

E620-LEG-D

CONTRAT IFREMER 91.2.430435 DEL



**DETERMINATION DE LA QUALITE DU
MILIEU SUR L'INACTIVATION
DES VIRUS EN MER**



ANALYSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

LE GUYADER F. & MENARD D.

Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, NANTES

BILLAUEDEL S. & MARCHAIS V.

Laboratoire de Virologie, Faculté de Pharmacie, NANTES

IFREMER-DERO/EL



0EL04904

Novembre 1993



**DETERMINATION DE LA QUALITE DU
MILIEU SUR L'INACTIVATION
DES VIRUS EN MER**

ANALYSE PAR BIOLOGIE MOLECULAIRE

LE GUYADER F. & MENARD D.

Laboratoire de Microbiologie, IFREMER, NANTES

BILLAUDEL S. & MARCHAIS V.

Laboratoire de Virologie, Faculté de Pharmacie, NANTES

Novembre 1993

J

I - INTRODUCTION

Le but de cette étude réalisée dans le cadre du Plan National d'Océanographie Côtière est l'analyse des différents paramètres susceptibles d'interférer dans les processus d'inactivation des virus entériques en milieu marin. La première étape de ce travail consiste dans la détermination de l'influence de paramètres physico-chimiques tels que la salinité, la température ou la luminosité sur le comportement des virus entériques en eau de mer artificielle. Les virus sont recherchés simultanément par inoculation sur culture cellulaire et par biologie moléculaire pour les expérimentations réalisées avec le poliovirus de type 1 et par radio-immunologie et biologie moléculaire pour celles réalisées avec le virus de l'hépatite A (VHA). Ce rapport présente les résultats obtenus par PCR pour la mise en évidence du poliovirus et du VHA.

II - MATERIEL ET METHODES

A - Poliovirus de type 1

Concentration des particules virales

Les échantillons reçus de Nancy (5 ml) ont tout d'abord été additionnés de PEG 6000 à 10%. Après ajustement du pH à 7,5 l'ensemble est placé sous agitation pendant 2h à 4°C puis centrifugé à 10 000g pendant 30 min à 4°C. Le culot est repris dans 300µl d'eau distillée stérile traitée au diéthyl-pyrocarbonate (DEPC).

Lyse des capsides virales et extraction des acides nucléiques.

La lyse des capsides virales est effectuée par action de la protéinase K (200µg/ml) en présence de SDS à 10% pendant 1h à 56°C.

Les acides nucléiques sont purifiés par une extraction au phénol-chloroforme (V/V) et une précipitation à l'éthanol absolu en présence d'acétate de sodium (0,3M) à -20°C pendant une nuit. Après centrifugation à 10 000 g pendant 30 min à 4°C, le culot est lavé à l'éthanol à 70°C, séché puis repris dans 50µl d'eau distillée stérile traitée au DEPC.

Choix des amorces

Deux oligonucléotides situés dans la région 5' non-codante du génome du poliovirus de type 1 sont utilisés comme amorces dans les réactions de PCR. Les séquences de ces oligonucléotides et leur position sur le génome sont données tableau 1.

Précautions

La sensibilité de la technique de PCR oblige à prendre de nombreuses précautions :

- le mélange réactionnel est réalisé dans une pièce différente de celle où sont manipulés les échantillons;
- les réactifs sont aliquotés sous de faibles volumes de façon à n'être utilisés qu'une seule fois;
- les pipettes utilisées sont soit à déplacement positif soit équipées de cônes à filtres;
- les produits amplifiés sont analysés dans une troisième pièce et des pipettes sont réservées à leur manipulation.

Transcription

La transcription est effectuée sur 2 μ l d'acide nucléique purifié dans les conditions suivantes: 50 mM TrisHCl pH 8,3 ; 75 mM KCl ; 10 mM DTT ; 3 mM MgCl₂ ; 250 μ M de chaque dNTP ; 1 μ M de Primer 2 ; 1 U de RNAsin (Pharmacia) et 10 U de MMuLV (Stratagene). Le mélange est placé pendant 1 h au bain-marie à 37°C.

PCR

L'amplification est réalisée selon le protocole Perkin Elmer (Cetus) c'est à dire dans un mélange contenant: 50 mM KCl ; 10 mM Tris Hcl pH 8,3 ; 1,5 mM MgCl₂ ; 0,001% (P/V) gélatine ; 200 μ M de chaque dNTP ; 1 μ M de chaque primer et 3 U/ 100 μ l de Taq DNA polymérase (Perkin Elmer). Le mélange réactionnel est préparé pour la totalité des échantillons puis réparti dans chaque microtube, le cDNA (2 μ l) est alors ajouté. Les microtubes sont placés dans l'appareil à PCR (Perkin Elmer 9600) et les variations de températures sont effectuées ainsi :

- dénaturation à 94°C pendant 2 min,
- annealing 30 s à 50°C ;
- extension 30 s à 72°C ;
- dénaturation 30 s à 94°C.

Ces trois dernières étapes sont répétées 30 fois puis la réaction est terminée par une extension finale de 3 min à 72°C.

Révélation

Les produits d'amplification sont mis en évidence par électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 9%. Les échantillons (8 μ l) sont déposés avec 3 μ l de SBS dans les puits ainsi qu'un marqueur de taille (marqueur V, Boehringer). La migration est effectuée à 100 V pendant environ 1 h. Après migration le gel est immergé dans une solution de bromure d'éthidium à 1% puis révélé par exposition à la lumière ultra-violette. La taille du segment amplifié est comparée à celle du témoin positif et au marqueur de taille. L'absence d'amplification dans les différents témoins négatifs est contrôlée.

B – Virus de l'hépatite A

Prélèvements

*** Etude de la température**

Des échantillons d'eau de mer contaminés artificiellement à 25° C, 18° C, 4° C par le virus de l'hépatite A (VHA) ont été prélevés tous les 4 jours après l'inoculation, de J3 à J92 ou J99.

*** Etude de la salinité**

D'autres échantillons d'eau de mer ont été contaminés artificiellement par le VHA en présence de 33 g/l, 24 g/l ou 14 g/l de sel. Ils ont été prélevés tous les 4 jours, de J1 à J85 ou J92.

Extraction des acides nucléiques

Sur 200 μ l d'échantillons, la lyse des capsides virales est réalisée par action de la protéinase K (200 μ g/ml, Sigma) en présence d'un mélange détergent (0,1 M Tris HCl pH 7,5 - 1,25 M EDTA - 0,15 M NaCl - 1 % SDS). L'ensemble est placé au bain-marie 1 heure à 56° C. Les acides nucléiques libérés sont purifiés par extraction au phénol-chloroforme (V/V) puis précipités à l'éthanol absolu (2 V) en présence de 0,3 M d'acétate de sodium. Après centrifugation, les culots sont lavés, séchés puis repris dans 100 μ l d'eau distillée stérile et congelés à - 20° C.

Mise en évidence du génome du VHA par PCR

* Choix des amorces

Les amorces utilisées sont celles publiées par Robertson *et al.*, 1989.

Amorce A (2167-2192) : 5' GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG 3'

Amorce B (2339-2414) : 5' GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG 3'

* Rétrotranscription

Avant la réaction d'amplification, l'ARN viral est rétrotranscrit en ADN complémentaire (ADNc) double brin à l'aide de la reverse transcriptase (MuMLV, Stratagene). 1 μ l d'ARN viral est incubé pendant une heure à 37° C en présence de 12,5 μ l d'eau distillée stérile, 5 μ l de tampon 5X (250 mM Tris HCl, 375 mM KCl, 50 mM DTT, 15 mM MgCl₂), 1,25 μ l de chacune des solutions 10 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP (desogynucléotides triphosphates ultra-pure, Pharmacia), 0,25 μ l de l'amorce anti-sens à 1 μ g/ml, 5U de MuMLV. Après rétrotranscription, l'enzyme est inactivée 10 min à 65° C.

* Réaction d'amplification

Les réactions d'amplification sont réalisées dans un thermocycleur (Hybaid Omnigene TR3), sous un volume de 25 μ l. A 1,25 μ l d'ADNc sont additionnées 0,25 μ l de chacune des deux

amorces (100 pM), 0,5 μ l de chaque dNTP, 2,5 μ l de tampon de réaction 10X (100 mM Tris HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 0,01 % de Gélatine, 30 mM MgCl₂), 0,625 U de Taq Polymerase (Cetus Perkin Elmer). Après un cycle de dénaturation pendant 6 min à 95° C, le mélange est amplifié par 30 cycles (94° C 30 s, 50° C 30 s, 75° C 30 s).

Un témoin négatif d'extraction est réalisé pour chaque série d'extraction. Un témoin négatif d'eau distillée stérile et un témoin positif (souche VHA CF 53) sont inclus lors de chaque PCR.

Des conditions de PCR très strictes sont respectées : les différentes étapes (extraction, transcription, dépôt d'ADNc, préparation des mix de PCR, PCR, révélation) sont réalisées dans des pièces séparées. Du matériel à usage unique, des pipettes à déplacement positif ou des cônes à filtre sont utilisés au maximum.

Révélation des produits de PCR au bromure d'éthidium (BET)

Les produits de PCR (10 μ l) additionnés de 3 μ l de SBS 5X sont déposés sur un gel vertical de polyacrylamide à 9 %. L'électrophorèse est effectuée à 100 V pendant 2 heures. Puis, le gel est immergé 20 min dans une solution de BET et la présence de bandes est observée en lumière ultra-violette. Le fragment amplifié est de 248 paires de bases.

Hybridation avec une oligosonde marquée à la digoxigénine

Les bandes observées au BET sont confirmées par hybridation moléculaire à l'aide de l'oligosonde spécifique : 5' TCAACAACAGTTTCTTCTACAGA 3', située à l'intérieur de la séquence amplifiée.

** Transfert de l'ADN*

L'ADN est transféré à l'aide d'un courant électrique (25 V, 10 min) du gel vers une membrane de nylon Hybond N+ (Amersham) grâce à l'appareil "Fast blot" (Eurogentec) selon les recommandations du fabricant.

* Marquage de l'oligosonde à la digoxigénine

Le marquage de la sonde est réalisé en 3' selon le protocole 3' end labelling kit (Amersham). Le milieu réactionnel comprend : 100 pM de sonde, 5 μ l de tampon 10X, 5 μ l de terminal transferase, 1 μ l de dig-ddUTP, 29 μ l d'eau distillée stérile. L'ensemble est incubé 1 heure à 37° C, puis 10 min dans la glace avant d'être congelé à - 20° C. La sonde ainsi marquée peut être conservée plusieurs mois.

* Hybridation

Après transfert de l'ADN sur la membrane, celle-ci est incubée dans 5 ml de tampon d'hybridation (5X SSC, 0,2 % SDS, 5X Denhardt, 1 % d'agent bloquant (Boehringer) contenant 8 à 10 pM de sonde marquée à la digoxigénine, pendant 4 heures au moins, à 37° C.

* Révélation

Après deux lavages de la membrane pendant 5 min à température ambiante en 2X SSC, puis deux lavages de 5 min à 50° C en 0,2X SSC-1 % SDS, la sonde marquée à la digoxigénine est détectée par un anticorps anti-digoxigénine, conjugué à la phosphatase alcaline, qui agit dans un 2^{ème} temps sur le substrat luminescent. Celui-ci émet un signal lumineux capable d'imprimer un film photographique. La révélation est effectuée en utilisant les réactifs commercialisés par Boehringer.

III - RESULTATS

A - Poliovirus

Au vu des résultats obtenus par culture cellulaire (particules virales détectées tout au long des expériences) seuls certains échantillons ont été analysés: lors de la mise en place de l'expérimentation (T0), en cours et en fin d'expérimentation. En règle générale 4 échantillons ont été analysés par expérimentation. Les résultats obtenus sont indiqués tableaux 2, 3 et 4. Dans tous les cas l'ARN viral a été détecté.

B – Virus de l'hépatite A

Un prélèvement est positif après amplification, lorsqu'il est mis en évidence au BET sur gel d'électrophorèse, puis confirmé par hybridation.

Détection du VHA en fonction de la température

A 25° C et à 18° C, le génome du virus de l'hépatite A a été mis en évidence de J3 à J92. A 4° C, il a été détecté de J3 à J99.

Détection du VHA en fonction de la salinité

A 24 g/l et à 33 g/l, le génome du VHA est détecté de J1 à J85. A 14 g/l, il est détecté de J1 à J92.

Le génome du virus de l'hépatite A a été mis en évidence dans tous les prélèvements étudiés, quelle que soit la température et quelle que soit la salinité. Tous les prélèvements positifs au BET ont été confirmés par l'hybridation à l'aide de l'oligosonde spécifique.

Toutefois, à la concentration de 33 g/l de salinité, des bandes d'intensité moindre ont été observées avec le BET et après hybridation.

DISCUSSION

Si plusieurs études concernant la survie des virus dans différents milieux hydriques ont été réalisées en culture cellulaire, à notre connaissance, il n'existe aucune donnée dans la littérature sur de telles études suivies par biologie moléculaire.

L'apparition de nouvelles technologies a rendu possible le développement d'outils spécifiques et sensibles pour détecter les virus tel par exemple la technique d'amplification génique (PCR). Les amorces utilisées dans cette étude ont été sélectionnées de séquences publiées. Ainsi, le plus souvent, pour la recherche des entérovirus la région amplifiée correspond à la région

non codante située à l'extrémité 5' du génome. Cette région commune à tous les Picornaviridae permet une détection non sélective des entérovirus. De nombreux auteurs tels que Hyypia *et al.* (1989), Gama *et al.* (1988), Chapman *et al.* (1990), Jin *et al.* (1990), Olive *et al.* (1990), Rotbart (1990), Gow *et al.* (1991), Zoll *et al.* (1992), Grasso *et al.* (1992), Petitjean *et al.* (1992) utilisent des amorces situées dans cette région. La plupart de ces études ont un but diagnostique, en effet la sensibilité extrême de cette technique permet de détecter les virus dans certaines pathologies pour lesquelles les méthodes conventionnelles donnaient peu de résultat. De plus cette technique permet de détecter les sérotypes non cultivable.

L'application au milieu marin de cette méthodologie présente de nombreux avantages. Ainsi cette technique permet de détecter tous les sérotypes tandis que la culture cellulaire n'en permet pas l'isolement. Si la sensibilité de celle-ci peut être augmentée en multipliant le nombre de systèmes cellulaires c'est au détriment d'un prix de revient élevé et d'une réalisation technique difficile, certains sérotypes nécessitant même l'utilisation d'animaux pour être mis en évidence. D'autre part les concentrations virales rencontrées dans l'environnement sont très faibles et peuvent se situer à un niveau inférieur à la capacité de détection des méthodes traditionnelles, nécessitant la concentration au préalable des échantillons. La technique de PCR par sa grande sensibilité, jusqu'à 0,3 PFU selon Atmar *et al.* (1993) pourrait permettre d'éviter cette étape. Cependant des problèmes d'inhibiteurs peuvent se rencontrer avec les prélèvements du milieu extérieur. La précipitation préalable par le P.E.G. permet d'éliminer partiellement ces inhibiteurs (tel que les concentrations élevées en chlorure de sodium) et la purification des acides nucléiques par extraction au phénol-chloroforme et précipitation éthanolique est une étape importante pour la bonne réalisation ultérieure des réactions enzymatiques (Atmar *et al.*, 1993).

Cependant les techniques de biologie moléculaire mettent en évidence un génome ou un fragment de génome mais ne permettent pas d'affirmer la présence d'une particule virale infectieuse, seul l'isolement sur culture cellulaire prouvant l'infectiosité. Il est donc intéressant d'évaluer le devenir de particules virales dans l'eau de mer par les 2 types de techniques.

L'objectif de cette étude était de déterminer l'influence de paramètres tel que la température, salinité, et lumière sur le devenir d'une souche de poliovirus ou de VHA en eau de mer stérile.

Concernant la température, les résultats obtenus en culture cellulaire montre une inactivation de 90% de la population virale initiale 20 fois plus rapide à 25°C qu'à 4°C. Quelque soit la température de l'ARN viral a été mis en évidence, même à 25°C après 83 jours (résultat en

culture cellulaire négatif). De même, dans les expérimentations concernant l'influence de la salinité réalisées à 25°C et à l'obscurité, l'ARN viral a toujours été détecté même après 127 jours à 14 g/l de salinité ou 148 jours à 24 g/l. Enfin, la lumière n'ayant aucune influence sur l'infectiosité du poliovirus, l'ARN a été détecté en fin d'expérimentation. Il aurait été intéressant de poursuivre les prélèvements afin d'évaluer la persistance de l'ARN viral en absence de particule infectieuse. Il est en effet vraisemblable que les virions persistent dans l'environnement sous forme de particules virales non infectieuses, la capsid protégeant l'ARN des enzymes du milieu extérieur (Kopecka *et al.*, 1993).

BIBLIOGRAPHIE

- ATMAR R.L., METCALF T.G., NEILL F.H., ESTES M.K.** 1993. Detection of enteric viruses in oysters by using the polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (2):631-635.
- CHAPMAN N.M., TRACY S., GAUNTT C.J., FORTMUELLER U.** 1990. Molecular detection and identification of enteroviruses using enzymatic amplification and nucleic acid hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 28 (5): 843-850.
- GAMA R.E., HUGHES P.J., BRUCE C.B., STANAY G.** 1988. Polymerase chain reaction amplification of rhinovirus nucleic acids from clinical material. *Nucl.Ac.Res.* 16 (19): 9346.
- GOW J.W., BEMAN W.M. H., CLEMENTS G.B. et al.** 1991. Enteroviral RNA sequences detected by polymerase chain reaction in muscle of patient with postviral fatigue syndrome. *B.M.J.* 302: 692-696.
- GRASSO M., ARBUSTINI E., SILINI E. et al.** 1992. Search for Coxsackievirus B3 RNA in idiopathic dilated cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Am.J.Cardiol.* 69 (1): 658-664.
- HYYPIA T., AUVINEN P., MAARONEN M.** 1989. Polymerase chain reaction for human picornaviruses. *J.Gen.Virol.* 70: 3261-3268.
- JIN O., SOLE M.J., BUTANY W.B. et al.** 1990. Detection of enterovirus RNA in myocardial biopsies from patients with myocarditis and cardiomyopathy using gene amplification by polymerase chain reaction. *Circulation.* 82 (1):8-16.
- KOPECKA H., DUBROU S., PREVOT J. et al.** 1993. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters by reverse transcription, polymerase chain reaction, and hybridization. *Appl.Environ.Microbiol.* 59 (4): 1213-1219.
- OLIVE D.M., AL MUPTI S., AL MULLA W. et al.** 1990. detection and identification of picornaviruses in clinical samples following genomic amplification. *J.Gen.Virol.* 71: 2141-2147.
- PETITJEAN J., KOPECKA H., FREYMUTH F. et al.** 1992 Detection of enteroviruses in myocardial biopsy by molecular approach. *J. Med Virol.* 37: 76-82.
- ROBETSON B.H., BROWN V.K., KHANNA B.** 1989. Altered hepatitis A VP1 protein resulting from cell culture propagation of virus. *VirusRes.* 13 (3): 207-212.
- ROTBART H.A.** 1990. Diagnosis of enteroviral meningitis with the polymerase chain reaction. *J. Pediat.* 117 (1): 85-89.
- ZOLL G.J., MELCHERS W.J.G., KOPECKA H. et al.** 1992. General primer-mediated polymerase chain reaction for detection of enteroviruses: application for diagnostic routine and persistent infections. *J. Clin. Microbiol.* 30(1): 160-165.

Tableau 1 : Amorces utilisées pour l'amplification.

Primer	Séquence	Localisation
E1	5' TCC GGC CCC TGA ATG CGG 3'	446-463
E2	5' CAC CGG ATG GCC AAT CCA AT 3'	623-642

Tableau 2 : Recherche de l'ARN viral dans l'eau de mer à 24 g/l et à l'obscurité. Influence de la température.

Température 4° C		Température 18° C		Température 25° C	
Nbre de jours	RT-PCR	Nbre de jours	RT-PCR	Nbre de jours	RT-PCR
0	+	0	+	0	+
15	+	14	+	17	+
50	+	31	+	56	+
76	+	56	+	83	+
83	+	83	+		

Tableau 3 : Recherche de l'ARN viral dans l'eau de mer à 25° C et à l'obscurité. Influence de la salinité.

Salinité 14 g/l		Salinité 24 g/l		Salinité 33 g/l	
Nbre de jours	RT-PCR	Nbre de jours	RT-PCR	Nbre de jours	RT-PCR
0	+	0	+	0	+
41	+	13	+	5	+
127	+	48	+	44	+
		148	+	154	+

Tableau 4 : Recherche de l'ARN viral dans l'eau de mer à 33 g/l et à 19° C. Influence de la lumière.

Lumière		Obscurité	
Nbre de jours	RT-PCR	Nbre de jours	RT-PCR
0	+	0	+
2	+	4	+
25	+	25	+
43	+	43	+