCATCC	392-376	FLORES <i>et al.</i> , 1990
R2	GTATGGTATTGAATATACCAC	71-51	FLORES <i>et al.</i> , 1990
S1	TCCATTGATCCTGTTATTGG	220-239	

3.2 Retrotranscription

Deux techniques ont été comparées:

- utilisation du dimethyl sulfoxide (DMSO) : l'extrait d'acide nucléique est mis en présence de 10 % de DMSO et de 10 μ M de Beg9. Après dénaturation à 95 °C pendant 5 min le mélange est refroidi dans un bain de glace ;
- utilisation de l'hydroxy-méthylmercure (HMM) (Strem chemicals) : l'extrait d'acide nucléique est mis en présence de 10 mM de HMM et de 10 μ M de Beg9. La dénaturation est réalisée pendant 5 min à température ambiante.

Dans les 2 cas la réaction enzymatique est réalisée dans les conditions suivantes : 50 mM TrisHCl pH 8,3, 75 mM KCL, 10 mM DTT (60 mM DTT dans le cas de l'utilisation de l'HMM), 3 mM MgCl₂, 400 μ M de chaque dNTP, 1 μ M d'amorce, 10 U de RNAsin et 10 U de MMuLV. L'incubation est réalisée pendant 45 min à 37 °C puis l'enzyme est inactivée par chauffage à 95°C pendant 5 min.

3.3 SN-PCR

Le mélange réactionnel de la PCR est ajouté au mélange de la RT de façon à obtenir les concentrations suivantes : 10 mM tris HCl pH 8,3, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂ ; 0,001 % gélatine, 200 μ M de chaque dNTP, 1 μ M de chaque amorce (Beg9- End9 ou Beg9-R1) et 1 U de Taq polymérase.

La semi nested PCR est réalisée dans les mêmes conditions à partir de 1 μ l de produit de la 1^{ère} PCR et en utilisant les couples d'amorces suivants : Beg9-R0 ou R1-R2.

Les amplifications sont effectuées de la manière suivante :

- dénaturation à 95°C pendant 1 min ;
- 30 cycles comprenant 3 températures : 94°C pendant 30 s, 50°C pendant 30 s et 72°C pendant 30s ;
- élongation finale pendant 3 min à 72°C.

L'appareil utilisé est le Perkin Elmer 9600 (Cetus).

II - PRESENTATION DU SITE DE L'ETUDE

La station d'épuration de Livery traite les effluents des communes du SIVOM de Piriac sur Mer et de la région bauloise. Le réseau, d'une longueur totale de 375 km comprend une zone gravitaire (280 m) et une zone de refoulement (95 km). La station d'épuration (gérée par la CISE OUEST) est de conception physico-chimique. Son mode de fonctionnement actuel est le suivant :

- haute saison (juin à septembre) : floculation au chlorure d'alumine ou au sulfate d'aluminium auquel est ajouté un polymère organique cationique, chloration à l'hypochlorite de sodium et déchloration au bisulfite de sodium, décantation ;

ANALYSE DES EAUX DE STATION D'EPURATION

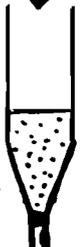
500 ml d'EAU
BRUTE ou EPURÉE

PRÉCIPITATION PAR LE
PEG (10%) 2^h à 4[°]C

400 µl d'EAU
BRUTE ou EPURÉE

EXTRACTION des Ac. NUCLEIQUES
Proteinase K
Phénol / chloroforme
Précipitation à l'éthanol

20 µl d'extrait



600 µl
Sephadex
r.150

PURIFICATION SUR SEPHADEX
Centrifugation 3' à 300g

RT-PCR
Nested PCR

RT-PCR
Nested PCR

- moyenne saison (avril mai) : floculation réduite, chloration et déchloration réduites, décantation ;
- basse saison (octobre à avril) : simple décantation.

Un traitement supplémentaire contre les mauvaises odeurs est effectué à certains postes de relèvement à Piriac sur Mer et à la Baule.

Après épuration, les effluents sont refoulés en mer par un émissaire de 6 km de long dont l'exutoire se situe en baie du Scal sur la commune du Pouliguen. Posée sur le fond marin, la canalisation (diamètre 600 mm, longueur 330 m) se termine à 6 m de profondeur.

La capacité de traitement de la station de Livery est de 218 000 équivalents habitants. La population permanente concernée est d'environ 55 000 habitants, la population estivale est d'environ 345 000 habitants. Il est donc admis que la capacité de la station d'épuration est dépassée en période estivale. Par ailleurs le fonctionnement du couple réseau d'assainissement/station d'épuration est perturbé par des intrusions d'eaux pluviales et des intrusions d'eaux parasites en provenance de la nappe phréatique. Une étude réalisée en 1984 (Saunier eau et environnement) a montré que 58,3 % des effluents ne sont pas des eaux usées domestiques (sans tenir compte des by-pass sur le réseau mis en oeuvre par la saturation des collecteurs ou des postes de relevage lors de fortes précipitations).

Les prélèvements (eaux brutes, épurées et boues) ont été effectués mensuellement entre juin et novembre 1993.

III - TRAITEMENT DES ECHANTILLONS

1. Elution concentration des particules virales

Les eaux brutes et épurées (500 ml) sont additionnées de PEG 6000 à 10 % (P/V) et mises sous agitation pendant 2 h à 4 °C. Après centrifugation à 10000 x g pendant 30 min le culot est repris dans 2 ml d'eau DEPC et congelé à -20 °C.

Les boues (500g) sont additionnées de tampon glycine (500 ml) pH 9,5 et d'extrait de boeuf à 3 % (P/V). Le mélange est placé sous agitation pendant 1 h à température ambiante puis centrifugé à 4000 xg pendant 10 min. Le surnageant est mélangé à 10 % de PEG 6000 (P/V) et mis sous agitation pendant 2 h à 4 °C. Après centrifugation à 10000 xg pendant 30 min le culot est repris dans ml d'eau-DEPC.

2. Extraction des acides nucléiques

L'extraction a été réalisée sur une partie du concentrat viral obtenu après traitement au PEG (410 µl) ou sur 410 µl d'échantillon directement. La lyse des capsides virales est réalisée par action de la protéinase K (200 µg/ml) en présence d'un mélange détergent : Tris HCl 0,1M - EDTA 5 mM - SDS 1 % (P/V) pendant 1 h à 56 °C. Les acides nucléiques sont purifiés par une extraction au phénol-chloroforme-alcool isoamylique (25/24/1) et précipités par l'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium 0,3 M pendant 2 h à - 80 °C. Après lavage par l'éthanol à 70°C, le culot d'acide nucléique est repris dans 50 µl d'eau-DEPC.

3. Purification

Pour les ARN simple brin (EV et HAV) des essais de purification supplémentaires ont été réalisés par passage des acides nucléiques, après précipitation éthanolique, sur gel de Sephadex G 150. Des micro-colonnes sont préparées avec 600 µl de Sephadex en suspension dans un tampon 10 mM Tris- 1mM EDTA . L'excès de tampon est éliminé par centrifugation à 300 xg pendant 4 min, les extraits d'acide nucléique (20 µl) sont déposés à la surface du gel et l'ensemble est de nouveau centrifugé à 300 g pendant 3 min. Les acides nucléiques purifiés sont récupérés sous le même volume (20 µl).

4. Amplification génique

4.1 Amorces

Les oligonucléotides ont été sélectionnés à partir de séquences publiées. Pour les entérovirus les amorces permettent l'amplification d'une séquence située dans la région 5' non codante, pour le HAV une séquence codant pour la protéine de capsid VP1 et pour les rotavirus une séquence codant pour la protéine de capsid externe VP7 (amorces Beg9, R1 et R2). Les différentes séquences ainsi que les localisations génomiques sont données dans les tableaux 1 et 2.

Tableau 2 : Amorces utilisées

Oligonucleotide	Segments (5'-3')	Localisation
HAV		
H1	GGAAAGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2389-2413 ^a
H2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2192-2167 ^a
H3	TCCTCAATTGTTGTGATAGC	2377-2358 ^a
EV		
K1	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	577-596 ^b
K2	CAAGCACTTCTGTTTCCCGG	182-162 ^b
K3	CTTGCGCGTTACGAC	524-510 ^b

a : position des nucléotides se référant au génome du VHA HM 175.

b : position des nucléotides se référant au génome du poliovirus 1 (Mahoney).

4.2 RT

La synthèse de l'ADNc est réalisée à partir de 2 µl dans un mélange contenant 50 mM Tris HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 10 mM DTT, 3 mM MgCl₂, 250 µM de chaque dNTP, 1 µM de l'amorce complémentaire (E2 ou H1), 10 U de RNAsin (Pharmacia), et 10 U de reverse transcriptase (MMuLV, Stratagène) pendant 1 h à 37 °C. L'enzyme est alors dénaturée par chauffage à 95°C pendant 2 min puis les tubes sont placés dans la glace.

Pour les RV, la transcription est légèrement différente comme il a été décrit précédemment : l'extrait d'acides nucléiques est dénaturé avec 10 µM de l'amorce avale (Beg9) et 10 mM d'HMM pendant 5 min à température ambiante, puis le mélange est complété comme ci-dessus excepté la concentration en DTT égale à 60 mM.

4.3 SN-PCR

L'amplification est réalisée dans un mélange contenant 10 mM TrisHCl (pH 8,3), 50 mM MgCl₂-0,01 % (wt/vol) gélatine, 200 µM dNTP, 1 µM de chacun des primers et 1 U de Taq polymérase (cetus). Après dénaturation pendant 1 mn à 95 °C, 30 cycles sont réalisés de la manière suivante : 94 °C pendant 30s, 50 °C pendant 30s et 72 °C pendant 30s. Une élongation terminale est réalisée pendant 2 min pour terminer la réaction puis la température est abaissée à 4 °C.

Pour le second cycle d'amplification (semi-nested PCR) 1 µl du produit de la 1^{ère} amplification est amplifiée dans les mêmes conditions mais avec l'amorce avale et l'amorce interne.

Des contrôles négatifs (extraction, RT, PCR) et un contrôle positif sont introduits dans chaque série d'amplification.

5. Révélation et identification des produits amplifiés

Les produits de PCR sont analysés par migration sur gel de polyacrylamide à 9 % et coloration au bromure d'éthidium. Après vérification de la taille des fragments amplifiés et des différents témoins la présence ou l'absence d'acide nucléique amplifié est notée pour chaque échantillon.

RESULTATS

I - DETECTION DES ROTAVIRUS

1. Vérification des fragments amplifiés

Les séquences amplifiées en première et seconde PCR sont visualisées après électrophorèse en gel de polyacrylamide et lecture sous UV après coloration au bromure d'éthidium. Une première identification du produit amplifié est donnée par la taille de la bande obtenue (comparaison par rapport au marqueur de taille VI, Boehringer). L'utilisation du 1^{er} couple d'amorce (Beg9 et End9) permet d'amplifier un fragment de 1230 pb en 1^{ère} PCR et en nested PCR le couple Beg9 et Rend3 conduit à l'amplification d'un segment de 1033 pb.

Le second couple d'amorce sélectionné (Beg9 et R4) amplifie une région de 392 bp en 1^{ère} PCR et en seconde PCR, R5 et R4 amplifie une séquence de 341 bp.

Ces différents couples d'amorces ont tous fournis les fragments attendus après amplification des 2 souches virales de référence.

2. Comparaison des deux techniques de dénaturation

L'utilisation de l'HMM permet d'obtenir une sensibilité 10 fois supérieure par rapport à l'utilisation du DMSO.

3. Etude de la sensibilité

La dilution de la souche du virus simien dans de l'eau a permis d'obtenir une amplification de 10^6 ff/ml avec les premières amorces utilisées (Beg9, End9 et Rend3). En utilisant les amorces Beg9, R4 et R5 la sensibilité obtenue est de 10^4 ff/ml.

II - DETECTION DES EV

Deux protocoles ont été comparés : recherche des acides nucléiques viraux directement sur le prélèvement ou après concentration des particules virales par précipitation par le PEG (tableau 3). Les résultats obtenus montrent une meilleure sensibilité de la technique par analyse directe sur l'échantillon. Par exemple pour les eaux brutes, 4 échantillons donnent un résultat positif alors qu'après concentration par le PEG seulement 1 échantillon donne un résultat positif. De même, pour les boues, 2 échantillons sont positifs par la méthode directe et négatifs après concentration. Pour les eaux épurées, les résultats obtenus sont légèrement différents puisque 2 échantillons trouvés positifs par la méthode directe le sont également après concentration tandis que 2 autres échantillons positifs en direct sont négatifs après concentration et 2 autres donnent des résultats inverses.

Le second protocole étudié dans ce travail est l'apport de la purification sur colonne de Sephadex pour les acides nucléiques extraits de l'échantillon directement ou après concentration au PEG.

Pour l'analyse directe, le passage sur colonne de Sephadex ne modifie pas d'une manière significative les résultats obtenus pour les eaux brutes et les boues. Pour les eaux épurées, parmi les 4 échantillons donnant des résultats positifs par la méthode directe seulement 1 est toujours positif après colonne et un autre négatif sans colonne est positif après colonne.

Après précipitation par le PEG un échantillon est trouvé positif avec ou sans passage sur colonne tandis qu'un autre est trouvé positif seulement après passage sur colonne et que 3 autres, positifs sans colonne sont négatifs après colonne.

Tableau 3 : Influence de la purification sur colonne pour la détection des EV

	EAU BRUTE		EAU EPUREE		BOUE	
	+	-	+	-	+	-
Directe	4	2	4	2	2	2
PEG	1	5	4	2	0	4

a. Resultats obtenus sans purification sur colonne

	EAU BRUTE		EAU EPUREE		BOUE	
	+	-	+	-	+	-
Directe	4	2	2	4	3	1
PEG	4	2	2	4	2	2

b. Resultats obtenus avec purification sur colonne

+ : ARN détecté par PCR, - : absence d'ARN.

Tableau 4 : Résultats obtenus pour les 3 types de virus recherchés

DATE	EAU BRUTE			EAU EPUREE			BOUE		
	EV	VHA	RV	EV	VHA	RV	EV	VHA	RV
23/06	+	+	+	+	+	+	nd	nd	nd
19/07	-	-	-	+	-	+	-	-	-
17/08	-	+	+	+	+	+	-	+	-
16/09	+	+	+	-	+	+	+	-	-
14/10	+	+	+	-	+	+	+	-	-
15/11	+	-	-	+	-	+	nd	nd	nd

EV : enterovirus, VHA : virus de l'hépatite A, RV : rotavirus.

+ : présence d'ARN viral détecté par PCR, - : absence d'ARN viral, nd : échantillon non réalisé.

III - RESULTATS OBTENUS SUR LES ECHANTILLONS

Les ARN viraux (EV, VHA et RV) ont été recherchés sur les différents échantillons réalisés. Les résultats, donnés dans le tableau 4 montrent une forte dominance des résultats positifs pour les 3 types de virus, seule l'eau brute prélevée le 19/07 ne présentant aucun ARN viral. On peut également noter que les boues semblent peu contaminées par les ARN viraux.

DISCUSSION

L'objectif de ce travail consistait dans un premier temps à mettre au point une méthode de détection des rotavirus par PCR. En effet, comme pour les autres virus, la culture cellulaire, méthode de référence permettant de caractériser la présence de particules virales infectieuses, est difficilement applicable pour leur détection dans le milieu extérieur. D'autre part, il existe de nombreuses difficultés à multiplier certaines souches de rotavirus humains en culture de cellule. Les premières applications de la PCR ont été réalisées pour la mise en évidence de souches dans les salles d'enfants malades. Nous avons sélectionné des séquences utilisées à cet effet et avons adapté la technique au milieu extérieur.

Les premières amorces choisies, amplifiant la séquence du gène de la protéine VP7 permettaient d'obtenir un fragment de 1062 pb. Cependant, malgré l'utilisation d'une amorce interne permettant la réalisation d'un second cycle d'amplification (semi-nested PCR), la sensibilité obtenue est apparue insuffisante pour une détection dans l'environnement. Selon certains auteurs (EIDEN *et al.*, 1991 ; GOUVEA *et al.*, 1991) un appariement imparfait de l'amorce pourrait expliquer ce résultat. Il est également fort probable que cette faible sensibilité soit due à la longueur du fragment amplifié. La sélection de nouvelles amorces amplifiant seulement une partie de ce gène (soit 392 premiers nucléotides lors du premier cycle d'amplification et 342 lors du second cycle) a amélioré la sensibilité. Le protocole établi permet en effet de détecter 10^3 foci fluo/ml ce qui est comparable aux résultats publiés (EIDEN *et al.*, 1991 ; GENTSCH *et al.*, 1992 ; GOUVEA *et al.*, 1990 ; WILDE *et al.*, 1990). Cependant, ce seuil de détection reste inférieur aux sensibilités établies pour la recherche d'autres virus telles par exemple celles publiées pour les picornavirus (ATMAR *et al.*, 1993 ; KOPECKA *et al.*, 1993). Cette perte de sensibilité de la technique de PCR pourrait venir de l'étape préalable de dénaturation, en effet l'ARN bicaténaire des rotavirus est une structure très stable difficile à dénaturer. Une amélioration de la sensibilité pourrait être obtenue par une optimisation encore plus grande de cette étape malgré les progrès déjà apportés par l'utilisation de l'hydroxyméthylmercure comme agent dénaturant.

Après cette étape de mise au point expérimental et d'après les précédents résultats obtenus (présentés dans le précédent rapport "Mise au point de la PCR pour la détection du virus de l'hépatite A et des entérovirus"), nous avons appliqué ces méthodologies à la détection des ARN viraux dans des prélèvements de station d'épuration. Traditionnellement, la détection de particules virales dans les milieux extérieurs passe par une première phase de concentration. Cette étape de concentration peut se faire par l'utilisation de cartouches filtrantes (difficilement applicable à des prélèvements de rejets) ou par la précipitation des virions en milieu acide ou à l'aide d'un polymère tel que le polyéthylène glycol. Cependant, ces différentes techniques si elles ont montré leur intérêt pour la détection des virus par culture cellulaire peuvent introduire des inhibiteurs des réactions enzymatiques utilisées (rétro-transcription ou amplification) ou

provoquer la perte de particules virales lors des différentes phases d'extraction qui peuvent être parfois très longue (TSAI *et al.*, 1993 ; GOSWAMI *et al.*, 1993 ; GRAFF *et al.*, 1993). Dans ce travail nous avons donc voulu évaluer l'intérêt de l'étape préalable de concentration pour des échantillons susceptibles d'être fortement contaminés tels que les rejets, mais aussi, dans l'éventualité de la conservation de cette phase de concentration, des étapes supplémentaires de purification permettant d'éliminer les inhibiteurs introduits. Nous avons réalisé une comparaison pour la détection des entérovirus soit directement sur un faible volume d'échantillon (410 µl) ou après concentration d'un volume plus important (500 ml) par l'utilisation du PEG. Les premiers résultats obtenus, qui devront être confirmés par l'analyse d'une plus grande série de prélèvements, montrent a priori une plus grande sensibilité de la méthode directe pour les échantillons d'eaux brutes et les boues. Pour l'analyse de l'eau épurée trop peu d'échantillons ont été analysés pour conclure véritablement, la concentration par le PEG pouvant dans ce cas augmenter la sensibilité. Lorsqu'une concentration préalable par le PEG est réalisée, la purification sur gel de sephadex semble apporter de bons résultats c'est-à-dire que l'action de certains inhibiteurs pourrait être éliminée. Ces colonnes ont par ailleurs été appliquées avec succès par divers auteurs dans des échantillons d'eaux, de selles ou de sols (TSAI *et al.*, 1992 ; DE LEON *et al.*, 1992 ; ABBASZADEGAN *et al.*, 1993).

Les résultats obtenus pour les 3 types d'ARN viraux recherchés montrent que des particules virales sont présentes dans presque tous les prélèvements réalisés. Les boues semblent moins contaminées que les eaux, cependant un résultat négatif ne signifie peut-être pas l'absence de virus mais la présence d'inhibiteurs. Pour cela il serait intéressant de poursuivre les études de purification mais aussi d'introduire des contrôles internes de façon à mettre en évidence la présence des inhibiteurs.

Ces premiers résultats montrent que la RT Nested PCR est une technique sensible, spécifique et relativement rapide pour la détection d'ARN viraux dans des prélèvements de stations d'épuration. Il convient néanmoins de poursuivre cette étude de façon, d'une part à confirmer ces résultats et, d'autre part à éliminer tous les inhibiteurs susceptibles d'apporter des réactions faussement négatives.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ABBASZADEGAN M., HUBER M.S., GERBA C.P. & PEPPER I.L., 1993. Detection of enteroviruses in groundwater with the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1318-1324.
- ANSARI, S.A., V.S. SPRINGTHORPE & S.A. SATTAR, 1991. Survival and vehicular spread of human rotaviruses: possible relation to seasonality of outbreaks. *Rev. Infect. Dis.* 13 : 448-461.
- ATMAR, R.L., T.G. METCALF, F.H. NEILL & M.K. ESTES, 1993. Détection of enteric virus in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 631-635.
- BALLARD, A., M.A. MCCRAE & U. DESSELBERGER, 1992. Nucleotide sequences of normal and rearranged RNA segments 10 of human rotaviruses. *J. Gen. Virol.* 73 : 633-638.
- BERMAN D. & J.C. HOFF, 1984. Inactivation of simian rotavirus SA 11 by chlorine, chlorine dioxide and monochloramine. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 317-323.
- BERN, C., L. UNICOMB, J.R. GENTSCH, N. BANUL, M. YUNUS, R. BRADLEY SACK & R.I. GLASS, 1992. Rotavirus diarrhea in Bangladeshi children: correlation of disease severity with serotypes. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 3234-3238.
- BISHOP, R.F., G.P. DAVIDSON, I.H. HOLMES & B.J. RUCK, 1973. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with viral gastroenteritis. *Lancet.* 2 : 1281-1283.
- BOHER, S., 1991. Analyse virologique des huitres et étude des cinétiques d'accumulation et de décontamination virale. Thèse. Université de Nancy I.
- BRÜSSOW, H., O. NAKAGOMI, G. GERNA & W. EICHHORN, 1992. Isolation of an avianlike group A rotavirus from a calf with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 67-73.
- COHEN, J., 1977. Ribonucleic acid polymerase activity associated with purified calf rotavirus. *J. Gen. Virol.* 36 : 395-402.
- DE CHAMPS, C., H. LAVERAN, H. PEIGUE-LAFEUILLE, M. CHAMBON, F. DEMEOCQ, J. GAULME & D. BEYTOUT, 1991. Sequential rotavirus infections: characterization of serotypes and electrophoretotypes. *Res. Virol.* 142 : 39-45.
- DE LEON R., MATSUI S.M., BARIC R.S., HERRMANN J.E., BLACKLOW N.R., GREENBERG H.B. & SOBSEY M.D., 1992. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes. *J. Clin. Microb.* 30 : 3151-3157.
- DE LEON, R. & C.P. GERBA, 1991. Detection of rotaviruses in water by gene probes. *Wat. Sci. Tech.* 44 : 281-284.

- DEETZ, T.R., E.M. SMITH, S.M. GOYAL, C.P. GERBA, J.J. VOLLET III, L. TSAI, H.L. DUPONT & B.H. KESWICK, 1984. Occurrence of rota- and enteroviruses in drinking and environmental water in a developing nation. *Water Res.* 18 : 567-571.
- EIDEN, J.J., J. WILDE, F. FIROOZMAND & R. YOLKEN, 1991. Detection of animal and human group B rotaviruses in fecal specimens by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 539-543.
- EIDEN, J.J., S.-B. WEE & S.L. VONDERFECHT, 1992. In Vitro transcription and translation of group B rotavirus strain IDIR gene 8 and immunoprecipitation by human sera. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 440-443.
- ESTES, M.K. & J. COHEN, 1989. Rotavirus gene Structure and function. *Microbiol. Rev.* 53 : 410-449.
- ESTES, M.K., 1990. Rotaviruses and their replication, P. 1329-1352. In B.N. Fields (ed.), *Virology*, vol.2, 2nd ed. Raven Press, New York.
- FANG, Z.-Y., Q. YE, M.-S. HO, H. DONG, S. QING, M.E. PENARANDA, T. HUNG, L. WEN & R.I. GLASS, 1989. Investigation of an outbreak of adult diarrhes rotavirus in China. *J. Infect. Dis.* 160 : 948-953.
- FLORES, J., J. SEARS, I. PEREZ SCHAEEL, L. WHITE, D. GARCIA, C. LANATA & A.Z. KAPIKIAN, 1990. Identification of human rotavirus serotype by hybridization to polymerase chain reaction-generated probes derived from a hyperdivergent region of the gene encoding outer capsid protein VP7. *J. Virol.* 64 : 4021-4024.
- GAGGERO, A., L.F. AVENDANO, J. FERNANDEZ & E. SPENCER, 1992. Nosocomial transmission of rotavirus from patients admitted with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 3294-3297.
- GENTSCH, J.R., R.I. GLASS, P. WOODS, V. GOUVEA, M. GORZIGLIA, J. FLORES, B.K. DAS & M.K. BHAN, 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 1365-1373.
- GERNA, G., A. SARASINI, M. PAREA, S. ARISTA, P. MIRANDA, H. BRÜSSOW, Y. HOSHINO & J. FLORES, 1992. Isolation and characterization of two distinct human rotavirus stains with G6 specificity. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 9-16.
- GOSWAMI B.B., KOCH W.H. & CEBULA T.A., 1993. Detection of hepatitis A virus in *Mercenaria mercenaria* by coupled reverse transcription and polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 2765-2770.
- GOUVEA, V., J.R. ALLEN, R.I. GLASS, Z.-Y. FANG, M. BREMONT, J. COHEN, M.A. MCCRAE, L.J. SAIF, P. SINARACHATANANT & E.O. CAUL, 1991. Detection of group B and C rotaviruses by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 519-523.
- GOUVEA, V., R.I. GLASS, P. WOODS, K. TANIGUCHI, H.F. CLARK, B. FORRESTER & Z.-Y. FANG, 1990. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stool specimens. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 276-282.

- GRAFF J., TICEHURST J. & FLEHMIG B., 1993. Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3165-3170.
- GREEN, K.Y., J.F. SEARS, K. TANIGUCHI, K. MIDTHUN, Y. HOSHINO, M. GORZIGLIA, K. NISHIKAWA, S. URASAWA, A.Z. KAPIKIAN, R.M. CHANOCK & J. FLORES, 1988. Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene. *J. Virol.* 62 : 1819-1823.
- GUIGUET, M., B. HUBERT & A. LEPOUTRE, 1992. Une année de surveillance des diarrhées aiguës par les médecins sentinelles. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 37 : 177-178.
- HUANG, J.-A., H.S. NAGESHA, D.R. SNODGRASS & I.H. HOLMES, 1992. Molecular and serological analyses of two bovine rotaviruses (B-11 and B-60) causing calf scours in Australia. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 85-92.
- HURST, C.J. & C.P. GERBA., 1980. Stability of simian rotavirus in fresh and estuarine water. *Appl. Environ. Microbiol.* 39 : 1-5.
- INSTITUTE OF MEDICINE, 1986. New vaccine development: establishing priorities. II. Diseases of importance in developing countries. National Academy Press, Washington, D.C.
- KAPIKIAN, A.Z. & R.M. CHANOCK, 1990. Rotaviruses, p.1353-1404. In B.N. Fields (ed.), *Virology*, vol.2, 2nd ed. Raven Press, New York.
- KOHLI, E., L. MAURICE, J.F. VAUTHEROT, C. BOURGEOIS, J.B. BOUR, J. COHEN & P. POTHIER, 1992. Localization of group-specific epitopes on the major capsid protein of group A rotavirus. *J. Gen. Virol.* 73 : 907-914.
- KOOL, D.A., S.M. MATSUI, H.B. GREENBERG & I.H. HOLMES, 1992. Isolation and characterization of a novel reassortant between avian Ty-1 and simian RRV rotaviruses. *J. Virol.* 66 : 6836-6839.
- KOPECKA, H., S. DUBROU, J. PREVOT, J. MARECHAL & J.M. LOPEZ-PILA, 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 1213-1219.
- LARRALDE, G. & M. GORZIGLIA, 1992. Distribution of conserved and specific epitopes on the VP8 subunit of rotavirus VP4. *J. Virol.* 66 : 7438-7443.
- MATTION, N., J. COHEN & M.K. ESTES, 1992. The rotavirus proteins. *Virus Infections of the GI Tract*, 2nd Ed.
- MIDTHUN, K., J. FLORES, K. TANIGUCHI, S. URASAWA, A.Z. KAPIKIAN & R.M. CHANOCK, 1987. Genetic relatedness among human rotavirus gene coding for VP7, a major Neutralization protein, and its application to serotype identification. *J. Clin. Microbiol.* 25 : 1269-1274.

- MIDTHUN, K., Y. HOSHINO, A.Z. KAPIKIAN & R.M. CHANOCK, 1986. Single gene substitution rotavirus reassortants containing the major neutralization protein (VP7) of human rotavirus serotype 4. *J. Clin. Microbiol.* 24 : 822-826.
- MINAMOTO, N., O. NAKAGOMI, M. SUGIYAMA & T. KINJO, 1991. Characterization of an avian rotavirus strain by neutralization and molecular hybridization assays. *Res. Virol.* 142 : 271-275.
- NAKAGOMI, O. & T. NAKAGOMI, 1991. Genetic diversity and similarity among mammalian rotaviruses in relation to interspecies transmission of rotavirus. *Arch. Virol.* 120 : 43-55.
- NAKAGOMI, O., A. OHSHIMA, Y. ABOUDY, I. SHIF, M. MOCHIZUKI, T. NAKAGOMI & T. GOTLIEB-STEMATSKY, 1990. Molecular identification by RNA-RNA hybridization of a human rotavirus that is closely related to rotaviruses of feline and canine origin. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1198-1203.
- NAKAGOMI, O., H. OYAMADA & T. NAKAGOMI, 1991. Experience with serotyping rotavirus strains by reverse transcription and two-step polymerase chain reaction with generic and type-specific primers. *Mol. Cell. Probes.* 5 : 285-289.
- NOEL, J.S., G.M. BEARDS, AND W.D. CUBITT, 1991. Epidemiological survey of human rotavirus serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in northeast London from 1984 to 1990. *J. Clin. Microbiol.* 29 : 2213-2219.
- PANCORBO, O.C., B.G. EVANSHEN, W.F. CAMPBELL, S. LAMBERT, S.K. CURTIS & T.W. WOOLLEY, 1987. Infectivity and antigenicity reduction rates of human rotavirus strain Wa in fresh Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 53 : 1803-1811.
- PARWANI, A.V., B.I. ROSEN, M.A. MCCRAE & L.J. SAIF, 1992. Development of cDNA probe for typing group A bovine rotaviruses of VP4 specificity. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 2717-2721.
- PETRIC, M., K. MAYUR, S. VONDERFECHT & J.J. EIDEN, 1991. Comparison of group B rotavirus genes 9 and 11. *J. Gen. Virol.* 72 : 2801-2804.
- PINFOLD, J.V., N.J. HORAN & D. DUNCAN MARA, 1991. Seasonal effects on the reported incidence of acute diarrhoeal disease in northeast Thailand. *Inter. J. Epidemiol.* 20 : 777-786.
- PIRTLE, E.C. & G.W. BERAN, 1991. Virus survival in the environment. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* 10 : 733-748.
- RAO, V.C., K.M. SEIDEL, S.M. GOYAL, T.G. METCALF & J.L. MELNICK, 1984. Isolation of enteroviruses from water, suspended solids, and sediments from Galveston Bay: survival of poliovirus and rotavirus adsorbed to sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 48 : 404-409.
- ROSEN, B.I., A.V. PARWANI, M. GORZIGLIA, G. LARRALDE & L.J. SAIF, 1992. Characterization of full-length and polymerase chain reaction-derived partial-length Gottfried and OSU gene 4 probes for serotypic differentiation of porcine rotaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 30 : 2644-2652.

- SMITH, E.M. & C.P. GERBA, 1982. Development of a method for human rotavirus in water and sewage. *Appl. Environ. Microbiol.* 43 : 1440-1450.
- STREET, J.E., M.C. CROXSON, W.F. CHADDERTON & A.R. BELLAMY, 1982. Sequence diversity of human rotavirus strains investigated by northern blot hybridization analysis. *J. Virol.* 43 : 369-378.
- TANIGUCHI, K., K. NISHIKAWA, T. URASAWA, S. URASAWA. K. MIDTHUN, A.Z. KAPIKIAN & M. GORZIGLIA, 1989. Complete nucleotide sequence of the gene encoding VP4 of a human rotavirus (strain K8) which has unique VP4 neutralization epitopes. *J. Virol.* 63 : 4101-4106.
- TOSSER, G., M. LABBE, M. BREMONT & J. COHEN, 1992. Expression of major capsid protein VP6 of group C rotavirus and synthesis of chimeric single-shelled particles by using recombinant baculoviruses. *J. Virol.* 66 : 5825-5831.
- TSAI Y.L. & OLSON B.H., 1992. Rapid method for separation of bacterial DNA from humic substances in sediments for polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 : 2292-2295.
- TSAI Y.L., SOBSEY M.D., SANGERMANO L.R. & PALMER C.J., 1993. Simple method of concentrating enteroviruses and hepatitis A virus from sewage and ocean water for rapid detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3488-3491.
- VALETTE, C. & L. NICOLAS, 1990. Surveillance des diarrhées à partir d'un réseau de laboratoires dans la ville de Saint-Etienne. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* 30 : 131.

- WILDE, J., J. EIDEN & R. YOLKEN, 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J. Clin. Microbiol.* 28 : 1300-1307.
- XU, L., D. HARBOUR & M.A. MCCRAE, 1990. The application of polymerase chain reaction to the detection of rotaviruses in faeces. *J. Virol. Methods.* 27 : 29-38.
- ZHENG, B.J., W.P. LAM, Y.K. YAN, S.K.F. LO, M.L. LUNG & M.H. NG, 1989. Direct identification of serotypes of natural human rotavirus isolates by hybridization using cDNA probes derived from segment 9 of the rotavirus genome. *J. Clin. Microbiol.* 27 : 552-557.